



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Wagner Bastos dos Santos Oliveira

**Efeitos da transgenia em milho:** performance agronômica e adaptativa em cultivares híbridas e variedade crioula sob diferentes proporções de fluxo gênico

FLORIANÓPOLIS  
2019

Wagner Bastos dos Santos Oliveira

**Efeitos da transgenia em milho:** performance agronômica e adaptativa em cultivares híbridas e variedade crioula sob diferentes proporções de fluxo gênico

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutor em Ciências.  
Orientador: Prof. Dr. Juliana Bernardi Ogliari

Florianópolis  
2019

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

Oliveira, Wagner Bastos dos Santos

Efeitos da transgenia em milho: performance agrônômica e adaptativa em cultivares híbridas e variedade crioula sob diferentes proporções de fluxo gênico / Wagner Bastos dos Santos Oliveira ; orientador, Juliana Bernardi Ogliari, 2018.

137 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Transgenes. 3. Zea mays L.. 4. Exserohilum turcicum. 5. Agrobiodiversidade.. I. Ogliari, Juliana Bernardi. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Wagner Bastos dos Santos Oliveira

**Efeitos da transgenia em milho:** performance agronômica e adaptativa em cultivares híbridas e variedade crioula sob diferentes proporções de fluxo gênico

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Altair Toledo Machado  
EMBRAPA Cerrados

Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Ciências obtido pelo Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

---

Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares  
Coordenador do Programa

---

Prof. Dra. Juliana Bernardi Ogliari  
Orientadora

Florianópolis, 30 de Outubro de 2018.

Ao meu amado pai Wander Silveira de Oliveira (*in memoriam*), à minha amada mãe Norma Bastos dos Santos Oliveira e as minhas irmãs Lúgia e Nara.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dá o sopro da vida e estar comigo a cada momento.

Aos meus pais Wander Silveira de Oliveira (*in memoriam*) e Norma Bastos dos Santos Oliveira por me ensinarem os valores do bem, me incentivar a ir em busca dos meus sonhos e batalharem para que eu pudesse chegar até aqui.

As minhas irmãs que sempre foram meu apoio, me ouviram sempre nos bons e maus momentos e sempre tinham uma palavra de conforto para me ajudar a continuar na busca dos meus ideais.

As minhas irmãs de coração Rosenilda de Souza e Márcia Regina Fanta que sempre me apoiaram em todos os momentos, me ouviram, me deram incentivo, força, foram minhas cias nos momentos mais importantes da vida nestes quatro anos em Florianópolis.

A minha orientadora Juliana Bernardes Ogliairi pelo incentivo e paciência. Aos amigos do NEABio Gabriel, Tassy, Inês, Samuel, Kelly, Rafael, Natália, Guilherme, Betzaida, Estêvão, Linda, Francisco, Rosemari e Otávio pelos momentos de amizade e ensinamentos compartilhados. Aos amigos de turma e colegas do RGV.

Aos funcionários da Fazenda Experimental da Ressaca Otávio, Sebastião, Nuno, Sr. Clésio, Sr. Elson e aos terceirizados da mesma que foram essenciais na montagem, condução e avaliação dos experimentos a campo presentes neste trabalho.

Ao senhor Marcelo Neris pelo apoio em disponibilizar as sementes dos híbridos estudados e o herbicida utilizado no estudo.

Aos agricultores e mantenedores de sementes crioulas do EOSC principalmente os guardiões da variedade crioula de milho Rosado Rajado.

Ao Programa em Recursos Genéticos Vegetais pela oportunidade e apoio nestes quatro anos. Aos coordenadores e a secretária. Aos professores do RGV pelos ensinamentos, dedicação e incentivo ao estudo e a pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos amigos José Henrique Soler Guilhen e a Tiago de Souza Marçal, que mesmo longe, sempre me ajudaram e apoiaram quando precisava.

“A tarefa não é somente ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”  
(Arthur Schopenhauer).

## RESUMO

A região do Extremo Oeste de Santa Catarina – EOSC apresenta grande diversidade de variedades crioulas de milho, evoluindo na presença do seu parente silvestre, em processo de domesticação. Indicada como um microcentro de diversidade do gênero *Zea*, a região de estudo contempla um sistema bimodal de produção de milho, ou seja, variedades crioulas e híbridos transgênicos e não transgênicos cultivados na mesma propriedade. Diante do potencial de cruzamento das variedades crioulas por fluxo gênico, mediado por pólen de milho híbrido convencional e transgênico, é premente a necessidade de avaliar os impactos biológicos e agronômicos da transgenia sobre a agrobiodiversidade. Diante do exposto, esse trabalho teve o objetivo de avaliar os impactos da transgenia, promovida pela inserção dos transgenes *cry1F* (resistência a Lepidópteros), *pat* (tolerância ao herbicida a base de glufosinato de amônio - HBGA) e *cp4epsps* (tolerância ao herbicida a base de glifosato - HBG), em híbridos isogênicos de milho, sob a reação de resistência a helmintosporiose, performance agronômica e fenologia de cultivares híbridas e variedade crioula, sob diferentes proporções de fluxo gênico. Para este estudo, três híbridos isogênicos da série Biogene BG7060®, desenvolvidos pela Dupont do Brasil S.A/Pioneer – NGM não geneticamente modificado, híbrido Hx portador dos transgenes *cry1F* e *pat* (evento TC1507) e o híbrido Hxrr, portador do transgene *cp4 epsps* (evento NK603) combinado com o evento TC1507 – e a variedade crioula Rosado oriunda de Anchieta no EOSC. Por meio de polinizações manuais, foram desenvolvidas populações de milho crioulo contendo 25, 50 e 75% da composição genética de cada híbrido, separadamente, a fim de simular a ocorrência acidental de fluxo gênico recorrente. Como resultados, foram observados menores períodos de incubação e latência e maior incidência da helmintosporiose no híbrido Hxrr portador dos eventos TC1507 combinado com NK603, em relação ao híbrido isogênico NGM, sobretudo, sob aplicação de HBGA para o controle de plantas invasoras. Os híbridos isogênicos NGM, Hx e Hxrr foram afetados diferentemente quanto a resistência a helmintosporiose, fenologia, rendimento de grãos e seus componentes, em função da presença e quantidade de eventos em seu genoma. A resistência a helmintosporiose foi afetada pelo aumento do percentual dos genes dos híbridos na variedade crioula, particularmente em populações geradas a partir do híbrido que acumula a inserção de dois eventos. O fluxo gênico entre híbridos isogênicos e a variedade crioula Rosado causa efeitos diferentes sobre os híbridos isogênicos NGM, Hx e Hxrr quanto aos caracteres monocíclicos da helmintosporiose, fenologia e agronômicos. São imprevisíveis os impactos biológicos do fluxo gênico entre híbridos e variedades crioulas sobre a conservação da agrobiodiversidade do EOSC.

**Palavras-chave:** Transgenes. *Zea mays* L. *Exserohilum turcicum*. Herbicida. Agrobiodiversidade.

## ABSTRACT

The western region of Santa Catarina State (WSCS) shows a wide range of landraces corn, evolving in the presence of their wild relative in the domestication process. Appointed as a small nucleus of *Zea* gender diversity, the geographical region studied contemplate a bimodal system of corn production, it means landraces varieties and transgenic and non-transgenic commercial hybrids. Due it potential contamination of landraces species by genic flow by pollen among conventional hybrid corn and transgenic, it is essential to evaluate the biological and agronomics damages of transgenic species on agrobiodiversity. Therefore, this study aims evaluate the transgenic direct damages by insertion of *cry1F* (Leptodopteran resistance), *pat* (ammonium glufosinate herbicide tolerance) and *cp4epsps* (ammonium glyphosate herbicide tolerance) in isogenic corn hybrids under Northern Corn Leaf Blight (NCLB) resistance reaction, agronomic performance and phenology of hybrids cultivars and landraces varieties under accidental and periodical genic flow. Three isogenic hybrids developed by Dupont Brasil S.A/Pioneer of Biogene BG7060® were studied – NGM non-genic modified; hybrid Hx, *cry1F* and *pat* (event TC1507) transgeners carrier and Hxr, *cp4 epsps* (event NK603) transgeners carrier, matched with TC1507 event – and Rosado landrace of Anchieta at WSCS. By means of manual pollination, were developed landraces corn population containing 25, 50 and 75 % of each hybrid genetic composition to simulate the accidental and periodical flow. Shorter periods of incubation and latency and higher incidence of NCLB were observed in Hxr hybrid in relation to NGM isogenic hybrid, especially when ammonium glufosinate was applied to weed control. NGM, Hx and Hxr isogenic hybrids were differently affected regarding NCLB resistance, phenological characters, seed yield and their components, for the presence and the quantity of events in their genome. The NCLB resistance was affected by the percentual increase of hybrids genes in landrace variety, essentially in populations that were generate by hybrids with two events. The isogenic flow among isogenic hybrids and Rosado landraces causes different effects among NGM, Hx, Hxrre and NCLB monocyclic characters, phenological, agronomics and corn yield were influentiated. The impacts of genic flow between hybrids and landraces varieties are unpredictable in aspects of agrobiodiversity conservations of WSCS.

**Key words:** Transgene. *Zea mays* L. *Exserohilum turcicum*. Herbicida. Agrobiodiversity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estádios fenológicos de uma planta de milho, pela escala de Ritchie et al (1993). .....	19
<b>Figura 2.</b> Esquema do inserto para o milho transgênico Herculex I (TC1507). Genes inseridos: <i>cry1F</i> e <i>pat</i> , promotor ubiZM (oriundo do milho) e P35S, terminador: T35S .....	27
<b>Figura 3.</b> Esquema do inserto para o milho transgênico, evento NK603 <i>RR</i> Roundup Ready. Promotor: P35S, terminador: NOS-t. ....	29
<b>Figura 4.</b> Esporo do fungo <i>Exserohilum turcicum</i> .....	33
<b>Figura 5.</b> Lesão necrótica (tipo susceptível) causada por <i>Exserohilum turcicum</i> em folha de milho. ....	35
<b>Figura 6.</b> Área de distância entre milhos transgênico e milho não transgênico. ....	38
<b>Figura 7.</b> Regressões lineares da severidade da helmintosporiose (AACPD) para três híbridos isogênicos em dois sistemas de manejo das plantas ruderais (sem aplicação de herbicida-S/H e com aplicação do herbicida. ....	76
<b>Figura 8.</b> Heatmap da severidade da helmintosporiose para o fluxo gênico gerado entre os híbridos isogênicos de milho NGM, Hx e HxRR com a variedade crioula Rosado, em relação as oito avaliações da doença (56, 63, 70, 77, 84, 91, 98 e 105 dias após o plantio) safra 2016/2017, na forma de heat map, construído pela análise de agrupamento hierárquico, utilizando distância Euclidiana Média Padronizada e o modelo de agrupamento por UPGMA. Escala: Branco menor severidade e Preto maior severidade. Coef. Correlação Cofenética: 0,82.....	115

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estádios fenológicos de uma planta de milho pela escala de Ritchie et al. (1993). .....	20
<b>Tabela 2.</b> Médias dos híbridos isogênicos de milho NGM (não geneticamente modificado), Hx (portador do eventoTC1507), Hxrr (portador dos eventos TC1507 + NK603) para as variáveis incidência (INCI), período de incubação (INCU) e latência (LATE), avaliadas experimentalmente em dois sistemas de manejo de plantas ruderais. Florianópolis-SC, safra 2016/2017. ....	73
<b>Tabela 3.</b> Médias dos híbridos isogênicos de milho NGM (não geneticamente modificado), Hx (portador do eventoTC1507), Hxrr (portador dos eventos TC1507 + NK603) para a variável AACPD da helmintosporiose, avaliadas experimentalmente em dois sistemas de manejo de plantas ruderais. Florianópolis-SC, safras 2013 e 2016/2017. ....	75
<b>Tabela 4.</b> Médias dos híbridos isogênicos de milho NGM (não geneticamente modificado), Hx (portador do eventoTC1507), Hxrr (portador dos eventos TC1507 + NK603) para as variáveis fenológicas florescimento masculino (FM) e florescimento feminino (FF), avaliadas experimentalmente em dois sistemas de manejo de plantas ruderais. Florianópolis-SC, safra 2016/2017. ....	78
<b>Tabela 5.</b> Médias dos híbridos isogênicos de milho NGM (não geneticamente modificado), Hx (portador do eventoTC1507), Hxrr (portador dos eventos TC1507 + NK603) para as variáveis NGF (número de grãos por fileira), CE (comprimento da espiga), DE (diâmetro da espiga) e DS (diâmetro do sabugo), avaliadas experimentalmente em dois sistemas de manejo de plantas ruderais. Florianópolis-SC, safra 2016/2017. ....	81
<b>Tabela 6.</b> Médias dos híbridos isogênicos de milho NGM (não geneticamente modificado), Hx (portador do eventoTC1507), Hxrr (portador dos eventos TC1507 + NK603) para as variáveis rendimento de grãos e seus componentes, PECP (peso das espigas com palha), PESP (peso das espigas sem palha), P1000 (peso de mil grãos) e PROD (produtividade), avaliadas experimentalmente em dois sistemas de manejo de plantas ruderais. Florianópolis-SC, safra 2016/2017. ....	82
<b>Tabela 7.</b> Médias obtidas de três híbridos isogênicos de milho da série BG7060, sob fluxo gênico com a variedade crioula de milho Rosado, para a variável incidência e os caracteres monocíclicos da helmintosporiose. Florianópolis-SC, Safra 2013 e 2016/2017. ....	113
<b>Tabela 8.</b> Médias obtidas de três híbridos isogênicos de milho da série BG7060, sob fluxo gênico com a variedade crioula de milho Rosado, para os caracteres fenológicos do milho. Florianópolis-SC. Safra 2016/2017. ....	116
<b>Tabela 9.</b> Médias obtidas de três híbridos isogênicos de milho da série BG7060, sob fluxo gênico com a variedade crioula de milho Rosado, para os caracteres agrônômicos do milho. Florianópolis-SC. Safra 2016/2017. ....	118
<b>Tabela 10.</b> Médias obtidas de três híbridos isogênicos de milho da série BG7060, sob fluxo gênico com a variedade crioula de milho Rosado, para os caracteres de rendimento do milho. Florianópolis-SC. Safra 2016/2017. ....	120

## SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA.....	13
2.0	OBJETIVOS.....	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3.0	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1	A CULTURA DO MILHO.....	17
3.1.1	Características da Espécie.....	17
3.1.2	Fenologia.....	18
3.1.3	Cultivo do milho no Brasil e em Santa Catarina.....	22
3.2	MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO – GM.....	23
3.2.1	Evento transgênico TC1507.....	27
3.2.2	Evento transgênico NK603.....	28
3.3	VARIETADES CRIOULAS DE MILHO.....	29
3.4	DOENÇAS FÚNGICAS: A HELMINTOSPORIOSE.....	32
3.5	FLUXO GÊNICO ENTRE MILHOS GM E NGM.....	36
3.5.1	Efeito sobre organismos não alvo.....	42
3.5.2	Efeitos indiretos dos transgenes sobre doenças fúngicas.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46
	CAPÍTULO 1. EFEITOS DA TRANSGENIA SOBRE A RESISTÊNCIA A HELMINTOSPORIOSE E PERFORMANCE AGRONÔMICA DO MILHO SOB PRÁTICAS DE MANEJO QUÍMICO E MANUAL DE PLANTAS RUDERAIS.....	60
1.0	INTRODUÇÃO.....	61
2.0	MATERIAL E MÉTODOS.....	65
2.1	MATERIAL VEGETAL.....	65
2.2	ENSAIO A CAMPO.....	65
2.3	AValiação EXPERIMENTAL.....	67
2.3.1	Coleta, isolamento, cultura monospórica e inoculação do patógeno.....	67
2.3.2	Severidade causada pela helmintosporiose.....	69
2.3.3	Caracteres Fenológicos e Agronômicos.....	70
2.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	71
3.0	RESULTADOS.....	72
3.1	EFEITOS DA TRANSGENIA SOBRE A RESISTÊNCIA A HELMINTOSPORIOSE.....	72
3.2	EFEITOS DA TRANSGENIA SOBRE OS ESTÁDIOS FENOLÓGICOS, RENDIMENTO DE GRÃOS E SEUS COMPONENTES.....	78

4.0 DISCUSSÃO .....	83
4.1 EFEITOS DA TRANSGENIA SOBRE A RESISTÊNCIA A HELMINTOSPORIOSE.....	83
4.2 EFEITOS INDIRETOS DA TRANSGENIA SOBRE A FENOLOGIA E CARACTÉRES DE RENDIMENTO.....	88
5.0 CONCLUSÕES .....	91
REFERÊNCIAS.....	91
CAPÍTULO 2. FLUXO GÊNICO ENTRE TRANSGÊNICOS E UMA VARIEDADE CRIOLA MILHO E SEUS IMPACTOS SOBRE A RESISTÊNCIA AO FUNGO <i>Exserohilum turcicum</i> , PERFORMANCE AGRONÔMICA E ADAPTATIVA DO MILHO.....	
1.0 INTRODUÇÃO .....	100
2.0 MATERIAL E MÉTODOS .....	104
2.1 MATERIAL VEGETAL.....	104
2.2 ENSAIO A CAMPO.....	105
2.3 AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL.....	106
2.3.1 Coleta, isolamento, cultura monospórica e inoculação do patógeno.....	107
2.3.2 Severidade causada pela helmintosporiose.....	108
2.3.3 Caracteres Fenológicos, Agronômicos e de Rendimento.....	110
2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	111
3.0 RESULTADOS .....	111
3.1 EFEITOS DO FLUXO GÊNICO ENTRE TRANSGÊNICOS E CRIOULO SOBRE A RESISTÊNCIA A HELMINTOSPORIOSE.....	111
3.2 EFEITOS DO FLUXO GÊNICO ENTRE TRANSGÊNICOS E CRIOULO SOBRE CARACTERES FENOLÓGICOS, AGRONÔMICOS E DE RENDIMENTO DE GRÃOS.....	115
4.0 DISCUSSÃO .....	122
4.1 EFEITOS DO FLUXO GÊNICO ENTRE TRANSGÊNICOS E CRIOULO SOBRE A RESISTÊNCIA A HELMINTOSPORIOSE.....	122
4.2 EFEITOS DO FLUXO GÊNICO ENTRE TRANSGÊNICOS E CRIOULO SOBRE CARACTERES FENOLÓGICOS, AGRONÔMICOS E DE RENDIMENTO DE GRÃOS.....	124
4.3 IMPACTOS SOBRE A AGROBIODIVERSIDADE DO EOSC.....	126
5.0 CONCLUSÕES .....	130
REFERÊNCIAS.....	130

## 1.0 INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

A produção de grãos na safra 2016/2017 registrou 238,7 milhões de toneladas, a maior da história do Brasil. Para a cultura do milho, a produção alcançou 97,7 milhões de toneladas (30,5 milhões de toneladas para a primeira safra e 67,2 milhões para a segunda), total este 46,9% acima da safra anterior (CONAB, 2017). No estado de Santa Catarina, a área plantada de milho foi de 400 mil hectares, com produção de 3,34 milhões de toneladas do grão. Na região Extremo Oeste de Santa Catarina – EOSC, a área plantada foi de 45,6 mil hectares, com produção de 360 mil toneladas e produtividade de 7,9 t ha<sup>-1</sup> (Epagri, 2017).

A cultura é muito importante para o estado de Santa Catarina, onde o milho é usado principalmente para consumo humano (amido, farinha, xarope de glucose, milho doce, pipoca e mini milho), alimentação animal (silagem, forragem e ração), confecção de artesanato a partir da palha e do grão e também como matéria-prima essencial para uma ampla gama de produtos industriais (OGLIARI et al., 2013; KIST et al., 2014). No EOSC, muitas famílias de agricultores ainda produzem e cultivam a própria semente de variedades crioulas de diversos cultivos (CANCI et al., 2004; CANCI 2006; CANCI et al., 2010), que são consumidas pelas famílias mantenedoras, principalmente dentro de seus próprios estabelecimentos.

Tomando como exemplo a cultura do milho, foram identificados pelo Censo da Diversidade de 2012, realizado em dois municípios do EOSC, 374 populações de milho comum, 1.078 de milho pipoca (COSTA et al., 2016) e 61 variedades de milho adocicado (SOUZA, 2015), além de 136 populações de parentes silvestres, alguns dos quais pertencentes a espécie *Zea luxurians* (SILVA et al. 2015b). As variedades de milho pipoca foram denominadas em cinco raças, dentre as quais, pelo menos, três constituem novas raças ainda não descritas na literatura (SILVA et al, 2016b). Com base na riqueza de variedades crioulas de milho em evolução e na presença do seu parente silvestre em processo de domesticação, essa região foi indicada como um microcentro de diversidade dessa espécie (COSTA et al., 2016), fora da sua área nuclear de origem filogenética, no México.

Um sistema bimodal de produção foi verificado nesses dois municípios do EOSC, onde as variedades crioulas e híbridos comerciais não transgênicos e transgênicos

são cultivados na mesma propriedade (SILVA et al., 2013). Em geral, as cultivares transgênicas mais difundidas na região são portadoras de transgenes que conferem tolerância a herbicidas como o glifosato e o glufosinato de amônia e resistência a insetos, principalmente da ordem das lepidópteras, destacando-se os eventos transgênicos TC1507 e NK603, aprovados em setembro de 2008.

Dos agricultores que conserva variedades crioulas de milho, entrevistados no Diagnóstico da Diversidade em 2012, apenas 24% planta unicamente milho de variedades crioulas e 76% variedades crioulas e comerciais, destes 76% um total de 34% plantam híbridos geneticamente modificados - GM. A área total plantada com milho comercial foi de 877 hectares, com uma média de 5,35 hectares por propriedade (Anchieta com 4,24 hectares e Guaraciaba com 6,59 hectares). A área total plantada com variedades crioulas foi de 62 hectares e a média foi de 4.517 m<sup>2</sup> (COSTA, 2013).

Ainda no mesmo estudo, foi identificado que 70% das áreas destinadas ao cultivo das variedades crioulas estão sendo cultivadas a uma distância menor ou igual a 100 metros das lavouras de milho convencional ou transgênico (COSTA, 2013). A utilização desta pequena distância fere o que está disposto no artigo 2 da Resolução Normativa nº 4 (RN4), publicada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), no Diário Oficial da União de 23/08/2007, conforme o seguinte texto: *“Para permitir a coexistência, a distância mínima entre uma lavoura de milho geneticamente modificado e outra de milho não geneticamente modificado, localizada em área vizinha, deve ser igual ou superior a 100 metros ou, alternativamente, 20 metros, desde que acrescida de bordadura com, no mínimo, dez fileiras de plantas de milho convencional de porte e ciclo vegetativo similar ao milho geneticamente modificado”*.

O impacto ecológico do fluxo gênico entre as cultivares transgênicas e as populações de milho crioulo não é a única constatação preocupante na região. A ocorrência de fluxo gênico entre transgênicos e teosinto (parente silvestre do milho) também são relevantes para os ecossistemas agrícolas da região EOSC e, por isso, deve ser analisado do ponto de vista da biossegurança. A constatação de fluxo gênico entre as formas silvestres do gênero *Zea* e o milho transgênico é consequência da contaminação de plantas espontâneas de teosinto, em lavouras cultivadas por híbridos de milho transgênico (SILVA et al., 2015).

A proximidade entre lavouras de milho GM, milho crioulo e teosinto é uma preocupação em vista da biologia reprodutiva das plantas. Os pólen liberados pelos pendões da planta durante a fase reprodutiva são levados pelo vento, percorrem grandes distâncias e são capazes de fecundar espigas que estejam receptivas de quaisquer outras plantas de milho, que não necessariamente aquela de onde o pólen partiu. E assim, perde-se com facilidade o controle da composição genética do milho, o que no caso das variedades crioulas pode representar erosão genética, perda de variedades adaptadas e o consumo e cultivo desconhecido de variedades crioulas contaminadas por cultivares GM (COSTA, 2013).

Estudos são realizados a fim de avaliar os efeitos não-intencionais das variedades GM, além daquela característica conferida pela inserção de determinado transgene ou fragmento de DNA. Parte dos estudos envolvendo a introgressão de genes utiliza a comparação entre as plantas GM e as suas versões isogênicas convencionais. Porém, visto a problemática relatada anteriormente, torna-se fundamental avaliar populações de variedades crioulas de milho que tenham sofrido cruzamentos indesejados com milhos GM, por fluxo gênico.

No ano de 2011, a uma série de trabalhos abordando esta problemática foram desenvolvidos. Um deles teve como foco avaliar o efeito do fluxo gênico de milhos geneticamente modificados - GM em uma variedade crioula de milho quanto a estrutura de comunidades de microrganismos. Para isso, foram estudados três híbridos isogênicos pertencentes a série BG7060 da BioGene Pioneer e uma variedade crioula denominada "Rosado" conservada *on farm* por agricultores familiares do EOSC (SILVA et al., 2016a). Os três híbridos isogênicos: NGM (não geneticamente modificado), Hx que apresenta o evento TC1507, que contém dois transgenes (transgene *cry1F* codifica uma delta-endotoxina - *Cry1F* letal a insetos da ordem Lepidóptera; transgene *pat* codifica a enzima fosfinotricina-N-acetil transferase - PAT, que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio) e Hxrr que apresenta o evento NK603 (transgene *cp4epsps* responsável pela expressão da proteína CP4-EPSPS, que confere tolerância ao herbicida Roundup Ready) combinado ao TC1507. Através de polinizações manuais foram inseridos os pólen dos híbridos (NGM, Hx e Hxrr) em plantas de milho crioulo por duas gerações, a fim de simular a ocorrência de fluxo gênico reincidente (introgressões) e, assim, gerar as

populações de milho crioulo contendo 25, 50 e 75% da composição genética de cada híbrido, separadamente (SILVA, 2015a). Mudanças na diversidade da comunidade de fungos endofíticos foliares no híbrido portador dos eventos TC1507 e NK603, em relação à variedade crioula e ao híbrido NGM (SILVA et al., 2016a). A estrutura da comunidade de fungos endofíticos sofreu maiores alterações quando as introgressões (cruzamentos) eram provenientes do híbrido portador de dois eventos (Hxrr) (SILVA, 2015a).

Outro ponto a ser levado em consideração é a escassez de trabalhos que relatem efeitos indiretos dos transgênicos sobre doenças fúngicas no milho. Poucos estudos avaliaram informações neste âmbito, supomos que isso ocorra pela dificuldade de condução de experimentos, avaliação e comprovação do efeito indireto causado pelos transgênicos, além do baixo incentivo de pesquisas relacionadas a este tema.

Diante destas lacunas, decidiu-se estudar o impacto dos transgênicos em híbridos isogênicos de milho portadores do evento TC1507 (*cry1F* e *pat*) isolado e combinado com NK603 (*cp4epsps*) sobre a resistência ao fungo fitopatogênico *Exserohilum turcicum*, causador da helmintosporiose. Será que os híbridos isogênicos em estudo também se comportariam da mesma forma como observado por Silva (2015a)? E quanto aos cruzamentos gerados, será que as maiores severidades da doença ocorreriam no híbrido com dois eventos transgênicos (Hxrr)?

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

I- Compreender os impactos da transgenia sobre a resistência a helmintosporiose, fenologia e performance agrônômica do milho.

II- Compreender os impactos do fluxo gênico progressivo de híbridos isogênicos não geneticamente modificados (NGM) e geneticamente modificados (GM) sobre uma variedade crioula de milho quanto à resistência a helmintosporiose, fenologia e performance agrônômica do milho.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I- Avaliar em três híbridos isogênicos de milho portadores de dois eventos isolados e combinados e a sua versão NGM, quanto à reação de resistência ao fungo fitopatogênico *Exserohilum turcicum*, sob manejo das invasoras manual ou químico.

II- Avaliar em três híbridos isogênicos de milho, portadores de dois eventos transgênicos isolados e combinados e a sua versão NGM, quanto aos caracteres associados à fenologia, performance agrônômica e rendimento de grãos, sob manejo das invasoras manual ou químico.

III. Avaliar em três híbridos isogênicos de milho portadores de dois eventos isolados e combinados e a sua versão NGM, sob condições simuladas de fluxo gênico com uma variedade crioula de milho do EOSC, quanto a reação de resistência ao fungo fitopatogênico *Exserohilum turcicum*, performance agrônômica e adaptativa do milho.

## 3.0 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 A CULTURA DO MILHO

#### 3.1.1 Características da Espécie

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta da família *Poaceae*, tribo *Maydeae*, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L., originária da América Central (México e Guatemala) há mais de sete mil anos. A teoria mais aceita é que o milho seja originado de um processo evolutivo do teosinto (*Zea mays* spp. *parviglumis*), também uma gramínea com inúmeras espigas e sem sabugo, que se cruza de maneira natural com o milho e cuja descendência é fértil (GALINAT, 1995; MATSUOKA et al., 2002; VIGOUROUX et al., 2008).

O milho é uma gramínea, de ciclo agrônômico anual, monóica, alógama com  $2n = 2x = 20$  cromossomos (PATERNIANI; CAMPOS, 1999). O grão de milho é um fruto denominado cariopse, geralmente, de coloração amarela ou branca no germoplasma

melhorado, podendo ter colorações variando do vermelho ao preto, principalmente nas variedades crioulas (GONÇALVES, 2013; PAES, 2006).

Uma das principais características do milho é a sua grande capacidade de adaptação a diversos climas, sendo cultivado em praticamente todas as regiões do mundo, nos hemisférios norte e sul, em climas úmidos e regiões secas. Embora possa ser cultivado em uma ampla gama de condições, o limite de temperatura para a sobrevivência e reprodução do milho está entre 10 e 30 °C (PATERNIANI; CAMPOS, 1999). Trata-se de um alimento rico em carboidratos, considerado como energético, fonte de óleo, fibras e fornece pequenas quantidades de vitaminas (E, B1, B2 e ácido pantotênico), além de alguns minerais, como o fósforo e o potássio (MATOS et al., 2006).

O milho é a espécie mais estudada geneticamente, devido ao fato de apresentar característica monóica de fácil manuseio, baixo número de cromossomos, grande quantidade de pólen produzido pelas plantas e o ovário grande, que facilitam a fecundação cruzada e cruzamentos dirigidos (BORÉM, 2001; DESTRO; MONTALVÁN, 1999).

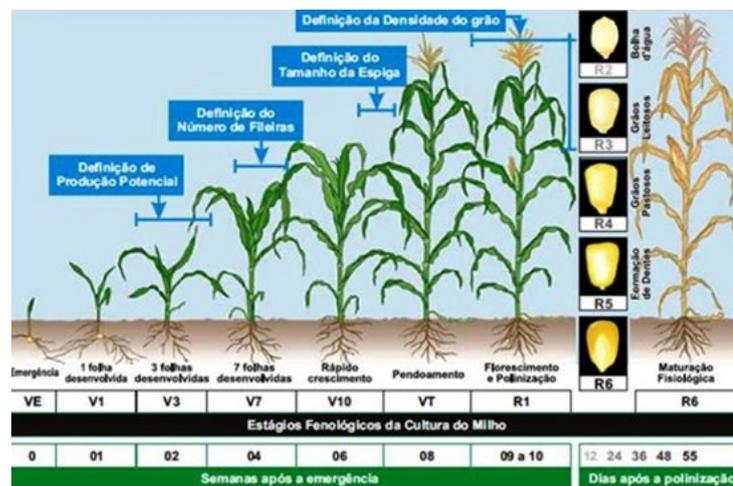
### **3.1.2 Fenologia**

A fenologia é definida como o ramo da Ecologia que estuda os fenômenos periódicos dos seres vivos e suas relações com o ambiente (BERGAMASCHI, 2007). A fenologia das culturas é fundamental na avaliação de impactos da variabilidade climática em escala espaço-temporal ou de futuros cenários, à luz das relações clima-planta. A caracterização dos eventos fenológicos dados pelas escalas fenológicas, permite identificar todo desenvolvimento das plantas, a fim de estabelecer relações com as condições do ambiente (clima, em particular), sob diferentes ambientes (anos, épocas ou locais) (BERGAMASCHI; MATZENAUER, 2014).

As escalas fenológicas utilizam características morfológicas que são facilmente identificadas para determinar o estágio de desenvolvimento em que se encontra a planta, associando a morfologia com eventos fisiológicos, que estejam ocorrendo num dado momento e que não possam ser visualizados externamente (WORDELL FILHO; ELIAS, 2010).

Existem diversas escalas fenológicas para a cultura do milho. Dentre estas, a escala proposta por Ritchie et al. (1993) é uma das mais utilizadas atualmente no Brasil. A Figura 1 apresenta a escala fenológica de Ritchie et al. (1993).

**Figura 1.** Estádios fenológicos de uma planta de milho, pela escala de Ritchie et al (1993).



Fonte: Ritchie et al. (1993).

Os estádios fenológicos do milho são divididos em vegetativos (V) e reprodutivos (R). Para o estágio vegetativo, a mudança de estágio é definida pelo surgimento de uma nova folha expandida. Assim, V4 é caracterizada pela presença de quatro folhas expandidas e V5 por cinco folhas expandidas. O estágio reprodutivo, inicialmente é identificado a partir do florescimento masculino e feminino (R1), passando por uma sequência de estádios que inclui, os estádios de enchimento de grão na espiga R2: grão bolha, R3: grão leitoso, R4: grão pastoso, R5: formação de dentes e R6: maturação fisiológica (Tabela 1).

De uma maneira geral, a temperatura é o principal elemento determinante em diversas mudanças de estágio das plantas de milho, principalmente, na emergência das plântulas e na taxa de aparecimento de novas folhas. Ao redor do estágio V5, todos os primórdios de folhas e espigas já se formaram e um pendão microscópico já existe no ápice do caule, que ainda permanece debaixo ou ao nível do solo. A temperatura do solo ainda tem grande influência sobre o ponto de crescimento, a emissão de novas folhas, o número de folhas e o tempo de emissão do pendão (RITCHIE et al., 2003; RITCHIE et al., 1993).

**Tabela 1.** Estádios fenológicos de uma planta de milho pela escala de Ritchie et al. (1993).

<b>Estádios Fenológicos da Cultura do Milho</b>		
<b>Estádios Vegetativos</b>		
	VE	Emergência
Afilhamento	V1	Uma folha desenvolvida
	V2	Início do afilhamento
	V3	Três folhas desenvolvidas
	V4	Início da emissão do colmo e alongamento das bainhas das folhas
	V5	Colmo formado
Alongamento do colmo	V6	Primeiro nó do colmo visível
	V7	Segundo nó do colmo visível, sete folhas desenvolvidas
	V8	Última folha visível, ainda enrolada
	V9	Lígula da última folha visível
	V10	Rápido crescimento
Pendoamento	VT	Emissão do pendão
<b>Estádios Reprodutivos</b>		
	R1	Florescimento e polinização
	R2	Grãos em formato de bolha d'água
	R3	Grãos leitosos
	R4	Grãos pastosos
	R5	Grãos farináceos (início da formação de "dentes")
	R6	Grãos duros, maduros fisiologicamente

Em V9, muitos primórdios de espigas já são visíveis por dissecção, em cada nó acima do solo, exceto nos 6 a 8 nós abaixo do pendão. Porém, apenas um ou dois primórdios de espiga, localizados mais acima, se desenvolverão para serem colhidas. Em baixas densidades de semeadura, as plantas podem ser mais prolíficas, ou seja, podem produzir mais de uma espiga por colmo, dependendo do genótipo. Em torno de V10, o tempo de aparecimento de novas folhas é muito curto, da ordem de 2 a 3 dias. As plantas iniciam um rápido aumento no acúmulo de nutrientes e matéria seca, que continuará durante o período reprodutivo. A demanda por água e nutrientes aumenta, na medida em que ocorre o aumento na taxa de crescimento (RITCHIE et al., 1993).

A sequência de formação dos componentes do rendimento de grãos é importante para entender as necessidades das plantas, a sensibilidade da cultura às condições de ambiente e seus períodos críticos à ocorrência de estresses. O número de fileiras de grãos nas espigas é determinado fortemente pelo genótipo e não pelo ambiente.

Porém, o número de grãos (comprimento da espiga) é afetado por estresses ambientais, o que o torna variável, segundo as condições do meio (NIELSEN, 2007b).

Em V12, começam a se definir o número de óvulos (grãos em potencial) e o tamanho das espigas, embora o número de fileiras de grãos por espiga já esteja definido em V5. Mas, o número final de grãos por fileira estará completo somente uma semana antes do espigamento (em torno de V17). Neste período de formação de óvulos e espigas, estresse por água ou nutrientes reduzem seriamente o número de grãos e o tamanho das espigas na colheita (RITCHIE et al., 2003, RITCHIE et al., 1993).

Segundo Nielsen (2007b), o tamanho potencial da espiga (número de óvulos) é determinado num longo período, que vai do estágio V5 até provavelmente V15. Porém, a percentagem de óvulos fertilizados, para o início da formação de grãos, depende do sucesso ou falha na polinização (NIELSEN, 2007a). O número final de grãos por espiga é definido em uma ou duas semanas após a polinização (NIELSEN, 2005) e o peso de grãos é determinado ao longo do restante do período de “enchimento de grãos”, que termina na maturação fisiológica (NIELSEN, 2007c).

Grande redução no rendimento de grãos pode ser causada por estresses hídricos, entre duas semanas antes e duas semanas após o espigamento. A maior redução resulta de estresse no espigamento (R1). Isto também é verdadeiro com outros tipos de estresses ambientais, como de nutrientes, altas temperaturas ou granizo. No uso da irrigação, o período de quatro semanas ao redor do espigamento é o mais importante (RITCHIE et al., 1993). Polinização deficiente causa falha na fecundação de óvulos e reduz o número de grãos por espiga, deixando parte do sabugo à mostra. Períodos prolongados de déficit hídrico, associados a altas temperaturas, podem retardar a emissão dos estigmas, impedindo a polinização (NIELSEN, 2005).

Após a polinização, os grãos em início de formação (sobretudo na ponta da espiga) podem ser abortados por estresses severos, se houver forte redução no suprimento de fotossintatos. As causas podem ser déficit hídrico, altas temperaturas, baixa radiação solar ou redução drástica da área foliar. Noites quentes na polinização ou no início de formação dos grãos é outra causa provável, por reduzir a quantidade de fotossintatos disponíveis por unidade de graus-dia acumulada (NIELSEN, 2005).

De uma maneira geral, estudar, identificar e caracterizar os eventos fenológicos permite identificar todo desenvolvimento das plantas, a fim de estabelecer relações com as condições do ambiente (clima, em particular), sob diferentes ambientes (anos, épocas ou locais). Com isto, torna-se possível avaliar e descrever com precisão o impacto de eventuais fenômenos adversos (BERGAMASCHI; MATZENAUER, 2014).

### 3.1.3 Cultivo do milho no Brasil e em Santa Catarina

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais cereais cultivados no mundo e é amplamente utilizado no Brasil (ABRAMILHO, 2011). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, sendo superado apenas pelos Estados Unidos (EUA) e pela China, que produzem 350 e 220 milhões de toneladas de grãos, respectivamente (CONAB, 2015).

Anualmente, é cultivado no Brasil, aproximadamente 17,5 milhões de hectares de milho, sendo 5,5 na primeira e 12 milhões na segunda safra (CONAB, 2018). Essa alta produtividade ocorre devido a sua capacidade de adaptação às diferentes condições ambientais e ao seu valor nutricional (ABRAMILHO, 2011).

O Brasil diferencia-se por produzir duas safras ao ano sem o uso de irrigação, com produção total, na última safra, de 97 milhões de toneladas, sendo a segunda safra (66,5 milhões de toneladas) superior à primeira (30,5 milhões de toneladas), como ocorre desde 2012, quando a segunda safra se tornou a mais expressiva (CONAB, 2017).

A produtividade média nacional ainda é próxima de  $5 \text{ t ha}^{-1}$ , muito inferior à de  $10 \text{ t ha}^{-1}$  obtida nos EUA. Mesmo assim, nos últimos 30 anos, a produtividade triplicou, atingindo valores iguais ou superiores a  $7,0 \text{ t ha}^{-1}$  e  $5,0 \text{ t ha}^{-1}$ , na primeira e na segunda safra, respectivamente (DUARTE; KAPES, 2015).

Na região sul, a produtividade média é de  $6,67 \text{ t ha}^{-1}$  e a estimativa de produção, na safra 2016/2017, é de 27,5 milhões de toneladas de milho, somando a primeira e a segunda safras (CONAB, 2017).

No estado de Santa Catarina, segundo estimativas da safra 2016/2017, a área plantada de milho foi de 400 mil hectares, com produção de aproximadamente 3,3

milhões de toneladas do grão. Só na região EOSC, a área plantada foi de 45,6 mil hectares com produção esperada de 360 mil toneladas (Epagri, 2017).

Ressalte-se que essa produção é atingida em ambientes muito diversos e em diferentes épocas de semeadura e sistemas de cultivo (DUARTE; KEPPE, 2015). A região EOSC, por exemplo, tem uma predominância da agricultura familiar, que ocupa 90% dos 100 mil estabelecimentos agrícolas da região (CEPA, 2010), caracterizando-se pela diversidade de variedades crioulas de milho, que são selecionadas e mantidas por agricultores familiares ao longo de muitas gerações de cultivo.

### 3.2 MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO - GM

Os organismos geneticamente modificados (OGM) são organismos cujo material genético – DNA/RNA – foi modificado por qualquer técnica de engenharia genética (BRASIL, 2005).

A transgenia é uma ferramenta de biologia molecular que tem como objetivo transferir determinados genes de um organismo para outro, visando transferir também características supostamente dependentes daqueles genes. Essas transferências gênicas podem também incorporar alterações potencialmente indesejáveis, capazes de resultar em efeitos perigosos para a saúde e para o meio ambiente (FERMENT et al., 2015). Para a produção de milho transgênico *Bt*, por exemplo, há três requisitos básicos: (i) a construção gênica, com genes de interesse e marcadores de seleção; (ii) a metodologia para a inserção do gene de interesse no genoma do milho; (iii) a regeneração *in vitro* do tecido vegetal que será transformado; (CARNEIRO et al., 2009).

Dentre os diversos métodos de transformação genética, a transformação mediada por meio da biobalística e por *Agrobacterium tumefaciens* apresentam boa eficiência e aplicabilidade (FRAME et al., 2011; WANG et al., 2009).

A biobalística é um método de transformação cujas micropartículas de metal são cobertas com o gene de interesse e aceleradas em direção às células-alvo, utilizando equipamentos conhecidos como “gen gun” ou canhão gênico (SANFORD et al., 1987; SANFORD, 1988), com velocidades suficientes para penetrar a parede celular e não causar a morte da célula. O DNA precipitado sobre as micropartículas é liberado

gradualmente dentro da célula pós-bombardeamento e integrado ao genoma (TAYLOR; FAUQUET, 2002).

Após a transferência de genes via biobalística, a regeneração de uma planta a partir da célula que foi transformada é o próximo passo para a produção de milho transgênico (DAGLA, 2012). Esta regeneração celular ocorre essencialmente em cultura de tecido, por meio da regeneração *in vitro*, onde a mais eficiente é feita por meio da embriogênese somática (ANAMI et al., 2010; AKOYI et al., 2013).

Os tecidos primários mais eficientes na regeneração de plantas por embriogênese somática são os embriões imaturos (calos) tipo II, pois estes são macios, friáveis e altamente embriogênico (SOUZA, 2015; WANG et al., 2009). Além de crescerem mais rapidamente, podem ser mantidos por um longo período e formar um grande número de embriões somáticos. Estas características favorecem a seleção e regeneração de plantas transgênicas (GONZÁLES et al., 2012).

A embriogênese somática *in vitro* é o processo pelo qual as células se regeneram, passando por diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (DODEMAN et al., 1997). De acordo com Akoyi et al. (2013), o embrião imaturo mais adequado para iniciar culturas regeneráveis de milho é o excisado da semente, num período de 11 a 18 dias após a polinização, com o comprimento entre 1,0 a 2,0 mm, aproximadamente.

As principais vantagens do bombardeamento estão relacionadas com a utilização de vetores simples e de fácil manipulação, além da possibilidade da inserção de mais de um gene de interesse nas células de maneira eficiente (WU et al., 2002; CHEN et al., 1998). Embora seja considerado um método de transformação bastante eficiente para o milho, uma possível desvantagem é a ocorrência de múltiplas cópias do gene de interesse e de complexos padrões de integração sujeitos ao silenciamento da expressão gênica, nas gerações futuras (WANG; FRAME, 2004).

Transgenes, isto é, os genes que são inseridos via técnicas de biologia molecular no milho, são constituídos basicamente da região codificadora do gene de interesse (GDI) ou do gene marcador (GMS) e de sequências reguladoras da expressão gênica. O GDI e o GMS são sequências de codificação ou ORF (Open Reading Frame) de uma determinada proteína que quando expressa define uma característica de interesse. Resistência a insetos-praga está sendo inserida em plantas transgênicas

de milho via superexpressão de genes *cry* de *B. thuringiensis* (CARNEIRO et al., 2009).

Um dos GMS mais utilizados para a produção de milho transgênico são aqueles que conferem tolerância a herbicidas. Dentre estes, os genes *bar*, isolado de *Streptomyces hygrosopicus*, e o *pat*, isolado de *Streptomyces viridochromogenes*, ambos codificando a enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT) (DE BLOCK et al., 1989), são frequentemente citados (ISHIDA et al., 2007; ZHAO et al., 2001).

Os processos utilizados na transformação genética de milho requerem a etapa de regeneração de plântulas *in vitro*. Nesses processos, os genótipos mais responsivos em cultura de tecidos são de origem temperada e sem qualquer adaptação agrônômica às nossas condições. Como esses genótipos são as principais fontes para a obtenção de eventos transgênicos, os transgenes precisarão ser transferidos para as linhagens elites de cada programa de melhoramento para a obtenção dos híbridos (CARNEIRO et al., 2009).

O método de retrocruzamento é o mais adequado quando se quer introduzir um ou poucos genes em materiais-elite, uma vez que consiste em cruzar um genitor doador, aquele que no caso possui o transgene, com um genitor recorrente, que são as linhagens elites que se deseja converter. A partir do cruzamento inicial, as progênies são selecionadas e cruzadas sequencialmente com o genitor recorrente até que se recupere o máximo do genoma recorrente, mantendo o transgene de interesse. Em um programa de retrocruzamentos, a cada geração, é recuperada, em média, a metade da constituição genética do genitor recorrente em relação à geração anterior. Assim, no primeiro ciclo de retrocruzamento, as progênies possuem, em média, 75% do genoma recorrente, no segundo, 87,5% e assim sucessivamente. Considerando que o genitor doador é, na maioria das vezes, divergente dos genitores recorrentes, são necessários até seis ciclos de retrocruzamento para a recuperação acima de 99% do genoma recorrente (CARNEIRO et al., 2009). Feito assim, os híbridos elites com os transgenes inseridos em seu genoma ficam disponíveis no mercado para uso.

O uso comercial de plantas GM é um dos marcos da agricultura nos últimos anos. Atualmente, a produção de transgênicos está distribuída em praticamente todas as regiões do planeta (GOMES; BORÉM, 2015). No entanto, cinco países concentram

91,3% do cultivo, EUA (75 milhões de ha), Brasil (50 milhões), Argentina (23,6 milhões), Canadá (13,1 milhões) e Índia (11,4 milhões) (ISAA, 2018).

No Brasil, especificamente para a cultura do milho, 15 milhões de hectares foram plantados com a cultura de milho transgênico (ISAAA, 2018). Na safra 2016/2017, as cultivares transgênicas representaram 67,93% das cultivares que fizeram parte do mercado para esta safra no Brasil (PEREIRA FILHO; BORGHI, 2016), destacando-se a biotecnologia das sementes transgênicas resistentes a insetos e tolerantes a herbicidas, ou a combinação de ambas (MIGUEL et al., 2014).

Na safra 2016/2017, de acordo com dados obtidos diretamente das empresas produtoras de sementes de milho, estava disponível no mercado 315 cultivares de milho (número abaixo das 477 cultivares oferecidas no ano passado). Dentre elas, 214 eram cultivares transgênicas e 101 eram cultivares convencionais. As cultivares transgênicas disponibilizadas no mercado nacional apresentam várias tecnologias, que são responsáveis, em grande parte, pelo controle de lagartas que atacam a cultura, tanto na parte aérea quanto subterrânea, bem como pela tolerância das plantas ao HBG/HBGA (PEREIRA FILHO; BORGHI, 2016).

Em agosto de 2017, existiam 72 eventos transgênicos registrados somente para plantas, na Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dentre os quais 44 eram para o milho, 13 para soja, 14 para o algodão, um para o feijão, um para o eucalipto e um para cana-de-açúcar (CTNBio, 2017).

A cultura do milho é aquela que mais apresenta eventos transgênicos registrados, dentre os quais estão disponíveis, na safra 2016/2017, 47 que apresentam a tecnologia VT PRO, 32 cultivares VT PRO2, 24 cultivares VT PRO3, 22 cultivares com o evento Herculex (HX ou somente H), 3 cultivares com os eventos Herculex + Roundup Ready (HR), 9 cultivares com os eventos Viptera+YildeGard+Herculex (VYH), 4 cultivares com os eventos YieldGard +Herculex + Roundup Ready (YHR), 3 cultivares com os eventos Viptera + YildeGard + Herculex + Roundup Ready (VYHR), 10 cultivares com os eventos YildeGard+Herculex (YH) e 1 cultivar com o evento YildeGard (Y) (CTNBio, 2017; PEREIRA FILHO; BORGHI, 2016).

Dentre os principais eventos transgênicos inseridos em híbridos de milho cultivados na região sul do Brasil, destacam-se os eventos: TC1507 (Herculex) e

NK603 (Roundup Ready), com transgenia para tolerância a HBG e o HBGA e resistência a insetos, principalmente da ordem das lepidópteras.

A avaliação do risco dos eventos transgênicos disponíveis no mercado brasileiro é feita pela empresa produtora do evento e a análise desta avaliação é realizada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, composta por 27 doutores, incluindo representantes do governo, da academia e da sociedade civil. Em 10 anos de existência, a CTNBio aprovou mais de 60 eventos transgênicos (45 plantas). Há apenas um registro de rejeição aos pedidos das empresas e todas as decisões da CTNBio foram polêmicas desde a sua instituição, em 2005. Como transparece ao longo desta publicação, a opinião técnica da CTNBio não reflete a opinião da comunidade científica e da sociedade como um todo (FERMENT et al., 2015).

### 3.2.1 Evento transgênico TC1507

O evento TC1507, aprovado em dezembro de 2008, contém dois transgenes: *cry1F* e *pat*. O transgene *cry1F* codifica uma delta-endotoxina (*Cry1F*) (Figura 2) letal a insetos da ordem Lepidóptera, em quanto o transgene *pat* codifica a enzima fosfinotricina-N-acetil transferase (PAT), que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio (AGBIOS, 2008).

**Figura 2.** Esquema do inserto para o milho transgênico Herculex I (TC1507). Genes inseridos: *cry1F* e *pat*, promotor ubiZM (oriundo do milho) e P35S, terminador: T35S



Fonte: Adaptado de TAKABATAKE, et al., 2010.

Essas características advêm dos genes introduzidos que codificam uma forma truncada da proteína inseticida *Cry1F*, derivada da cepa PS81I (NRRL B-18484) da bactéria *Bacillus thuringiensis var. aizawai*, e uma enzima fosfinotricina-N-acetil transferase (*pat*), que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio, também obtida de um microrganismo do solo, o *Streptomyces viridochromogenes* (AGBIOS, 2008).

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

A enzima *pat* confere tolerância a HBGA. Este herbicida é um tripeptídeo composto por dois resíduos de lalanina e um resíduo de fosfinotricina (PPT), um análogo do glutamato. O PPT é um inibidor da glutamina sintetase (GS), enzima que converte glutamato em glutamina e remove a amônia tóxica da célula. A inibição da enzima GS causa a morte da planta, devido ao efeito fitotóxico do acúmulo de amônia e ruptura dos cloroplastos podendo inibir a fotossíntese (LINDSEY, 1992).

A enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase (*pat*) realiza uma detoxificação, pois é promotora da acetilação do PPT, utilizando como co-fator acetil-coenzima 'a', fazendo com que o PPT perca a ação inibidora permitindo que as células sobrevivam mesmo em presença do herbicida (AGBIOS, 2008).

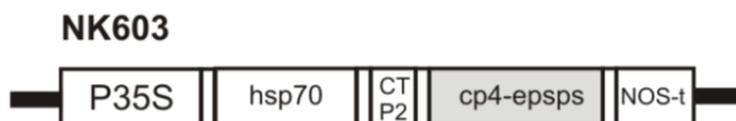
### 3.2.2 Evento transgênico NK603

O evento NK603, aprovado em setembro de 2008, contém o transgene *cp4epsps*, responsável pela expressão da proteína CP4-EPSPS, que confere tolerância ao herbicida *Roundup Ready* (AGBIOS, 2008).

O gene *cp4epsps* é oriundo da bactéria *Agrobacterium sp. cepa CP4* (Figura 3) e é responsável pela expressão da proteína CP4-EPSPS (CP4-5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase), que determina a expressão da característica de tolerância ao HBG. A proteína CP4-EPSPS, expressa nas plantas geneticamente modificadas tolerantes ao HBG, é funcionalmente idêntica à proteína EPSPS endógena de plantas (PADGETTE et al., 1993).

A enzima CP4 EPSPS contém o gene CP4 EPSPS sob o controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor melhorada (CaMV) (Kay et al. 1985). O íntron Zm $hsp70$  da proteína de choque térmico de milho  $hsp70$  foi incluído para estabilizar o nível de transcrição (Rochester et al. 1986) e a sequência líder do peptídeo de trânsito de cloroplasto CTP2 foi usada para dirigir a proteína CP4 EPSPS ao cloroplasto. A região não traduzida NOS 3 'do gene da nopalina-sintetase de T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* foi utilizada para fornecer o sinal de poliadenilação.

**Figura 3.** Esquema do inserto para o milho transgênico, evento NK603 *RR* Roundup Ready. Promotor: P35S, terminador: NOS-t.



Fonte: Adaptado de TAKABATAKE, et al., 2010.

Em plantas convencionais, o HBG se liga à enzima EPSPS e bloqueia a biossíntese do 5-hidroxisiquimato-3-fosfato, impedindo a formação de aminoácidos aromáticos e metabólitos secundários (HASLAM, 1997). Nas plantas geneticamente modificadas tolerantes ao HBG, como o milho NK603, os aminoácidos aromáticos e outros metabólitos necessários para o desenvolvimento das plantas continuam sendo produzidos pela atividade da proteína CP4-EPSPS (BORÉM, 2005).

### 3.3 VARIEDADES CRIOULAS DE MILHO

Alguns autores diferenciam variedades tradicionais, locais e crioulas, com base na sua origem (autóctone ou alóctone), na autoria das práticas de seleção (melhoristas ou agricultores), no número de gerações de cultivo aos cuidados da mesma família, no conhecimento tradicional associado à conservação *on farm*, na presença de fluxo gênico não intencional ou cruzamentos intencionais com germoplasma melhorado, etc. (MACHADO et al., 2008; VILLA et al., 2006; LOUETTE, 2000; LOUETTE, 1997; BELLON; BRUSH, 1994).

A definição mais abrangente encontrada é a de Zeven (1998) ao definir que “uma variedade crioula possui uma elevada capacidade de tolerar estresses bióticos e abióticos, resultando em estabilidade de produção e um nível de rendimento intermediário com baixa utilização de insumos”.

Segundo Bellon e Brush (1994) e Louette (1997), as variedades crioulas são derivadas de variedades antigas melhoradas e cultivadas por muitas gerações no mesmo agroecossistema, enquanto as variedades locais são variedades antigas, que ainda não passaram por um processo de melhoramento formal.

Villa et al. (2006), por sua vez, não fazem distinção entre as variedades locais e crioulas e classificam apenas as crioulas como as variedades que não passaram por melhoramento formal. Segundo a concepção de Louette (2000), o elevado fluxo

gênico entre populações de milho (por ser alógama) e as trocas de sementes entre agricultores podem fazer com que variedades se comportem como metapopulações, tornando uma tarefa difícil distinguir geneticamente as variedades locais das crioulas. Outra dificuldade encontrada para a definição das variedades dos agricultores tem relação com o tempo em que a mesma foi introduzida no agroecossistema, para que se considere como uma variedade crioula ou local, como uma variedade exótica ou não.

Os termos em definição levam em conta também os aspectos sociais e culturais envolvidos, o conhecimento tradicional associado a estas variedades e a importância dos agricultores, conservadores e melhoristas por natureza, chamados agricultores nodais (SUBEDI et al., 2007).

Louette et al. (1997) consideram a relação das variedades locais de milho com os agricultores que as mantêm e definem variedade local como um lote de sementes que é identificado pelos agricultores e mantido na família pelo menos por uma geração de agricultores, considerando a adaptação como uma das características principais.

Outros autores como Machado et al. (2008) e Berg et al. (2009) definem o termo variedade local, como aquelas populações sob contínuo manejo dos agricultores, desenvolvida a partir de ciclos dinâmicos de cultivo e seleção dentro de ambientes e contextos socioeconômicos específicos, sendo necessários, pelo menos, cinco ciclos de cultivo para que uma variedade se torne local.

A origem das variedades locais de milho ocorre pela ação direta de sucessivas gerações de agricultores familiares, por meio do cruzamento de materiais antigos e, até mesmo, recentes ou, simplesmente, pela seleção intrapopulacional de plantas mais adaptadas aos seus sistemas de cultivo (FERREIRA et al., 2009).

As variedades locais e crioulas fazem parte da história de muitas famílias e vêm sendo cultivadas e selecionadas por gerações de agricultores, para sistemas de baixo (ou nenhum) uso de insumos, adquirindo características próprias de adaptação ao agroecossistema local (BELLON; BRUSCH, 1994). É provável que a não utilização de adubos e a sua utilização em consórcios tenham propiciado a adaptação dessas variedades e, conseqüentemente, a causa da conservação das mesmas (SOARES, 1998).

Ogliari e Alves (2007) ressaltam que se forem manejadas em ambientes particulares ao longo do tempo, as variedades locais tornam-se fontes de genes e de combinações gênicas valiosas, servindo como reservatório genético e matéria prima essencial para o desenvolvimento de novas cultivares melhoradas.

No entanto, a substituição de variedades locais pelas cultivares híbridas convencionais e transgênicas promovem a substituição e perda de alelo e combinações gênicas especiais, que por sua vez, contribui para a erosão genética. Atrelado à erosão genética está a perda do conhecimento tradicional adquirido pelos agricultores ao longo dos anos, como habilidades de manejo e conhecimento de propriedades medicinais específicas das variedades tradicionais (BOEF, 2007).

O conhecimento tradicional dos agricultores e suas habilidades são cruciais para o manejo e conservação dessas variedades. É o que considera o Decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016, artigo 12º, ao definir o conhecimento tradicional associado como “toda informação ou prática individual ou coletiva de comunidade indígena ou de comunidade local, com valor real ou potencial, associada ao patrimônio genético”. Portanto, preservar este conhecimento passa a ser essencial para a conservação de variedades crioulas.

Muitas famílias produtoras de milho ainda conservam variedades crioulas, utilizadas principalmente para o uso na propriedade. As variedades mais antigas estão adaptadas às condições edafoclimáticas e de manejo e em processo contínuo de evolução nesses agroecossistemas (OGLIARI et al, 2013).

A utilização de materiais genéticos adaptados às condições locais é, acima de tudo, uma atividade voltada à autonomia do pequeno produtor rural. Por meio do melhoramento genético e da seleção de materiais de qualidade e adaptados à realidade local, torna-se possível o aumento da produtividade das lavouras e a redução da incidência de doenças (SASSE, 2008).

Para o contexto deste estudo, é desnecessária a distinção desses três termos (variedades locais, crioulas e tradicionais). Importa o fato de as variedades serem relevantes para a segurança alimentar das comunidades rurais que as conservam e para os programas de melhoramento genético que dependem desses recursos para o desenvolvimento das novas cultivares. Sua maior contribuição local de médio e longo prazo está no conjunto das variedades conservadas *on farm*, pois em conjunto

proporcionam a geração continuada de nova diversidade. Focando nessa lógica, a diversidade de variedades conservadas *on farm* em uma mesma região reúne um conjunto de populações que são conservadas, selecionadas, multiplicadas e usadas por agricultores tradicionais ao longo de vários anos de cultivo. São distintas geograficamente, em decorrência do manejo, do uso e da seleção dos agricultores, bem como da pressão de seleção particular à cada agroecossistema. Com o passar dos anos de cultivo em uma mesma área, tornam-se diversas em sua composição genética e adaptadas às condições bióticas e abióticas particulares às áreas de cultivo. O tempo de cultivo em uma mesma área é um componente importante da evolução dessa diversidade, pois contribui para o desenvolvimento de novas adaptações e para a incorporação do recurso genético como parte das tradições de uma comunidade (OGLIARI et al., 2013; OGLIARI; ALVES, 2007).

A variedade Rosado usada no presente estudo é uma das populações locais mais antigas do microcentro de diversidade do gênero *Zea* do EOSC, sendo cultivada há mais de 50 anos no município de Anchieta-SC. Apresenta elevados teores de carotenóides, como a luteína (KUHLEN et al., 2012), e produtividade razoável em sistema de produção orgânica (6,65 t ha<sup>-1</sup>) (OGLIARI et al., 2013). Ela tem sido cultivada em uma área isolada geograficamente, recebendo todos os cuidados para evitar o cruzamento com outras cultivares ou variedades de milho.

### 3.4 DOENÇAS FÚNGICAS: A HELMINTOSPORIOSE

A produtividade do milho é muito impactada por doenças fúngicas (ZHU et al., 2011), principalmente, as doenças foliares, que são responsáveis por reduções de 40% na produtividade de grãos (CASA; REIS, 2003). Esse impacto cresce a cada ano, especialmente em razão do incremento das áreas irrigadas e daquelas sob cultivo de safrinha, em que há ausência de rotação de cultura e ou presença de restos culturais de milho de safras passadas, levando a maior sobrevivência dos patógenos em campo (TOMAZELA et al., 2006; FANTIN; DUARTE, 2009).

Dentre essas doenças, a helmintosporiose causada pelo fungo *Exserohilum turcicum*, é considerada uma doença grave (HURNI et al. al., 2015; WANG et al., 2014; RAMATHANI et al., 2011). Sua incidência nas folhas pode reduzir de 27 a 90% o

rendimento de produção do milho (RIBEIRO et al., 2016; DING et al., 2015; RAMATHANI et al., 2011), especialmente em regiões com climas frios, em que as temperaturas variam de 20° C a 25° C, umidade relativa de 90% a 100% e baixa luminosidade (BENTOLILA et al., 1991)

O fungo *Exserohilum turcicum* (Pass.) K. J. Leonard & E. G. Suggs (sinônimos *Helminthosporium turcicum* Pass.; *Bipolaris turcica* (Pass.) Shoemaker; *Drechslera túrcica* (Pass.) Subramanian & P. C. Jain) e sua forma perfeita patogênica *Setosphaeria turcica* (Luttrell) K. J. Leonard & E. G. Suggs (sinônimo *Trichometasphaeria turcica* Luttrell) (WHITE, 2000, FREDERIKSEN; ODVODY, 2000) foram descritos pela primeira vez como *Helminthosporium turcicum*, em 1876. O fungo produz conídios de coloração verde-oliva ou marrom-escura, fusiformes, ligeiramente curvos contendo 3 a 8 septos, medindo de 20 x 105 µm, com hilo basal saliente e germinação através de tubo germinativo polar (Figura 4) (ARIYAWANSA et al., 2015; WHITE, 2000; FREDERIKSEN; ODVODY, 2000).

**Figura 4.** Esporo do fungo *Exserohilum turcicum*.



Fonte: O autor.

Os conidióforos são oliváceos, com 3 a 8 septos, medindo de 7-9 x 150-250 µm. A ocorrência da fase sexual na natureza é rara, podendo ser induzida em condições controladas, com a produção de peritécios globosos e escuros. As ascas são cilíndricas, contendo de 1 a 8 ascósporos. Os ascósporos são hialinos, triseptados, retos ou ligeiramente curvos de dimensões de 13-17 x 42-78 µm (ARIYAWANSA et al., 2015; WHITE, 2000; FREDERIKSEN; ODVODY, 2000).

As epidemias da doença originam-se desses conídios produzidos em restos de cultura ou trazidos pelo vento de outras áreas de cultivo. Restos de cultura são importantes fontes de inóculo para o desenvolvimento de epidemias, tanto que o aumento da intensidade de epidemias causadas por *E. turcicum* pode ser resultado de ampla utilização de sistemas de plantio direto (WHITE, 2000).

O tempo de sobrevivência do patógeno em restos de cultura é longo, podendo sobreviver como saprófita ou formar esporos de resistência denominados clamidósporos (LEVY; PATAKY, 1992).

Os ciclos secundários da doença são causados por conídios que são dispersos a longas distâncias pelo vento. A maior liberação de conídios dá-se após a ocorrência de chuvas, em períodos com alta umidade relativa ou orvalho, sendo que cerca de 40% deles são liberados entre 8 e 12 horas da manhã, no momento em que a luz solar provoca a seca da folhagem (LEACH et al., 1977).

Os danos causados pela doença também variam com a agressividade dos isolados que predominam na população. As epidemias podem ser severas em condições ambientais marginais, desde que predominem, nas populações, isolados com alta agressividade (LEVY, 1991).

Os sintomas típicos da doença são lesões necróticas, elípticas, medindo de 2,5 a 15 cm de comprimento (Figura 5). A coloração do tecido necrosado varia de verde-cinza a marrom. As primeiras lesões aparecem nas folhas mais velhas (COTA et al., 2013; WHITE, 2000) e o processo de infecção da helmintosporiose é ascendente, iniciando-se o aparecimento das lesões nas folhas inferiores e progredindo posteriormente para as folhas superiores (WHITE, 2000), em condições de ataque severo pode ocorrer a queima completa dos tecidos foliares.

Ataques graves de doenças foliares causam uma redução no índice de área foliar verde, número de dias com área foliar sadia e interceptação de radiação. Portanto, como os fotoassimilados são insuficientes para o enchimento dos grãos, a planta começa remobilização das reservas existentes no caule imediatamente. Mobilização de nutrientes leva ao enfraquecimento do caule. Isso faz com que ocorra a quebra do talo, favorecendo a ocorrência de doenças fúngicas (FORMENTO, 2010).

**Figura 5.** Lesão necrótica (tipo susceptível) causada por *Exserohilum turcicum* em folha de milho.



Fonte: O autor.

Diante desses graves sintomas, a helmintosporiose se tornou uma das doenças foliares do milho mais prejudiciais, sua incidência nas folhas de milho pode enfraquecer as plantas e reduzir até 50% do rendimento de produção da mesma (DING et al., 2015; ZHU et al., 2011; POLAND et al., 2011). Se a infecção ocorrer antes da floração pode causar perdas graves superiores a 50% no rendimento final (RAMATHANI et al., 2011; RAYMUNDO; HOOKER, 1981). No Brasil, epidemias esporádicas ocorrem mais frequentemente nas regiões sul e oeste, onde causam danos severos no rendimento de grãos (ESTEVES, 1989).

Por isso, um grande desafio mundial para a produção de milho é o controle desta doença fúngica (RIBEIRO et al., 2016; ZHU et al., 2011). O manejo mais eficiente para o controle de doenças na cultura envolve várias medidas, como o uso de variedades resistentes, rotação de culturas, eliminação de plantas infestantes e controle químico. Além destes, o manejo adequado para o balanço nutricional e o plantio da cultura em época adequada evitam que os períodos críticos para a produção coincidam com as condições ambientais mais favoráveis ao desenvolvimento da doença (CASELA et al., 2006).

A principal medida de controle da helmintosporiose em milho é a utilização da resistência genética, podendo ser qualitativa com ação gênica não aditiva predominante e por resistência quantitativa, advinda de genes de ação aditiva, podendo estas serem encontradas atuando separadamente ou em conjunto (FERGUSON; CARSON, 2007; OGLIARI et al., 2007; CAMPAÑA; PATAKY, 2005).

Diversos genes de resistência foram descritos como dominantes ou parcialmente dominantes para a helmintosporiose Ht1, Ht2, Ht3, HtM, HtN e HtP (SANTOS, 2016; NIEHI; FERREIRA, 2012; OGLIARI et al., 2007; CARSON, 2006; ROBBINS; WARREN, 1993), além de duas formas recessivas, ht4 e rt (OGLIARI et al., 2007; CARSON, 1995). A expressão da resistência conferida pelos genes Ht1, Ht2 e Ht3 resulta em lesões cloróticas com pouca esporulação do patógeno. O gene HtN provoca aumento do período de incubação e retardamento do início da expressão dos sintomas da doença (COTA et al., 2013).

A resistência quantitativa, ou horizontal, é amplamente empregada no controle genético da helmintosporiose, se referindo à vários genes de pequenos efeitos aditivos atuando na expressão do caráter (VIVEK et al., 2010). A expressão da resistência horizontal resulta em menor número de lesões em plantas resistentes, aumento do período de incubação e latente, redução da produção de conídios e redução da taxa de progresso da doença (CARSON, 2006).

Para a resistência à *E. turcicum*, genes de efeitos não-aditivos, advindas de genes sob efeitos de dominância e, ou epistasia, têm se mostrado importantes (NIEHI; FERREIRA, 2012). Neste contexto, a resistência quantitativa à helmintosporiose pode ser caracterizada também pela ação conjunta de genes aditivos e não-aditivos (VIEIRA et al., 2009; OGLIARI et al., 2007;). Por outro lado, a resistência quantitativa com o efeito da ação aditiva tem a vantagem de apresentar controle parcial contra praticamente todas as raças, se mostrando importante em alguns estudos de herança da resistência à helmintosporiose (VIVEK et al., 2010; CARSON, 1995;). No entanto, a ação dos efeitos aditivos e não-aditivos associados ao caráter estudado também se mostraram de grande importância (VIEIRA et al., 2009; OGLIARI et al., 2007; WELZ; GEIGER, 2000).

### 3.5 FLUXO GÊNICO ENTRE MILHOS GM E NGM

O fluxo gênico é a transferência de genes ou alelos de uma população para outra, podendo levar a alterações do material genético (SHANG et al., 2015). Ele pode ocorrer em razão da disseminação do pólen, da mistura de sementes ou da presença de plantas voluntárias, provenientes de cultivos anteriores nas lavouras. Todas essas

três fontes podem ser importantes agentes de fluxo gênico, no entanto, o controle do pólen é o que requer maiores cuidados (RAMALHO; SILVA, 2004).

No caso específico do milho, já que este é caracterizado por ter polinização preferencialmente pelo vento (MARCEAU et al., 2011; BALTAZAR et al., 2005), ventos verticais podem levantar grãos de pólen em camadas de ar mais altas e, assim, transportá-los por longas distâncias, ou seja, várias centenas de metros ou quilômetros (TACKENBERG et al., 2003).

Além da distância, outros fatores que influenciam o cruzamento via pólen são: a viabilidade do pólen e longevidade; a fertilidade ou esterilidade masculina; a direção do vento e velocidade; tamanho, forma e orientação dos campos da fonte de pólen e do destinatário; sincronia na floração; topografia; vegetação que cresce entre a fonte de pólen e campos de receptores de pólen (PALAUDELMÀS et al., 2012; LUNA et al., 2001); e condições meteorológicas, pois o lançamento de pólen é prejudicado quando as plantas estão molhadas e úmidas, e é favorecido em condições secas e quentes (MARCEAU et al., 2011).

Apesar de todos estes fatores influenciarem no cruzamento via pólen, com o avanço das áreas cultivadas com milho transgênico no Brasil, um grande problema surgiu, a contaminação de lavouras NGM por lavouras GM através do cruzamento via pólen. Tal fato tem contribuído para o aumento da demanda por pesquisas que estimem o fluxo gênico na espécie, com vistas à manutenção da pureza genética, em cultivares durante os processos de produção de grãos e sementes (NASCIMENTO et al., 2012).

Diversas pesquisas sobre polinização e fluxo gênico em milho já foram realizadas, porém, poucas se dedicaram ao milho transgênico, nas condições de cultivo do Brasil. Para minimizar cruzamentos indesejados e manter a pureza genética, alguns países recomendam a produção de transgênicos e milho convencional utilizando distâncias de isolamento prescritas (NASCIMENTO et al., 2012; VAN HEERWAARDEN et al., 2012).

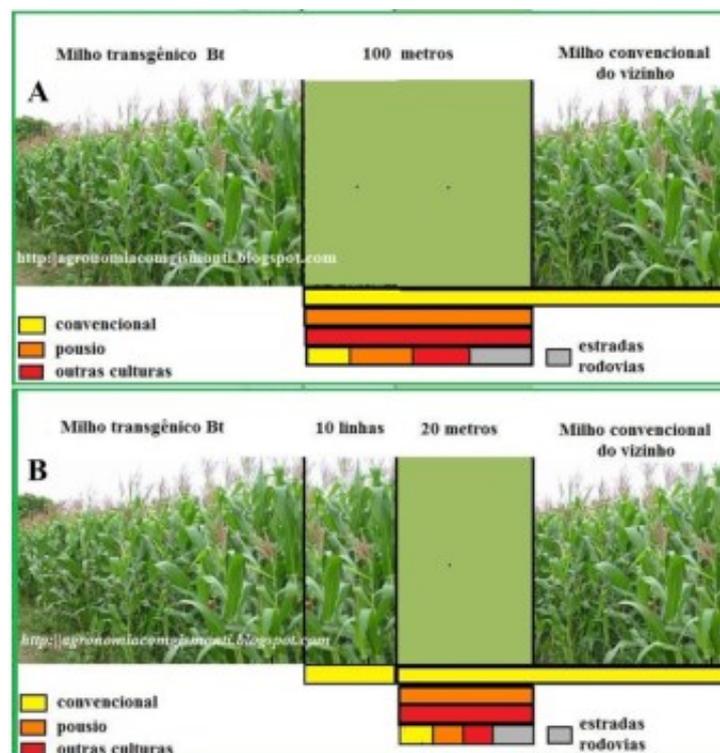
No Brasil, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) estabeleceu distância mínimas entre lavouras GM e NGM para a coexistência de ambos os sistemas de produção. Assim, para as liberações comerciais, conforme Resolução Normativa número 4 (BRASIL, 2007), a distância entre lavouras GM e

convencionais vizinhas deve ser igual ou superior a 100 m ou, alternativamente, 20 m, desde que acrescida de bordadura com, no mínimo, dez fileiras de plantas de milho convencional de porte e ciclo vegetativo similar ao milho transgênico (Figura 6).

Apesar do estabelecimento da norma de isolamento entre lavouras de milho convencional e transgênico, há discussões a respeito do fato de que o exigido hoje não seja suficiente para assegurar a coexistência entre plantios convencionais e transgênicos sem a contaminação dos primeiros, pela ocorrência do fluxo gênico (NASCIMENTO et al., 2012).

Diversos estudos foram realizados com este intuito, como por exemplo, o de Baltazar et al. (2015), que observaram valores de cruzamentos mais elevados (12,9%) perto da fonte de pólen a 1 m de distância. Os níveis de cruzamento diminuíram acentuadamente para 4,6, 2,7, 1,4, 1,0, 0,9, 0,5 e 0,5%, com a distância entre a fonte de pólen aumentada para 2, 4, 8, 12, 16, 20, e 25 m, respectivamente, confirmando o que é estabelecido na legislação.

**Figura 6.** Área de distância entre milhos transgênico e milho não transgênico.



Fonte: <http://agronomiacomgismonti.blogspot.com.br/2010/08/normas-para-o-plantio-de-milhos.html>

Distâncias superiores a valores de cruzamento de 20 m em todos os locais foram inferiores a 1%, o mesmo confirmado por NASCIMENTO et al. (2012). Porém, o isolamento de 20 m, com dez fileiras de bordadura, não é suficiente para garantir taxas de fecundação cruzada inferiores a 1%. Em média, 82% da fecundação cruzada ocorre nos primeiros 30 m.

No entanto, e particularmente no caso de pequenos campos de menos de 0,5 ha ou de campos compridos, estreitos que estão localizados a favor do vento a partir de um campo de milho GM maior, a distância de isolamento pode precisar ser alargada a 50 m ou mais (HUSKEN et al., 2007; MESSÉAN et al., 2006). Esse estudo demonstrou que a duplicação do tamanho do campo doador de pólen produziu um aumento aproximado no teor de GM no campo do receptor de pólen de 7% (PALAUDELMÀS et al., 2012).

Todos estes resultados indicam o potencial de fluxo gênico das culturas transgênicas às culturas não-transgênicas, a partir do qual os impactos ambientais indesejáveis se tornam uma grande preocupação com a comercialização de variedades transgênicas em todo o mundo (WANG et al., 2016).

Trazendo este contexto para a realidade do EOSC, percebe-se que poucos estudos têm chamado a atenção para o risco, até então negligenciado, do fluxo de genes em sistema de sementes tradicional, que é típico da agricultura familiar.

Através do Censo da Diversidade realizado pelo NEABio, verificou-se que nos municípios de Anchieta e Guaraciaba pertencentes a região EOSC, existe um sistema bimodal de produção, onde variedades crioulas e híbridos comerciais não transgênicos e transgênicos são cultivados pelo mesmo agricultor (SILVA et al., 2016b).

Dos agricultores entrevistados no censo 24% plantam unicamente milho de variedades crioulas. No entanto, 109 (76%) plantam milho de variedades crioulas e comerciais, destes 34% plantam híbridos geneticamente modificados (GM) e cinco entrevistados não souberam dizer se era ou não GM. A área total plantada com milho comercial foi de 877 hectares, com uma média de 5,35 hectares por propriedade (Anchieta com 4,24 hectares e Guaraciaba com 6,59 hectares). A área total plantada com variedades crioulas foi de 62 hectares e a média foi de 4.517 m<sup>2</sup> (ANDRÉ, 2016).

No mesmo estudo, foi identificado que 70% das áreas destinadas ao cultivo das variedades crioulas estão sendo cultivadas a uma distância menor ou igual a 100 metros das lavouras de milho GM (SILVA et al., 2016b). A utilização desta pequena distância fere o que está disposto no artigo 2 da Resolução Normativa nº 4, publicada pela CTNBio. Cordeiro et al. (2008) relatam esta problemática, onde os mesmos analisaram a distribuição espacial de campos de milho em sistemas agrícolas de pequena escala no Oeste de Santa Catarina, e sugeriram que não há possibilidade de coexistência entre os dois sistemas de cultivos, na região e em regiões com características semelhantes.

O cultivo de milho GM, em sistemas tradicionais, pode criar situações que não foram consideradas nas avaliações de risco de biossegurança, realizadas em sistemas agrícolas. Além disso, no caso de contaminações de variedades crioulas por cultivares GM, as normas de propriedade intelectual podem proibir a utilização da variedade crioula contaminada por parte dos agricultores que não compraram as sementes GM e não assinaram um acordo com os proprietários dos transgênicos (BELLON; BERTHAUD, 2004).

O estabelecimento de normas efetivas para a coexistência de milhos GM e NGM depende de um completo entendimento de todas as vias possíveis de contaminação. Discutir normas de coexistência, baseadas apenas em distância entre lavouras não evitará a contaminação entre essas variedades. A falta deste conhecimento e a ausência de evidências sobre os riscos ambientais, sociais, biológicos e econômicos de uma eminente contaminação pressupõem que a liberação dos milhos GM no Brasil feriu o Princípio da Precaução, bem como os Direitos dos Agricultores (COSTA, 2013).

Os riscos de danos ao ecossistema agrícola da região EOSC são imprevisíveis, considerando que durante o Censo da Diversidade também foi constatada a presença de parentes silvestres do milho. De um total de 305 agricultores entrevistados, 136 manejam ou cultivam populações de parentes silvestres, em ambos os municípios. A ocorrência de populações de teosintos em regiões geográficas com características edafoclimáticas, de relevo e altitude distintos daquelas encontradas em seu centro de origem é relevante sob o ponto de vista da conservação, à medida que se amplia o conhecimento sobre sua dispersão, distribuição, diversidade e usos (SILVA, 2015b).

No entanto, evidências de fluxo gênico com formações de híbridos naturais entre milho e teosinto, foram apontados pelos agricultores. Estes relatos são baseados em observações de campo de alterações de características morfológicas. Este processo é favorecido pela ocorrência de populações espontâneas em áreas cultivadas com milho, pela proximidade das áreas de pastagem às lavouras de milho e pela coincidência na época de plantio (SILVA, 2015b).

O fluxo gênico entre ambos deve ser analisado sob o ponto de vista da biossegurança de organismos geneticamente modificados, em função do crescimento das lavouras de milho transgênico na região, enquanto contaminante dos teosintos de ocorrência espontânea. Tais fatos comprovam a inadequação de normas brasileiras de biossegurança para a coexistência entre milho transgênico e não transgênico, que são baseadas apenas na recomendação de distâncias mínimas entre milho geneticamente modificado e não geneticamente modificado (SILVA, 2015b; COSTA, 2013), uma vez que o teosinto pode estar sendo a espécie-ponte que viabiliza esse fluxo gênico indesejável (SILVA, 2015b).

Outa questão primordial a ser discutida é que a maioria dos pequenos agricultores recuperam sementes da colheita anterior, e frequentemente adquirem sementes de outros agricultores através de um sistema tradicional bem estruturado de regras, expectativas e práticas baseadas na família e redes sociais locais (CHAMBERS; BRUSH, 2010). Este sistema tradicional liga de forma eficaz todas as populações de milho individuais ou lotes de sementes, em uma única metapopulação (LOUETTE, 2000).

A aquisição de sementes, denotado aqui como fluxo de sementes, é particularmente importante, pois o destino de um transgene que escapou ou contaminou uma planta NGM está sujeito aos efeitos a longo prazo dos processos genéticos populacionais como a deriva genética, o fluxo de genes e a seleção (VAN HEERWAARDEN et al., 2010).

Trabalhos anteriores distinguiram duas formas de fluxo de sementes (SMALE et al., 1999): a substituição (ou seja, o plantio de um campo exclusivamente com sementes obtidas a partir de outro agricultor) e a mistura (ou seja, o plantio de um campo com uma mistura de sementes guardadas da colheita anterior do agricultor e de sementes obtidas de outro agricultor) (VAN HEERWAARDEN et al., 2010).

A substituição é a forma mais comum de fluxo de sementes e, principalmente, ocorre em resposta a completar a perda de sementes ou o plantio quando pela primeira vez. A mistura é feita em resposta à perda parcial da semente ou como uma forma de experimentação (SMALÉ et al., 1999). Tanto a mistura quanto a substituição podem envolver semente de dentro ou fora da comunidade agrícola, embora a primeira seja muito mais comum (BELLON et al., 2011).

De uma forma geral, tanto o fluxo gênico e em seguida o fluxo de sementes são fontes reais de contaminação entre lavouras NGM e GM, podendo trazer riscos as populações NGM cultivadas pelos pequenos agricultores, que reaproveitam as sementes colhidas para plantarem na próxima safra, levando assim a contaminação de suas sementes para um próximo ciclo. Para isso medidas devem ser tomadas e estudos devem se empenhar em compreender estes fatos.

Diante do atual contexto agrícola no país, as normas brasileiras de coexistência não dialogam com instrumentos internacionais como o “*Princípio da Precaução*” da CDB e os “*Direitos dos Agricultores*”, previstos no âmbito do Tratado Internacional sobre Recursos Fitogenéticos para a Agricultura e Alimentação e o Protocolo de Cartagena, no contexto da CDB. Portanto, torna-se fundamental o desenvolvimento de políticas públicas, bem como o estabelecimento de medidas capazes de garantir a conservação *in situ-on farm* da diversidade dos recursos genéticos de milho manejados por agricultores, bem como viabilizar a coexistência entre os sistemas de produção de milho no Brasil (Cordeiro et al., 2008).

### **3.5.1 Efeito sobre organismos não alvo**

O cultivo de plantas GM levou os cientistas a buscarem uma maior compreensão do seu impacto direto e indireto sobre o ecossistema natural e agrícola. Enquanto as plantas GM foram assumidas como seguras em termos de saúde humana e ambiental, imprevistos foram observados no campo, variando de acordo com as características genéticas das plantas modificadas, no espaço e no tempo, como um resultado da rede complexa de interações de funcionamento nos ecossistemas de superfície e subterrâneos (WOLFENBARGER; PHIFER, 2000).

Além dos riscos do efeito direto do fluxo de genes entre plantas GM e NGM, uma gama de estudos tem avaliado os impactos indiretos sobre organismos não alvos, como o caso clássico das lagartas das borboletas monarcas (*Danaus plexippus*), no México, que foram criadas em folhas de amendoim, sendo alimentadas com pólen de milho *Bt* e estas lagartas comeram menos, cresceram mais devagar e sofreram maior mortalidade do que as lagartas criadas com alimentação de pólen de milho NGM ou folhas sem pólen (LOSEY et al., 1999)

Outro risco assumido são as possíveis alterações na associação entre plantas e microorganismos do solo. O que sabemos, é que as proteínas *Bt* podem estar presentes no solo e em cursos d'água através de exsudatos radiculares, decomposição de matéria vegetal e / ou deposição de pólen (Cheeke et al., 2012), onde podem permanecer biologicamente ativo durante vários meses (Zwahlen et al., 2003).

O primeiro estudo sobre exudatos na rizosfera de plantas transgênicas foi realizado por Saxena et al. (1999). Os autores observaram que as toxinas inseticidas *Bt* podem permanecer ativas no solo, onde se ligam a argila e ácidos húmicos, mantendo suas propriedades inseticidas e sendo protegidas contra a degradação por microorganismos por até 234 dias.

Em outro estudo realizado por Wolfenbarger e Phifer (2000), observaram a diminuição da atividade bacteriana na rizosfera, que acarreta na redução da taxa de decomposição dos restos culturais e dos níveis de carbono e nitrogênio, afetando a fertilidade do solo, gerando um decréscimo da produtividade dos cultivos e da diversidade dos microorganismos do solo.

Outros estudos observaram a redução de fungos micorrízicos arbusculares em cultivos de milho contendo o transgene *cry* (CHEEKE et al., 2014; 2012); a redução na comunidade de bactérias fixadoras de nitrogênio em solo com cultivo de milho transgênico que contém o *Cry1F* (COTTA et al., 2014.); e a redução da comunidade microbiana da rizosfera de cultivo de milho com *Cry1Ab* (VELASCO et al., 2013)

Com base nessa premissa, vários autores têm sugerido que modificações genéticas de plantas podem modificar a biodiversidade da rizosfera e, possivelmente, o impacto de seu funcionamento (HANULLA et al., 2012; SAXENA; STOTZKY, 2000).

Por isso, os microrganismos têm sido amplamente utilizados para determinar os possíveis efeitos de plantas GM no ambiente do solo.

Outros efeitos indiretos causados pelos transgênicos podem ser observados em microrganismos endófitos, que são usados como organismos não alvo para avaliar os efeitos indiretos causados pelos transgênicos (CHEEKE et al., 2014; 2012, ANDREOTE et al., 2009). Estes microrganismos colonizam o interior de órgãos e tecidos vegetais sem causar sintomas visíveis, estabelecendo uma íntima associação simbiótica com seu hospedeiro, tornando as plantas mais resistentes a ambientes com estresse e recebendo em troca nutrientes e proteção (CONTI et al., 2012; PEIXOTO et al., 2002).

Götz et al. (2006) detectaram desvios significativos na diversidade de fungos endófitos, comparando clones de batatas transgênicas e seu equivalente convencional. Em outro estudo realizado por Silva et al. (2016a), avaliando a comunidade de fungos e bactérias endofíticos em folhas de milho, os autores observaram mudanças na estrutura das comunidades dos microorganismos fúngicos em híbridos isogênicos de milho portadores do evento transgênico TC1507 (transgenes *cry1F* e *pat*) combinado ao evento NK603 (transgene *cp4epsps*), em relação ao híbrido isogênico convencional e à uma das variedades crioulas mais antigas do EOSC.

Os autores aprofundaram ainda mais esta questão mediante coleta de pólen dos híbridos NGM, Hx e Hxrr e subsequente polinização em plantas de milho crioulo (Rosado) durante duas gerações, a fim de simular a ocorrência de fluxo gênico reincidente (introgressões) e, assim, gerar as populações de milho crioulo contendo 25, 50 e 75% da composição genética de cada híbrido, separadamente (SILVA, 2015). Os resultados obtidos constataram mudanças na diversidade da comunidade de fungos endofíticos das folhas de milho quando estavam em lavouras de milho portadoras dos eventos transgênicos TC1507 e NK603, em relação a lavouras com milho crioulo ou convencional (NGM) (SILVA et al., 2016a). Nesse estudo, concluiu-se ainda que a estrutura de comunidade de fungos endofíticos sofreu maiores alterações quando as introgressões (cruzamentos) eram provenientes do híbrido com dois eventos transgênicos (Hxrr) (SILVA, 2015).

De uma maneira geral, esses estudos mostram que os efeitos dos transgenes sobre organismos não alvos, sejam eles insetos, microorganismos da rizosfera ou foliares, causam prejuízos consideráveis a biota dos agroecossistemas em estudo, o que reforça a necessidade de mais estudos envolvendo as interações estabelecidas entre microorganismos, insetos, plantas e transgenes.

### 3.5.2 Efeitos indiretos dos transgenes sobre doenças fúngicas

Estudos que abordem os efeitos indiretos dos transgênicos na comunidade de microrganismos patogênicos aos cultivos são escassos, alguns poucos estudaram os efeitos da transgenia sobre as interações de resistência do milho a fungos patogênicos do gênero *Fusarium* (CLEMENTS et al., 2003; GATCH; MUNKVOLD, 2002; MUNKVOLD; HELLMICH, 1999; MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; MUNKVOLD et al., 1997).

Gatch e Munkvold (2002), avaliando híbridos isogênicos de milho resistentes a lagartas da ordem das lepdópteras por meio de eventos distintos Bt176 KnockOut, Bt11 (Yeldgard), MON810 (Yeldgard), DBT418 (BtXtra), CBH351 (StarLink) e suas versões não transgênicas, observaram que os transgênicos apresentam maior nível de infecção no colmo de milho por *Fusarium graminearum* do que os não transgênicos.

Munkvold e Hellmich (1999), Munkvold e Desjardins (1997), Munkvold et al. (1997) e Clements et al. (2003), avaliando espigas de milho, contendo grãos infectados por fungos do gênero *Fusarium*, oriundo de áreas com ataque da broca *Ostrinia nubilalis*, também constataram uma menor ocorrência de infecção das espigas do híbrido não transgênico, em comparação ao transgênico portador do transgene *Cry1Ab*. Em contraponto, é relevante destacar um terceiro trabalho, realizado por Kmoch et al. (2012), onde os autores mostraram a ausência de efeitos do transgene *Cry1Ab* sobre a infecção de grãos de milho causada por *Fusarium*.

Esses poucos estudos mostram que os efeitos dos transgenes sobre as interações patógeno-hospedeiro ainda são raras, conflitantes ou, no mínimo, insuficientes para se chegar a um consenso sobre prejuízos, benefícios ou neutralidade para a reação da planta frente aos organismos com os quais interage.

Isso reforça a necessidade de mais estudos envolvendo as interações estabelecidas entre patógenos, plantas e transgenes.

## REFERÊNCIAS

- ABRAMILHO - Associação Brasileira dos produtores de milho. Área para milho e soja deve crescer. 2011. Disponível em: <<http://www.abramilho.org.br/noticias.php?cod=1601>>. Acessado em: 16 de janeiro de 2016.
- AGBIOS. **Information on GM Approved Products (2008)**. Disponível em: <<http://www.agbios.com/dbase.php>>. Acesso em: 2 Mai. 2015.
- AKOYI, J.; MGUTU, A.J.; MACHUKA, J.; VAN LIJSEBETTENS, M.; TARACHA, C.; ANAMI, S.E. Dicamba Growth Regulator Promotes Genotype Independent Somatic Embryo genesis from Immature Zygotic Embryos of Tropical Maize. **Inbred Lines**, v.7, p.677-689, 2013.
- ANAMI, S. E.; MGUTU, A.J.; TARACHA, C.; COUSSENS, G.; KARIMI, M.; HILSON, P.; VAN LIJSEBETTENS, M.; MACHUKA, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration of tropical maize genotypes. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, p.285-295, 2010.
- ANDREOTE, F.D.; ROSSETTO, P.B.; MENDES, R.; AVILA, L.A.; LABATE, C.A.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Bacterial community in the rhizosphere and rhizoplane of wild type and transgenic eucalyptus. **World J. Microb. Biot.**, 25:1065–1073, 2009.
- ARIYAWANSA, H.A.; THAMBUGALA, K.M.; MANAMGODA, D.S.; JAYAWARDENA, R.; CAMPORESI, E.; BOONMEE, S.; WANASINGHE, D.N.; PHOOKAMSAK, R.; HONGSANAN, S.; SINGTRIPOP, C.; CHUKEATIROTE, E.; KANG, J.; GARETH JONES, E. B.; HYDE, K.D. Towards a natural classification and backbone tree for *Pleiosporaceae*. **Fungal Diversity**, 71:85–139, 2015.
- BALTAZAR, B.M.; CASTRO ESPINOZA, L.; ESPINOZA BANDA, A.; DE LA FUENTE MARTÍNEZ, J.M.; GARZÓN TIZNADO, J.A.; GONZÁLEZ GARCÍA, J. Pollen-Mediated Gene Flow in Maize: Implications for Isolation Requirements and Coexistence in Mexico, the Center of Origin of Maize. **PLoS ONE** 10(7): e0131549, 2015.
- BALTAZAR, M.B.; SANCHEZ-GONZALEZ, J.J.; DE LA CRUZ-LARIOS, L.; SCHOPER, J. Pollination between maize and teosinte: an important determinant of gene flow in Mexico. **Theor. Appl. Genet.**, 110:519–526, 2005.
- BELLON, M.R.; BRUSH, S.B. Keepers of maize in Chiapas, México. **Economic Botany**, v. 48, n. 2, p. 196-209, 1994.

BELLON, M.R.; HODSON, D.; HELLIN, J. Assessing the vulnerability of traditional maize seed systems in Mexico to climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 13432–13437, 2011.

BELLON, M.R.; BRUSCH, S.B. Keepers of maize in Chiapas. **Economic Botany**, v.48, p.196-209, 1994.

BENTOLILA, S.; GUITTON, C.; BOUVET, N.; SAILAND, A.; NYKAZA, S. Identification of RFLP marker tightly linked to the Ht1 gene in maize. **Theor. Appl. Genet.**, 82: 393–398, 1991.

BERG, T. Landraces and folk varieties: a conceptual reappraisal of terminology. **Euphytica**, 166:423-430, 2009.

BERGAMASCHI, H. O clima como fator determinante da fenologia das plantas. In: REGO, G. M.; NEGRELLE, R. R. B.; MORELLATO, L. P. C. **Fenologia: ferramenta para conservação, melhoramento e manejo de recursos vegetais arbóreos**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2007.

BERGAMASCHI, H.; MATZENAUER, R. **O milho e o clima**. Porto Alegre: Emater-Ascar, 2014. 84 p.

BOEF, W. S.; THIJSSSEN, M.; OGLIARI, J.B.; STHAPIT, B. **Biodiversidade e Agricultura: fortalecendo o manejo comunitário**. Porto Alegre: L&PM, 2007. v. 1. 271p.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 2001. 300 p.

BORÉM, A. Variedades transgênicas e meio ambiente. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 34, p. 91-99, 2005.

BRASIL. **Decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016**. Regulamenta a Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade, Brasília, DF, 12 maio 2016.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Resolução normativa nº 04, de 16 de agosto de 2007. Dispõe sobre as distâncias mínimas entre cultivos comerciais de milho geneticamente modificado e não geneticamente modificado, visando à coexistência entre os sistemas de produção. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 23 ago. 2007. Seção 1, p.19.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005**. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/11992.html> . Acesso em: 20 out. 2016.

BUCCHINI, L.; GOLDMAN, L.R. Starlink corn: a risk analysis. **Environmental health perspectives**, 110: 5, 2002.

CAMPAÑA, A.; PATAKY, J. K. Frequency of the Ht1 gene in populations of sweet corn selected for resistance to *Exserohilum turcicum* race 1. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, p. 85- 91, 2005.

CARNEIRO, A.A.; GUIMARÃES, C.T.; VALICENTE, F.H.; WAQUIL, J.M.; VASCONCELOS, M.J.V.; CARNEIRO, N.P.; MENDES, S.M. Milho Bt: Teoria e Prática da Produção de Plantas Transgênicas Resistentes a Insetos-Praga. **Circular Técnica**, Sete Lagoas-MG, n.135, dez. 2009.

CARSON, M. L. Response of a maize synthetic to selection for components of partial resistance to *Exserohilum turcicum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, p. 910-914, 2006.

CARSON, M.L. A new gene in maize conferring the chlorotic halo reaction to infection by *Exserohilum turcicum*. **Plant Disease**, v. 79, p. 717-720, 1995.

CASA, R.T.; REIS, E.M. Doenças na cultura do milho. In: Fancelli AL & Dourado Neto D (Eds.) **Milho: estratégia de manejo para alta produtividade**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2003. p. 1-18.

CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S.; PINTO, N.F.J.A. **Doenças foliares**. 2006. Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/dfoliares.htm>>. Acessado em: 16 de abril de 2016.

CEPA. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina**. EPAGRI. 2010, Florianópolis. 317p.

CHAMBERS, K.J.; BRUSH, S.B. Geographic Influences on Maize Seed Exchange in the Bajío, Mexico. **The Professional Geographer**, 62: 305–322, 2010.

CHEEKE, T.E.; DARBY, H.; ROSENSTIEL, T.N.; BEVER, J.D.; CRUZAN, M.B. Effect of *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize cultivation history on arbuscular mycorrhizal fungal colonization, spore abundance and diversity, and plant growth. **Agric. Ecosys. Environ.**, 195: 29–35, 2014.

CHEEKE, T.E.; ROSENSTIEL, T.N.; CRUZAN, M.B. Evidence of reduced arbuscular mycorrhizal fungal colonization in multiple lines of *Bt* maize. **Am. J. Bot.**, 99: 700–707, 2012.

CHEN, L.; MARMEY, P.; TAYLOR, N.; BRIZARD, J. P.; ESPINOZA, S.; D'CRUZ, P.; HUET, H.; ZHANG, S.; DE KOCHCO, A.; BEACHY, R.; FAUQUET, C. Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 16, p. 1060-1064, 1998.

CLEMENTS, M, J., CAMPBELL, K, W., MARAGOS, C, M., PILCHER, C., HEADRICK, J, M., PATAKY, J, K., WHITE, D, G, Influence of *Cry 1Ab* protein and hybrid genotype on fumonisin contamination and *Fusarium* ear rot of corn. **Crop Sci**, 43 (4): 1283–1293, 2003.

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). **Eventos Aprovados**, 2017. Disponível em: <http://cib.org.br/biotecnologia/regulamentacao/ctnbio/eventos-aprovados/>. Acesso em: 22 set. 2017.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 2 – safra 2014/15 – n.12: Décimo segundo levantamento, set. 2015. Brasília, 2015. 134 p.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 4 – safra 2016/17 – n.11: Décimo primeiro levantamento, ago. 2017. Brasília, 2017. 164 p.

CONTI, R.; GUIMARAES, D.O.; PUPO, M.T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Cienc. Cult.**, v.64, n.3, pp. 43-47, 2012.

COSTA, F.M. **Diversidade genética e distribuição geográfica: uma abordagem para a conservação *on farm* e *ex situ* e o uso sustentável dos recursos genéticos de milho do Oeste de Santa Catarina: múltiplas abordagens para sua compreensão**. Florianópolis, 2013, 212f, Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

COSTA, F. M.; SILVA, N, C, A.; OGLIARI, J, B. Maize diversity in southern Brazil: indication of a microcenter of *Zea mays* L, **Genet, Resour, Crop, Evol.**, 2016.

COTA, L.V.; COSTA, R.V.; SILVA, D.D. Helminthosporiose Causada por *Exserohilum turcicum* na Cultura do Milho. 1. Ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. (**Circular técnica**, 195).

COTTA, S. R.; DIAS, A.C.F.; MARRIEL, I.E.; ANDREOTE, F.D.; SELDIN, L.; ELSAS, J.D. Different effects of transgenic maize and nontransgenic maize on nitrogen-transforming archaea and bacteria in tropical soils. **Applied and Environmental Microbiology**, 80: 20, p. 6437–6445, 2014.

CRUZ, J.C.; MAGALHÃES, P.C.; PEREIRA FILHO, I.A.; MOREIRA, J.A.A. **Milho: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011.

DAGLA, H R. **Plant Tissue Culture: Historical Developments and Applied Aspects**. Resonance, p.759-767, 2012.

DESTRO D.; MONTALVÂN, R. **Melhoramento genético de plantas**. Londrina: UEL, 1999. 749 p.

- DING, J.; ALI, F.; CHEN, G.; LI, H. Genome-wide association mapping reveals novel sources of resistance to northern corn leaf blight in maize. **BMC Plant Biol.** 15: 206, 2015.
- DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 48, n. 313, p. 1493-1509, 1997.
- DUARTE, A. P.; KAPPES, C. Evolução dos sistemas de cultivo de milho no Brasil. **Informações Agronômicas**, n. 152, dez. 2015.
- EPAGRI. **Boletim Agropecuário**: boletim de economia rural. Florianópolis, n.50, 15 de julho de 2017.
- ESTEVEVES, M.C.F. **Reações a *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs em milho (*Zea mays* L.) e variabilidade do patógeno**. Tese de mestrado em Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1989.
- FANTIN, G.M.; DUARTE, A.P. **Manejo de doenças na cultura do milho safrinha**. Campinas: Instituto Agronômico, 2009. p.16-19.
- FERGUSON, L. M.; CARSON, M. L. Temporal variation in *Setosphaeria turcica* between 1974 and 1994 and origin of races 1, 23, and 23N in the United States. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, p. 1501-1511, 2007.
- FERMENT, G.; MELGAREJO, L.; FERNANDES, G.B.; FERRAZET, J.M. **Lavouras transgênicas – riscos e incertezas**: mais de 750 estudos desprezados pelos órgãos reguladores de OGMs. Brasília: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2015. 450p.
- FERREIRA, J.M. et al. Capacidade combinatória e heterose em populações de milho crioulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.2, p.332-339, 2009.
- FORMENTO, A. Enfermedades foliares reemergentes del cultivo de maíz: Royas (*Puccinia soghi* y *Puccinia polysora*) Tizón foliar (*Exserohilum turcicum*) y Mancha ocular (*Kabatiellazeae*). **INTA Paraná**; 2010.
- FRAME, B. et al. **Genetic Transformation Using Maize Immature Zygotic Embryos**. Plant Embryo Culture: Methods and Protocols Methods in Molecular Biology, v.710, p. 327–341, 2011.
- FREDERIKSEN, R. A.; ODVODY, G. N. **Compendium of sorghum diseases**. 2nd. St. Paul: American Phytopathological Society, 2000. 78 p.
- GALINAT, W. C. The origin of maize: grain of humanity. **Botanical Garden Journal**, New York, v. 44, n. 1, p. 3-12, 1995.

GATCH, E. W.; MUNKVOLD, G. P. Fungal species composition in maize stalks in relation to European corn borer injury and transgenic insect protection, **Plant Disease**, Quebec, v, 86, p, 1156-1162, 2002.

GOMES, W.S.; BORÉM, A. Biotecnologia: novo paradigma do agronegócio brasileiro. **Revista de economia e agronegócio**, v.11, n. 1, 2015.

GONÇALVES, Gabriel M. B. **Desempenho Agronômico e Adaptativo e Divergência Genética de População de Milho Local Derivadas de MPA1 em Processo de Melhoramento Genético**. 2013. f.48. Monografia na área de Agronomia - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GONZÁLES, G. *et al.* **Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in maize (*Zea mays* L.) inbred lines**. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.15, 2012.

GÖTZ, M.; NIRENBERG, H.; KRAUSE, S.; WOLTERS, H.; DRAEGER, S.; BUCHNER, A.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K.. Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. **FEMS Microbiol. Ecol.** 58:404-413, 2006.

HANULLA, S.E.; BOSCHKER, H.T.S.; DE BOER, W.; VAN VEEN, J.A. 13C pulse labeling assessment of the community structure of active fungi in the rhizosphere of a genetically starch-modified potato (*Solanum tuberosum*) cultivar and its parental isolate. **New Phytol.**, **194**:784–799, 2012.

HASLAM, E. **Shikimic acid: metabolism and metabolites**. University of Sheffield, UK. Chichester: New York; Wiley, 1997. 387p.

HURNI, S.; SCHEUERMANN, D.; KRATTINGER, S.G.; KESSEL, B. The maize disease resistance gene *Htn1* against northern corn leaf blight encodes a wall-associated receptor-like kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 112: 8780-8785, 2015.

HUSKEN, A.; AMMANN, K.; MESSEGUER, J.; PAPA, R.; ROBSON, P.; SHIEMANN, J.; SQUIRE, G.; STAMP, P.; SWEET, J.; WILHELM, R. A major European synthesis of data on pollen and seed mediated gene flow in maize in the SIGMEA project. In: STEIN, A.; Rodriguez-Cerezo, E. (Eds). **Books of abstracts of the third International conference on Coexistence between Genetically Modified (GM) and non-GM-based Agricultural supply Chains European Commission**. 2007. p 53–56.

ISAAA. Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações Biotecnológicas Agrícolas. **Status Global das Cultivares Transgênicas Comercializadas**: 2018, Relatório, n. 49, 2018.

ISHIDA, Y.; HIEI, Y.; KOMARI, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1614-1621, 2007.

KAY, R.; CHAN, A.; DALY, M.; MCPHERSON, J. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. **Science**, 236:1299-1302, 1985

KMOCH, M.; ŠAFRÁNKOVÁ, I.; HOLKOVÁ, L.; POLIŠENSKÁ, I.; KRÉDL, Z.; POKORNÝ, R. Fungi of the *Fusarium* genus in the grains of conventional hybrids and transgenic *Bt*-hybrids of maize (*Zea mays* L.) in the Czech Republic. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, 60: 5, p. 115-124, 2012.

KUHNEN, S.; DIAS, P.; OGLIARI, J.B.; MARASCHIN, M. Brazilian Maize Landraces Silks as Source of Lutein: An Important Carotenoid in the Prevention of Age-Related Macular Degeneration. **Food and Nutri. Sci.**, 3: 1609-1614, 2012.

LEACH, C. M.; FULLERTON, R. A.; YOUNG, K. Northern leaf blight of maize in New Zealand: relationship of *Drechslera turcica* airspora to factors influencing sporulation, conidium development, and chlamyospore formation. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, p. 629-636, 1977.

LEVY, Y. Variation in fitness among field isolates of *Exserohilum turcicum* in Israel. **Plant. Dis.**, 75:163–166, 1991.

LEVY, Y.; PATAKY, J. K. Epidemiology of northern leaf blight on sweet corn. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 20, p. 53-66, 1992.

LINDSEY, K. Genetic manipulation of crop plants. **Journal of Biotechnology**, v.26, p.1-28, 1992.

LOSEY, J. E.; RAYOR, L.S.; CARTER, M.E. Transgenic pollen harms monarch larvae. **Nature**, 399, 214, 1999.

LOUETTE, D.; CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. *In Situ Conservation of Maize In Mexico*: Genetic Diversity and Maize Seed Management in a Traditional Community. **Economic Botany**, v. 51, n. 1, p. 20–38, 1997.

LOUETTE, D. Traditional management of seed and genetic diversity: what is a landrace? In: Brush, S.B. (Ed) **Genes in the field**: on-farm conservation of crop diversity. IDRC (International Development Research Centre), 2000.

LUNA, V.S.; FIGUEROA, J.M.; BALTAZAR, B.M.; GOMEZ, R.L.; TOWNSEND, R.; SCHOPER, J.B. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. **Crop Sci.**, 41:1551–1557, 2001.

MACHADO, A. T.; SANTILLI, J.; MAGALHÃES, R. A Agrobiodiversidade com Enfoque Agroecológico: Implicações Conceituais e Jurídicas. Brasília, DF: Embrapa **Informação Técnica – Embrapa**. Secretaria de Gestão e Estratégia, 2008. 98 p.

MARCEAU, A.; LOUBET, B.; ANDRIEU, B.; DURAND, B.; FOUPELLASSAR, X.; HUBER, L. Modelling diurnal and seasonal patterns of maize pollen emission in relation to meteorological factors. **Agric. For. Meteorol.**, 151:11–21, 2011.

MATOS, M. J. L. F.; TAVARES, S. A.; SANTOS, F. F. DOS; MELO, M. F. DE; LANA, M. M. **Milho verde**. 2006. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/40342/1/Milho-valor.pdf>>. Acesso em 10 de maio de 2016.

MATSUOKA, Y.; VIGOUROUX, Y.; GOODMAN, M.M.; SÁNCHEZ, J.J.; BUCKLER, E.; DOEBLEY, J. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 99: 6080-6084, 2002.

MELLON, M.; RISSLER, J. **Gone to seed**: transgenic contaminants in the traditional seed supply. Union of Concerned Scientists, 2004

MESSÉAN, A.; ANGEVIN, F.; GOMEZ-BARBERO, M.; MENRAD, K.; RODRIGUEZ-CEREZO, E. **New case studies on the coexistence of GM and non-GM crops in European agriculture**. In: Tech Rep EUR 22102 EN. Institute for Prospective Technological Studies, Joint Research Centre, European Commission, Seville, Spain, 2006. p 116.

MEYER, J.B.; SONG-WILSON, Y.; FOETZKI, A.; LUGINBÜHL, C.; WINZELER, M.; KNEUBÜHLER, Y. Does Wheat Genetically Modified for Disease Resistance Affect Root-Colonizing Pseudomonads and Arbuscular Mycorrhizal Fungi? **PLoS ONE**, 8(1): e53825, 2013.

MIGUEL, F. B.; ESPERANCINI, M. S. T.; GRIZOTTO, R. K. Rentabilidade e risco da produção de milho safrinha geneticamente modificado e convencional na região de Guaíra/SP. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v.29, n.1, p.64-75, jan.-mar., 2014.

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) 2000. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 163-200. 2000.

MUNKVOLD G, P., HELLMICH, R, L., SHOWERS, W, B. Reduced *fusarium* ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. **Phytopathology**, 87: 1071–1077, 1997.

MUNKVOLD, G, P., DESJARDINS, A, E., 1997: Fumonisin in maize: Can we reduce their occurrence? **Plant Dis.**, 81: 556–565, 1997.

MUNKVOLD, G, P., HELLMICH, R, L. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids. **Plant Dis.**, 83:130–138, 1999.

NASCIMENTO, V.E.; VON PINHO, É.V.R.; VON PINHO, R.G.; SOUZA, J.C.; NASCIMENTO JÚNIOR, A.D. Fluxo gênico em milho geneticamente modificado

com resistência a insetos. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.47, n.6, p.784-790, jun. 2012.

NIHEI, T.H.; FERREIRA, J.M. Análise dialéctica de linhagens de milho com ênfase na resistência a doenças foliares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p.369- 377, 2012.

NIELSEN, R. L. Kernel set scuttlebutt. **Corny News Network**, West Lafayette, IN. 2005. Disponível em: <<http://www.kingcorn.org/news/articles.05/KernelSet-0809.html>>. Acesso em: 2012.

\_\_\_\_\_. A fast & accurate pregnancy test for corn. **Corny News Network**, West Lafayette, IN., 2007a. Disponível em: <<http://www.kingcorn.org/news/timeless/EarShake.html>>. Acesso em: 10 jul. 2012.

\_\_\_\_\_. Ear size determination in corn. **Corny News Network**, West Lafayette, IN., 2007b. Disponível em: <<http://www.kingcorn.org/news/timeless/EarSize.html>>. Acesso em: 10 jul. 2012.

\_\_\_\_\_. Grain fill stages in corn. **Corny News Network**, West Lafayette, IN., 2007c. Disponível em: <<http://www.kingcorn.org/news/timeless/GrainFill.html>>. Acesso em: 10 jul. 2012.

OGLIARI, J. B.; ALVES, A. C. Manejo e uso de variedades de milho com estratégia da Conservação de Anchieta. In: BOEF, W. S. et al. (Eds). **Biodiversidade e agricultores: fortalecendo o manejo comunitário**. Porto Alegre: L&PM, 2007. p 226-234.

OGLIARI, J.B.; GUIMARÃES, M.A.; GIRALDI, I.O.; CARMARGO, L.E.A. New resistance genes in the *Zea mays: Exserohilum turcicum* pathosystem. *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, n. 3, p. 435-439, 2007.

OGLIARI, J. B.; KIST, V.; CANCI, A. The participatory genetic enhancement of a local maize variety in Brazil. In: **Community Biodiversity Management – Promoting resilience and the conservation of plant genetic resources**. Ed. Earthscan from Routledge, 2013.

PADGETTE, SR.; BARRY, G.F.; RE, D.B.; EICHHOLTZ, D.A.; WELDON, M.; KOLACZ, K.; KISHORE, G.M. Purification, cloning and characterization of a highly glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate- 3-phosphate synthase from *Agrobacterium sp.* strain CP4. **Monsanto Technical Report MSL 12738**, 1993.

PAES, M.C.D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **Circular técnica**, n. 75, Sete Lagoas-MG, 2006.

PALAUDELMÀS, M.; MELÉ, E.; MONFORT, A.; SERRA, J.; SALVIA, J.; MESSEGUER, J. Assessment of the influence of field size on maize gene flow using SSR analysis. **Transgenic Res.**, 21: 471–483, 2012.

- PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoria do milho. In: BOREM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Vicosa: UFV, 1999. p. 429-485.
- PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos: Interação com as plantas e potencial biotecnológico. **Biotec. Ciênc. Desenvolv.**, 29: 62- 76, 2002.
- PEREIRA FILHO, I.A.; BORGHI, E. Mercado de Sementes de Milho no Brasil Safra 2016/2017. **Documentos** (Embrapa Milho e Sorgo), n.202, dez. 2016.
- POLAND, J.A.; BRADBURY, P.J.; BUCKLER, E.S.; NELSON, R.J. Genome-wide nested association mapping of quantitative resistance to northern leaf blight in maize. **Proc Natl. Acad. Sci.**, USA, 108:6893–8, 2011.
- RAMALHO, M.A.P.; SILVA, N.O. Fluxo gênico em plantas. In: MIR, L. (Org.). **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.863-884.
- RAMATHANI, I.; BIRUMA, M.; MARTIN, T.; DIXELIUS, C.; OKORI, P. Disease severity, incidence and races of *Setosphaeria turcica* on sorghum in Uganda. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, p. 383-392, 2011.
- RAYMUNDO, A.D.; HOOKER, A.L. Measuring the relationship between northern corn leaf blight and yield losses. **Plant Dis.**, 65:325–7, 1991.
- RIBEIRO, R.M.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; PENA, G.F.; VIVAS, M. History of northern corn leaf blight disease in the seventh cycle of recurrent selection of an UENF-14 popcorn population. **Acta Sci. Agron.** 38: 1-10, 2016.
- RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. Como a planta de milho se desenvolve. **Informações agronômicas**, n.103, set. 2003.
- RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. How a corn plant develops. **Special Bulletin**, Iowa, n. 48. 1993. Disponível em: <<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-21online/library/maize/www.ag.iastate.edu/departments/agronomy/corngrows.html>>. Acesso em: 08 ago. 2017.
- ROBBINS, W.A.; WARREN, H.L. Inheritance of resistance to *Exserohilum turcicum* in PI 209135, "Mayorbela" variety of maize. **Maydica**, 38:209-213, 1993.
- ROCHESTER, D.E.; WINER, J.; SHAH, D.M. The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp70. **EMBO** 5: 451–458, 1986.
- SANFORD, J. C.; SMITH, F. D.; RUSSEL, J. A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. In: WU, R. (Ed.). **Recombinant DNA**: part H. San Diego: Academic Press, 1993. p. 483-510. (Methods in Enzymology, 217).

SANFORD, J. The biolistic process. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 6, p. 299-302, 1988.

SANTOS, J.S. **Análise dialéctica completa e recíproca na estimação da capacidade combinatória da incidência e severidade de *bipolaris maydis* e *exserohilum turcicum* em milho-pipoca em diferentes épocas de cultivo**. 2016. 83f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2016.

SASSE, S. **Caracterização de variedades locais de milho procedentes de Anchieta – SC quanto à resistência a *Exserohilum turcicum***. 2008. 88f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. 2008.

SAXENA, D.; STOTZKY, G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic *Bt* corn in vitro and in situ. **FEMS Microbiol. Ecol.**, 33:35–39, 2000.

SAXENA, D.; FLORES, S.; STOTZKY, G. Transgenic plants: Insecticidal toxin in root exudates from *Bt* corn. **Nature**, 402:480, 1999.

SCHWESSINGER, B.; ZIPFEL, C. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 4, p. 389- 395, ago. 2008.

SHANG, Y.; YAN, Y.; XU, W.; TIAN, W.; HUANG, K. Research on gene mobility and gene flow between genetically modified MON 15985 cotton and *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Food Safety**, 00: 2015.

SILVA, K. J. D. **Introgressão de híbridos transgênicos e convencional em milho crioulo: efeitos sobre fungos e bactérias endofíticas**, Florianópolis, 2015, 143f, Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015a.

SILVA, N. C. A. **Conservação, diversidade e distribuição de variedades locais de milho e seus parentes silvestres no Extremo Oeste de Santa Catarina**, Florianópolis, 2015, 230f, Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015b.

SILVA, K.J.; ARMAS, R,D,; SOARES, C,R,F,S,; OGLIARI, J,B, Communities of endophytic microorganisms in different growth stages in local variety, and transgenic and conventional isogenic hybrids of maize, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 32:189, 2016a.

SILVA, N.C.A.; COSTA, F.M; VIDAL, R.; OGLIARI, J.B. Riesgos de contaminación de maíz genéticamente modificado en maíces criollos conservados in situ on farm en el oeste de santa catarina, sur del brasil. **IX Simposio Internacional de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe El Salvador**. p.55, 2013.

SILVA, N.C.A.; VIDAL, R.; OGLIARI, J.B. New popcorn races in a diversity microcenter of *Zea mays* L. in the Far West of Santa Catarina, Southern Brazil. **Genetic Resources and Crop Evolution (Print)**, v. 1, p. 1-14, 2016b.

SMALE, M.; AGUIRRE, A.; BELLON, M.R.; MENDOZA, J.; ROSAS, I.M. Farmer management of maize diversity in the Central Valleys of Oaxaca, Mexico: CIMMYT/INIFAP 1998 baseline socioeconomic survey. **Economics Working Papers**, 1999.

SOARES, A.C.; Resgate e conservação. In: SOARES, A. C. et al. (Eds). **Milho crioulo: conservação e uso da biodiversidade**. Rio de Janeiro: AS – PTA, 1998. 185p.

SOUZA, R.A.V. **Transformação Genética e Avaliação de Promotores Heterólogos para o Controle de Expressão Gênica em Milho**. 2015. f 103. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia) - Curso de Pós-graduação em Fitotecnia - UFV - Universidade Federal de Viçosa.

SUBEDI, A.; STHAPIT, B.; RANA, R. B. Análise Participativa de Redes de Sementes. In: De BOEF, W. S.; THIJSEN, H. M.; OGLIARI, J. B.; STHAPIT, B. R. (Org). **Biodiversidade e Agricultores: Fortalecendo o Manejo Comunitário**. Porto Alegre, RS: L&PM, p. 168 – 175, 2007.

TAKABATAKE, R. Evaluation of Quantitative PCR Methods for Genetically Modified Maize (MON863, NK603, TC1507 and T25). **Food Science Technology Research**, v. 16, p. 421 – 430, 2010.

TACKENBERG, O.; POSCHLOD, P.; KAHMEN, S. Dandelion seed dispersal: The horizontal wind speed does not matter for long-distance dispersal — it is updraft! **Plant Biol.**, 5:451–454, 2003.

TAYLOR, N. J.; FAUQUET, C. M. Particle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. **DNA and Cell Biology**, New York, v. 21, n. 12, p. 963-977, 2002.

TOMAZELA, A.L.; FAVARIN, J.L.; FANCELLI, A.L.; MARTIN, T.N.; DOURADO NETO, D.; REIS, A.R. Doses de Nitrogênio e Fontes de Cu e Mn suplementar sobre a severidade da Ferrugem e Atributos morfológicos do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, 5:192-201, 2006.

VAN DER HEIJDEN, M.G.; BARDGETT, R.D.; VAN STRAALLEN, N.M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecol Lett.**, 11(3): 296-310, 2008.

VAN HEERWAARDEN, J.; ORTEGA DEL VECCHYO, D.; ALVAREZ-BUYLLA, E.R.; BELLON, M.R. New Genes in Traditional Seed Systems: Diffusion, Detectability and Persistence of Transgenes in a Maize Metapopulation. **PLoS ONE**, 7(10): e46123, 2012.

VAN HEERWAARDEN, J.; VAN EEUWIJK, F.A.; ROSS-IBARRA, J. Genetic diversity in a crop metapopulation. **Heredity**, 104: 28–39, 2010.

VELASCO, A.G.V.; KOWALCHUK, G.A.; MÃNERO, F.J.G.; RAMOS, B.; YERGEAU, E.; GARCÍA, J.A.L. Increased microbial activity and nitrogen mineralization coupled to changes in microbial community structure in the rhizosphere of Bt corn. **Appl Soil Ecol**, 68: 46–56, 2013.

VIDAL, R. **Diversidade das populações locais de milho de Anchieta e Guaraciaba, Oeste de Santa Catarina: múltiplas abordagens para sua compreensão**, Florianópolis, 2016, 195f, Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

VIEIRA, R.A.; TESSMANN, D.J.; HATA, F.T.; SOUTO, E.R.; MESQUINI, R.M. Resistência de híbridos de milho-pipoca a *Exserohilum turcicum*, agente causal da helmintosporiose do milho. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.10, n.5, p.391-395, 2009.

VIGOUROUX, Y.; GLAUBITZ, J.C.; MATSUOKA, Y.; GOODMAN, M.M.; SÁNCHEZ G., J.; DOEBLEY, J. Population structure and genetic diversity of New World maize races assessed by DNA microsatellites. **American Journal of Botany**, v.95, p.1240-1253, 2008.

VILLA, T.C.C.; MAXTED, N.; SCHOLTEN, M.; FORD-LLOYD, B. Defining and identifying crop landraces. **Plant Genetic Resources**, v. 3 n. 3, p. 373-384, 2006.

VILLAS-BÔAS, S.G.; GOMBERT, A.K. Análise do metaboloma: Uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, a. IX, n. 36, 2006.

VIVEK, B.; ODONGO, O.; NJUGUNA, J.; IMANYWOHA, J.; BIGIRWA, G.; DIALLO, A.; PIXLEY, K. Diallel analysis of grain yield and resistance to seven diseases of African maize (*Zea Mays* L.) inbred lines. **Euphytica**, v.172, p.329-340, 2010.

WANG, L.; HACCOU, P.; LU, B-R. High-Resolution Gene Flow Model for Assessing Environmental Impacts of Transgene Escape Based on Biological Parameters and Wind Speed. **PLoS ONE** 11(3): e0149563, 2016.

WANG, K. et al. Maize transformation. In: BENNETZEN, J.L.; HAKE, S.C. **Handbook of maize: genetics and genomics**. Nova York: Springer, 2009. p.609-649.

WANG, K.; FRAME, B. Maize transformation. In: CURTIS, I. S. (Ed.). **Transgenic crops of world: essential protocols**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. p. 45-62.

WANG, X.; ZHANG, Y.; XU, X.; LI, H. Evaluation of maize inbred lines currently used in Chinese breeding programs for resistance to six foliar diseases. **Crop J.** 2: 213-222, 2014.

WELZ, H. G.; GEIGER, H. H. Genes for resistance to northern corn leaf blight in diverse maize populations. **Plant Breeding**, Berlin, v. 119, p. 1-14, 2000.

WHITE, D. G. **Compendium of corn diseases**. 3th ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 2000. 78 p.

WOLFENBARGER, L.L.; PHIFER, P.R. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. **Science**, 290:2088e93, 2000.

WORDELL FILHO, J.A.; ELIAS, H.T. (Eds.). **A cultura do milho em Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 2010.

WU, L.; NANDI, S.; CHEN, L.; RODRIGUEZ, R. L.; HUANG, N. Expression and inheritance of nine transgenes in rice. **Transgenic Research**, London, v. 11, p. 533-541, 2002.

ZEVEN, A. C. Landraces: A review of definitions and classifications. **Euphytica**, Wageningen, v. 104, p. 127-139, 1998.

ZHAO, Z.-Y.; GU, W.; CAI, T.; TAGLIANI, L.; HONDRED, D.; BOND, D.; SCHROEDER, S.; RUDERT, M.; PIERCE, D. High throughput genetic transformation of maize mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 8, p. 323-333, 2001.

ZHU, Y.; ZHAO, F.; ZHAO, D. Regeneration and transformation of a maize elite inbred line via immature embryo culture and enhanced tolerance to a fungal pathogen *Exserohilum turcicum* with a balsam pear class I chitinase gene. *African Journal of Agricultural Research*, 6 (7), pp. 1923-1930, 4 April 2011.

ZWAHLEN, C.; HILBECK, A.; GUGERLI, P.; NENTWIG, W. 2003. Degradation of the *Cry1Ab* protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. **Molecular Ecology**, 12 (3): 765-775, 2003.

## CAPÍTULO 1. EFEITOS DA TRANSGENIA SOBRE A RESISTÊNCIA A HELMINTOSPORIOSE E PERFORMANCE AGRONÔMICA DO MILHO SOB PRÁTICAS DE MANEJO QUÍMICO E MANUAL DE PLANTAS RUDERAIS

### RESUMO

Poucos trabalhos são encontrados na literatura com o intuito de observar os efeitos da transgenia sobre doenças fúngicas foliares do milho não alvo dos transgenes. Com base nisso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da transgenia em híbridos isogênicos de milho quanto à resistência a *Exserohilum turcicum* e seus efeitos sobre a fenologia, rendimento de grãos e seus componentes, na presença e ausência de controle químico de plantas ruderaias. Para este estudo elegeram-se três híbridos isogênicos da série Biogene BG7060®: o híbrido BG7060 (NGM) não geneticamente modificado, BG7060H (Hx), portador dos transgenes *cry1F* e *pat* (evento TC1507) e BG7060HR (Hxrr), portador do transgene *cp4epsps* (evento NK603), combinado ao evento TC1507. Para a avaliação da resistência do milho a helmintosporiose, foram realizados três experimentos. O primeiro na safra 2013, em esquema de blocos completos casualizados, com três repetições e parcelas contendo quatro fileiras de 5 m lineares de comprimento, espaçadas 1 m entre si. O segundo e terceiro experimento foram conduzidos simultaneamente na safra 2016/2017, ambos no delineamento de blocos completos casualizados, com quatro repetições e parcelas constituídas por quatro fileiras de 4 m lineares de comprimento, espaçadas 0,80 m entre si. No primeiro e segundo experimentos, o controle das plantas ruderaias foi feito por meio de capina manual; no terceiro experimento, o controle foi feito por meio da aplicação de uma dose única de 2,0 L ha<sup>-1</sup> do herbicida Finale (200 g L<sup>-1</sup> de glufosinato de amônio), quando as plantas ruderaias estavam com um par de folhas. A severidade da helmintosporiose, na safra 2013, foi avaliada com base na ocorrência natural da doença. Nos dois experimentos conduzidos na safra 2016/2017, a avaliação de resistência do milho foi efetuada a partir de inoculação do patógeno. A resistência da planta ao patógeno foi inferida a partir das avaliações da incidência, variáveis monocíclicas e severidade. Outros caracteres como etapas fenológicas, rendimento de grãos e seus componentes, foram avaliados em ambos os experimentos dessa mesma safra. O estudo mostrou que o híbrido NGM foi inicialmente mais resistente ao patógeno, por ter apresentado menor incidência e maiores períodos de incubação e latência, em comparação às suas versões isogênicas transgênicas. A adição do herbicida Finale para o controle das plantas ruderaias aumenta a susceptibilidade dos híbridos isogênicos transgênicos pela maior incidência e menores períodos de incubação e latência, principalmente para o híbrido portador de dois eventos e três transgenes. O híbrido isogênico NGM cultivado ao lado dos híbridos Hx e Hxrr, no ambiente manejado com herbicida, também foi mais susceptível ao patógeno, em relação ao mesmo tratamento cultivado no ambiente manejado por meio de capinas manuais. A adição do herbicida a base de glufosinato de amônio aos híbridos Hx e Hxrr ocasionou o prolongamento da fenologia e a redução do rendimento de grãos e seus componentes, em relação aos mesmos tratamentos manejados por meio de capinas manuais.

**Palavras-chave:** Milho geneticamente modificado. *Zea mays* L. Helmintosporiose. Glufosinato de Amônio.

## 1.0 INTRODUÇÃO

O Brasil tornou-se o segundo maior produtor de culturas transgênicas no mundo, atingindo uma área plantada de 50,2 milhões de hectares, ficando atrás somente dos EUA, com 75 milhões de hectares (ISAAA, 2018; ALDEMITA; HAUTEA 2018). As principais culturas transgênicas plantadas no país são a soja, o milho e o algodão. O milho chegou à marca dos 17 milhões de hectares cultivados no Brasil, em 2017, estima-se que mais de 90% dessa área foi ocupada por milhos transgênicos (CÉLERES, 2016). A importância da biotecnologia para a cultura do milho no país também pode ser evidenciada pelo elevado número de cultivares transgênicos (214) liberadas comercialmente, na safra 2016/2017 (PEREIRA; BORGHI, 2016).

Os eventos transgênicos TC1507 e o NK603 são os mais frequentes em híbridos transgênicos de milho cultivados em Santa Catarina, no Sul do Brasil. TC1507 confere resistência a insetos da ordem Lepidoptera e tolerância ao herbicida a base de glufosinato de amônio - HBGA (ingrediente ativo L-fosfonitrícina), enquanto o evento NK603 confere tolerância ao herbicida a base de glifosato - HBG (ingrediente ativo Sal de Isopropilamina). A resistência do milho portador do evento TC1507 aos lepidópteros-pragas do milho - *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea saccharalis* e *Helicoverpa zea* - é conferida por uma forma truncada da proteína inseticida Cry1F (endotoxina) codificada pelo gene *cry1F*, isolado da cepa PS81I (NRRL B-18484) da bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*. Essa proteína é produzida durante todo o ciclo do milho e causa a morte dos insetos-alvos, após se ligar ao intestino médio dos mesmos, interrompendo o fluxo de íons, paralisando o intestino do inseto e lisando as suas células epiteliais (MONNERAT; BRAVO, 2000). A tolerância do milho portador do evento TC1507 ao HBGA é conferida pela enzima PAT (fosfinotricina-N-acetiltransferase), codificada pelo gene *pat* isolado da cepa Tu494 obtido do microrganismo de solo *Streptomyces viridochromogenes* (AGBIOS, 2008). Essa enzima converte o ingrediente ativo do herbicida em uma forma inativa, impedindo-o de inibir a enzima glutamina sintetase, reponsável pela produção de glutamina e, conseqüentemente, de promover a acumulação de amônia em níveis letais (CERA,

2010). Uma sequência do promotor P35S do CaMV (isolado Cabb-s) e a sequência intrônica IVS2 de 178 pb do gene *adhS1* de milho foram utilizadas para promover e potencializar a transcrição do gene *pat* (FORLANI et al., 2006).

O evento NK603, por sua vez, contém o gene *cp4epsps* isolado da bactéria *Agrobacterium sp.* cepa CP4, que confere tolerância ao HBG. Esse transgene é responsável pela expressão da enzima CP4-EPSPS (CP4-5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase), funcionalmente idêntica à proteína EPSPS endógena de plantas (PADGETTE et al., 1993). As plantas de milho portadoras do transgene *cp4epsps* mantêm a biossíntese do hidroxilshiquimato-3-fosfato na presença do herbicida glifosato e, conseqüentemente, a produção de aminoácidos aromáticos e outros metabólitos necessários para o desenvolvimento das plantas (STEINRUCKEN; AMRHEIM, 1980). A enzima CP4 EPSPS contém o gene *cp4epsps* sob o controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor melhorada (CaMV) (Kay et al. 1985). O íntron Zmhsp70 da proteína de choque térmico de milho hsp70 foi incluído para estabilizar o nível de transcrição (ROCHESTER et al., 1986) e a sequência líder do peptídeo de trânsito de cloroplasto CTP2 foi usada para dirigir a proteína CP4 EPSPS ao cloroplasto (SHAH et al., 1986). A região não traduzida NOS 3' do gene da nopalina-sintetase de T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* foi utilizada para fornecer o sinal de poliadenilação (FRALEY et al., 1983).

A base genética de uma cultivar transgênica de milho é derivada de um híbrido convencional (não transgênico), desenvolvido por métodos clássicos de melhoramento. A inserção de um ou mais eventos ao híbrido convencional, isolados ou combinados em um mesmo material genético básico, constitui uma série de híbridos isogênicos, que diferem entre si basicamente pela ausência (híbrido convencional) ou presença de um ou mais eventos (híbridos transgênicos). Dessa forma, teoricamente, os híbridos isogênicos de milho não deveriam apresentar diferenças na sua composição genética, além daquela proporcionada pela tecnologia de DNA usada para criá-los. Todavia, estudos recentes têm mostrado que estas diferenças entre os híbridos isogênicos existem e que são apresentadas ao nível de metaboloma e proteoma (WANG et al., 2018; AGAPITO-TENFEN et al., 2018; BENEVENUTO et al., 2017; MESNAGE et al. 2016), danos ocasionados por pragas, alterações em características morfológicas, estruturais e composição química de

partes da planta (BALIEIRO NETO et al., 2013), efeitos prejudiciais sobre organismos não alvo (SILVA et al. 2016a; CHEEKE et al. 2012, 2014; VELASCO et al. 2013) e redução do desempenho agrônômico das plantas (PRADO et al., 2016).

Os trabalhos são escassos quanto aos efeitos da transgenia sobre a resistência da planta a microrganismos fitopatogênicos não alvo. Alguns poucos trabalhos estudaram os efeitos sobre a resistência do milho aos fungos patogênicos do gênero *Fusarium* (CLEMENTS et al., 2003; GATCH; MUNKVOLD, 2002; MUNKVOLD; HELLMICH, 1999; MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; MUNKVOLD et al., 1997). Gatch e Munkvold (2002), avaliando híbridos isogênicos de milho não transgênicos e transgênicos portadores de eventos distintos (176 KnockOut, Bt 11/Yeldgard, MON810/Yeldgard, DBT418/BtXtra, CBH351/StarLink) observaram um maior nível de infecção por *Fusarium graminearum*, no colmo dos milhos transgênicos, em relação às suas respectivas versões não transgênicas. Munkvold e Hellmich (1999), Munkvold e Desjardins (1997), Munkvold et al. (1997) e Clements et al. (2003), avaliando espigas de milho contendo grãos infectados por fungos do gênero *Fusarium*, oriundo de áreas com ataque da broca *Ostrinia nubilalis*, também constataram uma menor ocorrência de infecção das espigas do híbrido não transgênico, em comparação ao transgênico portador do transgene *cry1Ab*. Em contraponto, um trabalho realizado por Kmoch et al. (2012) mostrou a ausência de efeitos do transgene *cry1Ab* sobre a infecção de grãos de milho causada por *Fusarium*.

Apesar destes estudos conduzidos com o patossistema *Zea mays* - *Fusarium*, não há registros de trabalhos na literatura atual, com o intuito de observar os efeitos da transgenia sobre as doenças fúngicas foliares não alvo dos transgenes. As pesquisas também são escassas quanto aos efeitos da transgenia sobre a fenologia e demais caracteres de importância agrônômica em plantas transgênicas. Alguns poucos estudos com glifosato em cultivares de milho portadores da tecnologia *Roudup Ready 2* (RR2) sob aplicação do HBG, os autores constataram efeitos negativos quanto ao balanço nutricional, aos efeitos fitotóxicos, à eficiência no uso da água, fotossíntese, rizosfera, ao acúmulo de biomassa, à síntese de aminoácidos e compostos secundários, e também quanto à qualidade das sementes e produção de grãos em milho (ALBRECHT et al., 2011; ZOBIOLE et al., 2010a, 2010b, 2010c). Outros estudos como o de Thomas et al. (2004) e Krenchinski et al. (2017), também

com soja transgênica *RR2*, constataram fitotoxicidade e declínio linear significativo no índice de clorofila e teores de nutrientes nas folhas, na medida em que foi aumentada a dose deste herbicida.

A helmintosporiose, causada por *Exserohilum turcicum*, é uma doença foliar grave, que pode acarretar até 50% de redução do rendimento da cultura (ZHU et al., 2011; POLAND et al., 2011; RAMATHANI et al., 2011), como consequência das extensas desfolhas durante o período de enchimento de grãos, principalmente, se a infecção ocorrer antes do florescimento (CARSON; VAN DYKE, 1994). Temperaturas entre 20° C a 25° C, umidade relativa de 90% a 100% e baixa luminosidade são condições favoráveis de ambiente para a reprodução desse fitopatógeno (BENTOLILA et al., 1991). No Brasil, epidemias ocorrem com maior frequência nas regiões Sul e Chapadas do Centro-Oeste, onde as perdas de produção são mais severas (OGLIARI et al., 2007, 2005). Por isso, o patossistema em questão é promissor para a realização de estudos envolvendo os efeitos da transgenia sobre a reação de resistência da planta frente a um patógeno foliar.

Considerando a importância da cultura do milho para a economia agrícola do Brasil, a extensa área cultivada com cultivares transgênicas no país, a escassez de estudos focados nos efeitos dos transgenes sobre a reação do milho frente aos patógenos foliares e a relevância das perdas de produção causadas pela helmintosporiose, o presente estudo pretende responder as seguintes questões: (i) Quais os efeitos da inserção isolada do evento TC1507 (transgenes *cry1F* com resistência a Lepidopteros e *pat* com tolerância a HBGA) ou combinada ao evento NK603 (transgene *cp4epsps* com tolerância a HBG) em híbridos de milho, quanto à resistência a helmintosporiose, a fenologia, o rendimento de grãos e seus componentes? (ii) O manejo das plantas ruderais por meio do uso de herbicida ou capinas manuais afeta diferentemente os híbridos transgênicos para essas variáveis? Orientado por essas questões, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da transgenia em híbridos isogênicos de milho quanto à resistência a helmintosporiose, fenologia, rendimento de grãos e seus componentes, na presença e ausência de controle químico de plantas ruderais.

## 2.0 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

Três híbridos isogênicos da Dupont do Brasil S/A – Pioneer, pertencentes à Biogene BG7060®, foram usados como tratamentos do presente estudo. O híbrido BG7060 (NGM) não possui transgenes e, por isso, foi usado como controle, por ser uma cultivar híbrida convencional. O híbrido isogênico BG7060H (Hx) é portador dos transgenes *cry1F* e *pat* (evento TC1507, tecnologia *Herculex I*). O híbrido isogênico BG7060HR (Hxrr) é portador do transgene *cp4epsps* (evento NK603, tecnologia *Roundup Ready 2*), combinado ao evento TC1507 (AGBIOS, 2008). Os híbridos isogênicos da série BG7060® são híbridos triplos precoces, recomendados para a região sul do Brasil para a produção de grãos e silagem. São responsivos ao uso de fungicidas para o controle da cercosporiose, além de serem moderadamente tolerantes a *Exserohilum turcicum* e às principais doenças fúngicas do milho (BIOGENE, 2016).

### 2.2 ENSAIO A CAMPO

Foram realizados três experimentos em condições de campo, sendo o primeiro, na safra 2013, e os demais, na safra 2016/2017. A área experimental está situada na latitude 27,41°S e longitude 48,32°O, na Fazenda Experimental da Ressacada da Universidade Federal de Santa Catarina, localizada em Florianópolis - Santa Catarina. O clima da região é classificado como mesotérmico úmido (Cfa Köppen) e o solo é classificado como Neossolo Quartzarênico Hidromórfico Típico (EMBRAPA, 2006), de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos.

As condições de ambiente vigentes durante o período experimental da safra 2013 (03/03/2013 a 03/07/2013) apresentaram um total acumulado de chuvas de 522,5 mm, umidade relativa média de 81% e temperatura média de 20,3 °C, com mínima registrada de 8,4 °C e máxima de 31,8 °C (ICEA, 2017). Na safra 2016/2017, a temperatura média durante o período de condução dos dois experimentos (25/10/2016 a 25/03/2017) foi de 24 °C, com mínima registrada de 13,3 °C e máxima

de 36,7 °C. O total acumulado de chuvas nesse período foi de 583,8 mm e a umidade relativa média foi de 81% (ICEA, 2017).

O experimento da safra 2013 foi conduzido em delineamento de blocos completos casualizados, com três repetições e parcelas contendo quatro fileiras de 5 m lineares de comprimento, espaçadas 1 m entre si. A área útil da parcela foi de 4 m<sup>2</sup>, excluindo 0,50 m de cada extremidade das duas fileiras centrais. O estande final foi de seis plantas por metro linear, estabelecendo, assim, uma densidade final de 60.000 plantas ha<sup>-1</sup>. O controle de plantas ruderais foi feito por meio de capinas manuais. A correção com nitrogênio, fósforo e potássio foi efetuada com base em análise prévia de solo por bloco experimental.

Os dois experimentos da safra 2016/2017 foram conduzidos em delineamento em blocos completos casualizados, com quatro repetições e parcelas contendo quatro fileiras de 4 m lineares de comprimento, espaçadas 0,80 m entre si. As duas fileiras centrais constituíram uma área útil de parcela de 3,2 m<sup>2</sup>. O estande final foi de seis plantas por metro linear, estabelecendo assim, uma densidade de 75.000 plantas ha<sup>-1</sup>. A correção com nitrogênio, fósforo e potássio desses dois experimentos foi efetuada com base em análise prévia de solo e recomendação do Manual de Adubação e de Calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (ROLAS, 2004), para a cultura do milho.

Para verificar o efeito do uso do herbicida sobre alguns atributos de importância agronômica e adaptativa do milho, foram adotadas estratégias distintas de controle das plantas ruderais, nos experimentos conduzidos na safra 2016/2017. Em um experimento foi aplicada dose única do herbicida Finale, na base de 2,0 L ha<sup>-1</sup> (200 g L<sup>-1</sup> de glufosinato de amônio) + 0,2% v/v de óleo mineral Joint Oil AgroSciences, quando as plantas ruderais das parcelas cultivadas com os híbridos Hx e Hxrr estavam com um par de folhas e as plantas de milho estavam em estágio vegetativo V4 á V5. No outro experimento, as plantas ruderais foram controladas por meio de capinas manuais.

## 2.3 AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL

O experimento conduzido na safra 2013 tinha como objetivo inicial avaliar apenas o efeito da transgenia sobre a estrutura da diversidade das comunidades de microrganismos endofíticos da folha do milho, cujo tema foi publicado por Silva et al. (2016a). Em razão da ocorrência natural da helmintosporiose nesse experimento, o mesmo também foi usado para a realização de uma primeira análise dos efeitos da transgenia sobre a resistência da planta a este fitopatógeno por meio da avaliação da severidade foliar (vide item 2.3.2).

A falta de dados na literatura dos efeitos da transgenia sobre fitopatógenos foliares não alvo dos transgenes e os resultados preliminares obtidos nessa primeira safra levaram ao planejamento dos dois experimentos adicionais, conduzidos na safra 2016/2017, mas por meio de inoculação controlada do patógeno, conforme procedimentos descritos nos itens 2.3.1 e 2.3.2. Em ambos os experimentos dessa mesma safra, ainda foram avaliados o florescimento masculino e feminino, o rendimento de grãos e seus componentes, conforme descrito no item 2.3.3

### **2.3.1 Coleta, isolamento, cultura monospórica e inoculação do patógeno**

No início do ano de 2016, folhas contendo lesões típicas de helmintosporiose foram coletadas em lavouras de milho da Fazenda Experimental da Ressacada, em Florianópolis-SC. O isolamento do patógeno foi efetuado a partir de partes da folha contendo lesões, mantidas em câmara úmida dentro de placas de Petri, em temperatura ambiente por 24 horas. As partes da folha mais abundantes em esporulação foram colocadas sobre vidro-relógio e, com auxílio de uma alça de platina, as estruturas reprodutivas foram raspadas e, a seguir, diluídas em água destilada esterilizada. A suspensão contendo os conídios foi então filtrada em gaze estéril, para reter as demais estruturas e impurezas contidas sobre a folha lesionada (SASSE, 2008).

Após a filtragem, 10 µL do meio líquido foi pipetado e transferido em lâmina oca para a obtenção das culturas monospóricas. A localização dos conídios na lâmina foi efetuada com o auxílio de uma lente objetiva com aumento de 40x do microscópio

óptico. Uma vez localizado um conídio na lâmina, este era “sugado” com pipeta e transferido para placa de Petri, contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). O depósito de um único conídio ao meio de cultura também foi efetuado com auxílio da mesma lente objetiva. As culturas monospóricas foram então mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 25 °C, no escuro, por sete dias (SASSE, 2008).

Para a obtenção do inóculo, foram utilizados grãos de sorgo como substrato, acondicionados em frascos Erlenmeyers de 250 ml. Cada frasco recebeu 25 g de grãos mais 40 ml de água destilada, para ambos serem autoclavados durante 30 minutos. Após a autoclavagem, foram adicionados fragmentos de meio de cultura BDA, contendo estruturas provenientes do cultivo monospórico de *Exserohilum turcicum*. Após a repicagem, o fungo foi incubado a 25 °C, no escuro, por 15 dias, até a completa colonização dos grãos de sorgo. A partir do terceiro dia, cada frasco Erlenmeyer foi agitado periodicamente para possibilitar a colonização mais homogênea de todos os grãos. Cerca de 20 grãos do sorgo colonizado pelo fungo foram adicionados em placas de Petri esterilizadas, contendo 10 ml de batata dextrose ágar (BDA). O material fúngico foi incubado a 25 °C, no escuro, por sete dias e, após este período, as colônias geradas em cada placa foram “raspadas” e adicionadas a 100 mL de água destilada em um béquer, até atingirem a concentração de  $10^4$  esporos/mL, com auxílio de uma câmara de Neubauer.

A inoculação dos conídios foi realizada 36 dias após a semeadura, em plantas no estágio vegetativo V6 a V7. Para a inoculação, foi utilizado um pulverizador de compressão prévia Guarany de 6 L, com bico atomizador adaptado (tipo magno cônico de 0,15 mm). Testes prévios foram realizados com este pulverizador usando apenas água, para determinar a quantidade total de suspensão a ser utilizada durante a inoculação. Para as condições do presente estudo, foram utilizados 2 mL da suspensão/planta. Considerando o total de 576 plantas, foram gastos 1,152 L de solução mais 25%, chegando a um total de aproximadamente 1,5 L de solução para os dois experimentos. A inoculação do patógeno foi efetuada por meio de distribuição homogênea dessa suspensão em toda a área. Esta etapa foi realizada no fim da tarde, sob baixa intensidade luminosa e na ausência de precipitação pluviométrica.

### 2.3.2 Severidade causada pela helmintosporiose

No experimento da safra 2013, as avaliações de severidade foliar foram realizadas aos 105, 111, 123, 137 e 146 dias após a semeadura (DAP), cujas datas corresponderam aos estádios fenológicos reprodutivos compreendidos entre R3 (grão pastoso) e R5 (grãos duros). Foram avaliadas oito plantas aleatórias da área útil da parcela e todas as plantas avaliadas nessa primeira vez foram marcadas, para que as mesmas fossem acompanhadas nas quatro avaliações posteriores. A severidade foliar foi estimada a partir da avaliação de uma amostra de oito plantas da área útil da parcela, por meio de escala diagramática elaborada por Bleicher (1988). Nessa escala, a avaliação da percentagem do tecido foliar infectado por *E. turcicum* exibe percentuais de lesão de 0, 1, 3, 6, 10, 25, 50 e >50%. A partir da análise de três folhas por planta contendo lesões, foi estimada a severidade média da doença para a planta inteira.

Nos dois experimentos da safra 2016/2017, foram avaliadas as variáveis incidência (INCI), período de incubação (INCU), período latente (LATE) e severidade da doença. A incidência foi medida em 10 plantas da parcela útil (cinco em cada fileira da parcela útil), 14 dias após a inoculação dos fungos e, a partir disso, foi estimada a porcentagem ou frequência relativa das plantas afetadas com a doença. O período de incubação foi considerado como o tempo (em dias) decorrido da inoculação até o aparecimento dos primeiros sintomas. O período latente foi avaliado com auxílio de uma lupa (10x aumento) e medido com base no tempo (em dias) decorrido da inoculação até a esporulação (FERREIRA et al., 2017). As avaliações de severidade foram realizadas aos 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98 e 105 DAP, ou seja, entre os estádios fenológicos vegetativo V6 (6 folhas completas) e reprodutivo R5 (grãos duros). Foram avaliadas 20 plantas aleatórias da parcela útil e, de maneira similar ao experimento da safra 2013, todas as plantas avaliadas pela primeira vez foram marcadas, para que as mesmas fossem avaliadas nas demais avaliações.

A severidade foliar dos experimentos da safra 2016/2017 foi estimada por meio de escala diagramática elaborada pela AGROCERES (1996). Nessa escala, a avaliação da percentagem do tecido foliar infectado por *Exserohilum turcicum* exibe percentuais de lesão de 0, 1, 3, 6, 10, 25, 50 e >50%. As plantas foram divididas em

três terços (inferior, mediano e superior) e de cada terço foram avaliadas três folhas para a inferência do progresso da doença. A severidade média de cada planta foi estimada a partir da média das nove folhas.

A evolução da doença, para os três ensaios, foi estimada através da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), com base nos dados de severidade obtidos em cada avaliação e aplicado à fórmula de Campbell e Madden (1990):  $AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(Y_{i+1} + Y_i) \cdot (T_{i+1} + T_i)}{2}$ , Onde:  $Y_i$  = severidade da doença na época de avaliação  $i$  ( $i=1,2,\dots,n$ );  $Y_{i+1}$  = severidade da doença na época de avaliação  $i+1$ ;  $T_i$  = época da avaliação  $i$ ;  $T_{i+1}$  = época de avaliação  $i+1$  e;  $n$  = número total de observações.

### 2.3.3 Caracteres Fenológicos e Agronômicos

Para os dois ensaios conduzidos na safra 2016/2017, além da severidade da doença, foram avaliados alguns caracteres fenológicos e agronômicos. As variáveis fenológicas avaliadas foram florescimento masculino (FM) e florescimento feminino (FF). Para o FM, foi considerado o tempo (em dias) transcorrido da emergência até 50% + 1 de plantas da parcela útil contendo anteras liberando pólen. Para o FF, foi considerado o tempo (em dias) da emergência até 50% + 1 de espigas da parcela útil contendo estigma e estiletos expostos. As variáveis agronômicas avaliadas foram rendimento de grãos e seus componentes, tal como número de grãos por fileira na espiga (NGF), comprimento da espiga (CE), diâmetro da espiga (DE), diâmetro do sabugo (DS), peso da espiga com palha (PECP), peso da espiga sem palha (PESP) e peso de 1000 grãos (P1000). Para os caracteres número de grãos por fileira, diâmetro da espiga (cm), diâmetro do sabugo (cm), peso da espiga com palha (kg) e peso das espigas sem palha (kg), foram consideradas as espigas de 20 plantas da parcela útil, sendo 10 plantas marcadas com fita vermelha, em cada uma das duas fileiras. Para a característica peso de 1000 grãos (g), foram debulhadas as espigas das 20 plantas da parcela útil e aleatoriamente feita a contagem de 1000 grãos para posterior pesagem. A produtividade (PROD) foi estimada em  $t\ ha^{-1}$  de grãos, a partir da colheita e debulha manual de todas as espigas da parcela útil de  $3,2\ m^2$ .

## 2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise de variância individual para o experimento da safra 2013 (controle manual das invasoras) e para os dois experimentos da safra 2016/2017 (controle manual de invasoras e controle químico das invasoras) seguiu o modelo misto, considerando a equação estatística matemática:  $Y_{ij} = \mu + t_i + b_j + e_{ij}$ , onde  $Y_{ij}$  corresponde a observação do  $i$ -ésimo tratamento ( $i = 1, 2, \dots, 15$ ) do  $j$ -ésimo bloco ( $j = 1, 2$  e  $3$ );  $\mu$  é a média geral do experimento (constante);  $t_i$  é o efeito dos tratamentos (fixo);  $b_j$  é o efeito dos blocos (aleatório);  $e_{ij}$  é o efeito aleatório associado ao erro experimental. A diferença entre os tratamentos foi calculada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, quando o teste de F foi significativo ao mesmo nível de significância.

Para as análises de grupos de experimentos, conduzidos em diferentes manejos e na mesma safra ou em safras diferentes, foi considerado o modelo misto matemático  $Y_{ijk} = \mu + t_i + m_k + t_{mij} + b_{j(k)} + e_{ijk}$ , onde  $Y_{ijk}$  é a observação do  $i$ -ésimo tratamento ( $i = 1, 2, \dots, 5$ ) do  $j$ -ésimo bloco ( $j = 1, 2, 3, 4$ ) e do  $k$ -ésimo manejo ( $k = 1, 2, 3, 4$ );  $\mu$  é a média geral (constante);  $t_i$  é o efeito de tratamento (fixo);  $m_k$  é o efeito de manejos (fixo);  $t_{mij}$  é o efeito da interação entre tratamento e manejo (fixo);  $b_{j(k)}$  é o efeito de blocos dentro de manejos, suposto aleatório;  $e_{ijk}$  é efeito aleatório associado ao erro experimental.

Para calcular a AACPD em função do tempo, foi utilizado o modelo de regressão linear:

$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \varepsilon_i$ , para  $i = 1, \dots, n$ , onde:  $Y_i$ : é uma variável aleatória e representa o valor da variável resposta (variável dependente) na  $i$ -ésima observação;  $x_i$ : representa o valor da variável explicativa (variável independente, variável regressora) na  $i$ -ésima observação;  $\varepsilon_i$ : é uma variável aleatória que representa o erro experimental;  $\beta_0$  e  $\beta_1$ : são os parâmetros do modelo, que serão estimados, e que definem a reta de regressão;  $n$ : é o tamanho da amostra.

As análises individuais e conjuntas foram efetuadas com o programa STATISTICA 13.3 (TIBCO, 2017) e as análises de regressão com o programa R (R TEAM, 2017).

### 3.0 RESULTADOS

#### 3.1 EFEITOS DA TRANSGENIA SOBRE A RESISTÊNCIA A HELMINTOSPORIOSE

A Tabela 2 contém os resultados das análises de variância individuais e conjunta para as variáveis incidência (INCI), períodos de incubação (INCU) e latência (LATE), avaliadas em dois experimentos conduzidos na safra 2016/2017, com os três híbridos isogênicos da série BG7060, na presença e ausência do HBGA. A estimativa dos coeficientes de variação de cada experimento, em valores percentuais, variou de 33,73 (com aplicação de herbicida - C/H) a 40,81 (sem aplicação de herbicida - S/H), 6,17 (C/H) a 8,62 (S/H) e 10,67 (C/H) a 15,99 (S/H), para as variáveis INCI, INCU e LATE, respectivamente, indicando que os fatores de variação não controlados pelo experimento foram mais pronunciados para o ambiente manejado sem o uso de herbicida e, principalmente, para a variável INCI (Tabela 2). Os híbridos isogênicos diferiram significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste F para as variáveis INCI, INCU e LATE, tanto nas análises efetuadas individualmente para cada sistema de controle de plantas ruderais (com HBGA - C/H e por meio de capinas manuais - S/H), como na análise conjunta dos dois experimentos conduzidos sob diferentes sistemas de manejo. Entretanto, para essas mesmas variáveis, as diferenças não foram significativas para os efeitos associados aos sistemas de manejo e à interação dos híbridos (genótipos) com os ambientes de manejo (Tabela 2).

O híbrido isogênico NGM destacou-se em relação aos demais híbridos (Hx e Hxrr), considerando que o valor médio dos dois experimentos para INCI foi significativamente inferior aos valores médios dos híbridos Hx (5,4 vezes menor) e Hxrr (14,2 vezes menor). Por outro lado, para a variável INCU, o valor médio do híbrido NGM foi significativamente superior às médias dos híbridos Hx (1,1 vezes maior) e Hxrr (1,4 vezes maior) e, para LATE, o valor médio do híbrido NGM foi superior à média do híbrido Hxrr (1,5 vezes maior). Essa tendência entre as médias dos três híbridos também foi observada nas análises individuais para as três variáveis, independentemente de o sistema de manejo das plantas ruderais ter sido efetuado quimicamente ou por meio de capinas manuais.

**Tabela 2.** Médias dos híbridos isogênicos de milho NGM (não geneticamente modificado), Hx (portador do evento TC1507), Hxrr (portador dos eventos TC1507 + NK603) para as variáveis incidência (INCI), período de incubação (INCU) e latência (LATE), avaliadas experimentalmente em dois sistemas de manejo de plantas ruderais. Florianópolis-SC, safra 2016/2017.

Híbridos	INCI (%)			INCU (dias)			LATE (dias)		
	S/H	C/H	Média <sup>1</sup>	S/H	C/H	Média <sup>1</sup>	S/H	C/H	Média <sup>1</sup>
NGM	4,75 b	3,50 b	4,13 c	22,5 a	22,75 a	22,63 a	28,25 a	28,00 a	28.13 a
Hx	23,75 b	21,25 b	22,50 b	19,75 a	22,00 a	19,88 b	24,75 ab	26,25 a	25,50 ab
Hxrr	60,00 a	57,50 a	58,75 a	16,00 b	16,75 b	16,13c	19,50 b	18,50 b	19,00 b
Média <sup>2</sup>	29,50	27,42		19,42	20,50		24,17	24,25	
CV (%) <sup>3</sup>	40,81	33,73		8,62	6,17		15,99	10,67	
Gen (ind.) <sup>4</sup>	0,000	0,000		0,000	0,001		0,000	0,002	
Gen (conj.) <sup>5</sup>	0,000			0,000			0,000		
Ambiente <sup>6</sup>	0,64 <sup>ns</sup>			0,66 <sup>ns</sup>			0,95 <sup>ns</sup>		
Int. GxA <sup>7</sup>	0,99 <sup>ns</sup>			1,0 <sup>ns</sup>			0,69 <sup>ns</sup>		

<sup>1</sup>Média da análise conjunta dos dois sistemas de manejos. <sup>2</sup>Média de cada sistema de manejo. <sup>3</sup>Coefficiente de variação das análises de variância individual. <sup>4</sup>Efeito de cada manejo de plantas ruderais (*p* valor). <sup>5</sup>Efeito dos dois manejos de plantas ruderais (*p* valor). <sup>6</sup>Efeito entre sistemas de manejo das plantas ruderais da análise conjunta (*p* valor). <sup>7</sup>Efeito da interação genótipo x sistema de manejo (*p* valor); <sup>ns</sup>Não significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste F. As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. S/H: capina manual; C/H: aplicação do herbicida glufosinato de amônio.

Com base nesses resultados, pode-se afirmar que a transgenia diminuiu a capacidade da planta resistir ao patógeno, nessa etapa inicial de estabelecimento da doença, e de forma mais contundente no híbrido transgênico Hxrr, portador de uma maior quantidade de transgenes/eventos (*cry1F*, *pat*, *cp4epsps*/TC1507, NK603), em relação ao híbrido Hx (*cry1F*, *pat*/TC1507). Considerando que a diferença genética entre os três híbridos decorre somente da ausência de transgenes ou da inserção de um ou dois eventos combinados, então as variações do grau de resistência entre os três híbridos, nessa fase inicial de estabelecimento da helmintosporiose, pode ser atribuída à transgenia e sobretudo ao piramidamento de eventos/transgenes.

Os híbridos isogênicos formaram três grupos distintos, considerando a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), estabelecida a partir da análise de regressão da severidade foliar no tempo nas duas safras (2013 e 2016/2017) e dois sistemas de manejo de plantas ruderais (S/H e C/H) (Tabela 3; Figura 7). Os valores estimados para os coeficientes de determinação da regressão ( $r^2$ ) foram iguais ou superiores a 93%. Isso indica um bom ajuste das equações de regressão linear aos dados de severidade avaliados no tempo, para todos os tratamentos, safras e sistemas de manejo de plantas ruderais.

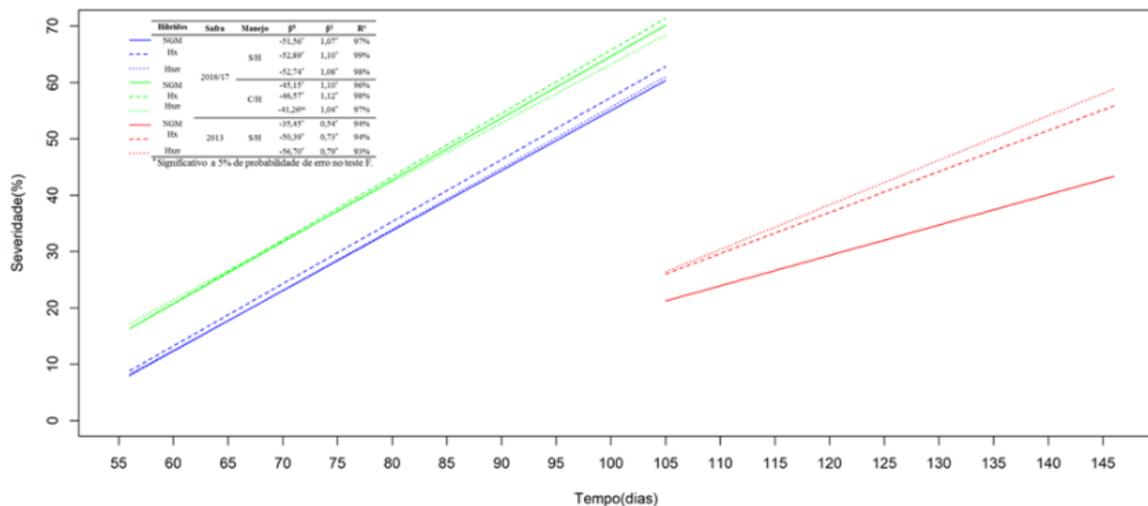
Os maiores valores de AACPD foram estimados para os híbridos cultivados no ambiente manejado com herbicida, no experimento conduzido na safra 2016/2017. O segundo grupo com os maiores valores de AACPD, mas inferiores em relação ao grupo anterior, foram formados pelos híbridos isogênicos cultivados na mesma safra, mas cujas plantas ruderais foram controladas por meio de capinas manuais. Por este mesmo sistema de manejo foi conduzido o experimento da safra 2013 e, nesse caso, o valor médio da AACPC para os híbridos foram menores, mas não significativamente diferentes do segundo grupo avaliado na safra 2016/2017 e no mesmo sistema de manejo. Esses resultados indicam que o grau médio de resistência dos híbridos está associado ao sistema de manejo das plantas ruderais, independentemente do genótipo e da safra, e que uma maior resistência é manifestada pelos híbridos cultivados em ambiente manejado por capina manual (Tabela 3; Figura 7).

**Tabela 3.** Médias dos híbridos isogênicos de milho NGM (não geneticamente modificado), Hx (portador do evento TC1507), Hxrr (portador dos eventos TC1507 + NK603) para a variável AACPD da helmintosporiose, avaliadas experimentalmente em dois sistemas de manejo de plantas ruderais. Florianópolis-SC, safras 2013 e 2016/2017.

Híbridos	AACPD								
	Safr 2016/17			Safr 2013			Safr 2016/17		
	S/H	C/H	Média <sup>1</sup>	S/H	S/H	Média <sup>1</sup>	S/H	C/H	Média <sup>1</sup>
NGM	1688,33	1918,98	1803,66	1300,02 b	1688,33	1494,18	1300,02 b	1918,98	1803,66
HX	1633,66	1951,57	1792,62	1633,68 a	1633,66	1633,67	1633,68 a	1951,57	1792,62
HXrr	1602,35	1948,56	1775,46	1722,59 a	1602,35	1662,47	1722,59 a	1948,56	1775,46
Média <sup>2</sup>	1641,45A	1939,70B		1552,10	1641,45		1552,10A	1939,70B	
CV (%) <sup>3</sup>	17,33	8,36		9,25	17,33		9,25	8,36	
Gen (ind.) <sup>4</sup>	1,00 <sup>ns</sup>	1,00 <sup>ns</sup>		0,01	1,00 <sup>ns</sup>		0,01	1,00 <sup>ns</sup>	
Gen (conj.) <sup>5</sup>		0,89 <sup>ns</sup>		0,15 <sup>ns</sup>			0,06 <sup>ns</sup>		
Ambiente <sup>6</sup>		0,00		0,12 <sup>ns</sup>			0,05		
Int. GxA <sup>7</sup>		0,96 <sup>ns</sup>		0,21 <sup>ns</sup>			0,22 <sup>ns</sup>		

<sup>1</sup>Média da análise conjunta dos dois sistemas de manejos. <sup>2</sup>Média de cada sistema de manejo. <sup>3</sup>Coeficiente de variação das análises de variância individual. <sup>4</sup>Efeito de cada manejo de plantas ruderais (*p* valor). <sup>5</sup>Efeito dos dois manejos de plantas ruderais (*p* valor). <sup>6</sup>Efeito entre sistemas de manejo das plantas ruderais da análise conjunta (*p* valor). <sup>7</sup>Efeito da interação genótipo x sistema de manejo (*p* valor); <sup>ns</sup>Não significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste F. As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. S/H: capina manual; C/H: aplicação do herbicida glufosinato de amônio.

**Figura 7.** Regressões lineares da severidade da helmintosporiose (AACPD) para três híbridos isogênicos em dois sistemas de manejo das plantas ruderais (sem aplicação de herbicida-S/H e com aplicação do herbicida).



Fonte: O autor.

Os híbridos isogênicos diferiram significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ) para a AACPD, apenas no experimento conduzido na safra 2013 e, nesse caso, a AACPD foi calculada com base nas avaliações de severidade da helmintosporiose efetuadas aos 105, 111, 123, 137 e 146 DAP (Tabela 3). O híbrido convencional (NGM), nesse mesmo experimento, foi mais resistente do que os dois híbridos isogênicos transgênicos (Hx e Hxrr), fato esse evidenciado por uma estimativa de AACPD cerca de 16% menor do que a média geral do experimento conduzido naquela safra. Por outro lado, em ambos os experimentos conduzidos na safra 2016/2017, os híbridos isogênicos não diferiram significativamente entre si para essa mesma variável, a partir de avaliações de severidade efetuadas aos 55, 63, 70, 77, 84, 91, 98 e 105 DAP (Tabela 3; Figura 7). Esses resultados evidenciam que é possível discriminar a resistência à helmintosporiose dos híbridos isogênicos entre si quando os sintomas da doença iniciam em estádios mais avançados do desenvolvimento da planta, tal como ocorreu no experimento da safra 2013, em condições naturais de ocorrência da helmintosporiose. Note que no experimento da referida safra, a doença manifestou-se naturalmente após os florescimentos masculino e feminino, enquanto nos experimentos conduzidos na safra 2016/2017, em presença e ausência de controle

químico das plantas ruderais, o patógeno foi inoculado aos 36 DAP, quando as plantas ainda se encontravam entre os estádios vegetativos V6 a V7 (Figura 7).

Para a análise conjunta dos experimentos conduzidos sob diferentes sistemas de manejo das plantas ruderais, seja da mesma safra (2016/2017) ou de diferentes safras (2016/2017 e 2013), as diferenças ocorreram entre os sistemas de manejo das plantas ruderais (Tabela 2), reforçando mais uma vez a influência do sistema de manejo usado para o controle das plantas ruderais sobre a reação de resistência da planta à helmintosporiose. Na safra 2016/17, os híbridos isogênicos NGM, Hx e Hxrr, avaliados no ambiente manejado com HBGA, apresentaram estimativas médias de AACPD aproximadamente 15% maiores do que a média dos híbridos isogênicos cultivados no ambiente manejado por meio de capinas manuais. Os híbridos avaliados em safras distintas (safras 2016/2017 e 2013) e por meio de manejos distintos das plantas ruderais também mostraram essa mesma tendência, tanto que a média da AACPD, estimada para os híbridos avaliados no experimento manejado com herbicida, foi  $\approx 21\%$  maior do que a média dos híbridos cultivados apenas com auxílio de capinas manuais (Tabela 3).

Os resultados da Tabela 3 ainda evidenciam que a aplicação de HBGA compromete não apenas a resistência à helmintosporiose dos híbridos transgênicos, mas também do híbrido convencional (NGM), que compartilha do mesmo ambiente experimental manejado quimicamente por proximidade espacial. A esse respeito é relevante destacar que o híbrido convencional (NGM) não recebeu a aplicação do herbicida em nenhum dos dois experimentos conduzidos na safra 2016/2017, pelo fato de não ser portador do transgene *pat*, que confere tolerância ao HBGA. Porém, assim como os híbridos transgênicos (Hx e Hxrr), o valor da AACPD foi maior para o híbrido NGM cultivado no experimento manejado na presença de HBGA, nas parcelas correspondentes aos híbridos transgênicos (Hx e Hxrr) (Tabela 3). Esses resultados são intrigantes e sugerem que os genótipos de milho mais resistentes a helmintosporiose, em ambientes sob menor pressão de inóculo no seu entorno, podem ser afetados negativamente quando cultivados próximos a genótipos mais afetados pela doença, em decorrência do uso de tecnologia química para controle de plantas ruderais. O impacto do controle químico das plantas ruderais sobre a resistência a helmintosporiose é uma preocupação relevante para aquelas regiões

com rica diversidade genética, onde convivem dois sistemas tecnológicos contrastantes de produção de milho.

### 3.2 EFEITOS DA TRANSGENIA SOBRE OS ESTÁDIOS FENOLÓGICOS, RENDIMENTO DE GRÃOS E SEUS COMPONENTES

A Tabela 4 contém os resultados das análises de variância individuais e conjunta para os caracteres florescimento masculino (FM) e florescimento feminino (FF), expressos em graus-dias, avaliados a partir de três híbridos isogênicos da série BG7060, em dois manejos de plantas ruderais. Os valores estimados para o coeficiente de variação de cada experimento variaram de 1,94% (S/H) a 3,05% (C/H) e de 2,97% (S/H) a 2,69% (C/H), para as variáveis FM e FF, respectivamente, indicando que os fatores de variação não controlados pelas técnicas experimentais foram de pequena magnitude.

**Tabela 4.** Médias dos híbridos isogênicos de milho NGM (não geneticamente modificado), Hx (portador do evento TC1507), Hxrr (portador dos eventos TC1507 + NK603) para as variáveis fenológicas florescimento masculino (FM) e florescimento feminino (FF), avaliadas experimentalmente em dois sistemas de manejo de plantas ruderais. Florianópolis-SC, safra 2016/2017.

Híbridos	FM (graus-dias)			FF (graus-dias)		
	S/H	C/H	Média <sup>1</sup>	S/H	C/H	Média <sup>1</sup>
NGM	745,03	795,03	770,03	769,78	851,33	810,55
Hx	761,45	761,53	761,49	794,73	836,70	815,71
Hxrr	749,15	786,50	767,83	769,70	848,13	808,91
Média <sup>2</sup>	751,87	781,02		778,07	845,38	
	A	B		A	B	
CV (%) <sup>3</sup>	1,94	3,05		2,97	2,69	
Gen (ind.) <sup>4</sup>	0,3 <sup>ns</sup>	0,20 <sup>ns</sup>		0,28 <sup>ns</sup>	1,00 <sup>ns</sup>	
Gen(conj.) <sup>5</sup>	0,60 <sup>ns</sup>			0,93 <sup>ns</sup>		
Ambiente <sup>6</sup>	0,01			0,00		
Int. GxA <sup>7</sup>	0,10 <sup>ns</sup>			0,17 <sup>ns</sup>		

<sup>1</sup>Média da análise conjunta dos dois sistemas de manejos. <sup>2</sup>Média de cada sistema de manejo. <sup>3</sup>Coeficiente de variação das análises de variância individual. <sup>4</sup>Efeito de cada manejo de plantas ruderais ( $p$  valor). <sup>5</sup>Efeito dos dois manejos de plantas ruderais ( $p$  valor). <sup>6</sup>Efeito entre sistemas de manejo das plantas ruderais da análise conjunta ( $p$  valor). <sup>7</sup>Efeito da interação genótipo x sistema de manejo ( $p$  valor); <sup>ns</sup>Não significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste F. As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. S/H: capina manual; C/H: aplicação do herbicida glufosinato de amônio.

Os híbridos isogênicos não diferiram entre si para os dois caracteres fenológicos (FM e FF), mas as diferenças significativas foram detectadas entre sistemas de manejo de plantas ruderais ( $p \leq 0,05$ ), para essas mesmas variáveis. Os híbridos isogênicos cultivados no experimento manejado com HBGA apresentaram maiores valores de graus-dias para o florescimento masculino (4% maior) e feminino (8% maior), em relação aos híbridos sob o manejo de plantas ruderais por meio de capinas manuais. Neste caso, a presença do HBGA gerou um prolongamento maior do florescimento masculino, em 30 graus dias, e do florescimento feminino, em 70 graus dias.

Para o rendimento de grão (PROD) e seus componentes (NGF, CE, DE, DS, PECP, PESP e P1000), não foram constatadas diferenças significativas entre os três híbridos isogênicos, independentemente do sistema de manejo das plantas ruderais, exceto para a variável DE, avaliada a partir dos híbridos cultivados no experimento manejado por meio de capinas manuais. Nesse caso, um menor diâmetro de espiga foi observado para o híbrido convencional, sendo aproximadamente 1% menor do que a estimativa da média de tratamentos daquele experimento. Assim como foi observado para os atributos fenológicos, em geral, as diferenças foram significativas pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ) apenas entre os sistemas de manejo das plantas ruderais (Tabelas 5 e 6). Os valores estimados para os coeficientes de variação de cada experimento, em percentagem da média geral, variaram de 8,80 (S/H) a 5,67 (C/H), de 7,20 (S/H) a 5,89 (C/H), de 3,94 (S/H) a 4,13 (C/H), de 3,74 (S/H) a 4,73 (C/H), de 15,23 (S/H) a 12,79 (C/H), de 15,42 (S/H) a 13,78 (C/H), de 7,47 (S/H) a 6,65 (C/H) e de 16,25 (S/H) a 24,03 (C/H), para as variáveis NGF, CE, DE, DS, PECP, PESP, P1000 e PROD, nessa ordem (Tabelas 5 e 6).

No experimento submetido ao manejo das plantas ruderais com a aplicação de HBGA, as médias de tratamentos foram inferiores para todas as variáveis, em comparação às médias estimadas a partir do experimento manejado por meio de capinas manuais, cujos valores aproximados foram menores para as variáveis NGF (8%), CE (6%), DE (8%), DS (6%), PECP (24%), PESP (25%), P1000 (18%) e PROD (31%), respectivamente (Tabela 4). A variável PROD foi a que apresentou a maior perda (31%), no ambiente manejado com a adição de HBGA. Esses dados sugerem que a adição de HBGA para o controle químico das plantas ruderais, em cultivo com

milho acometido pela helmintosporiose, prejudica o desempenho agronômico do milho independente da presença ou ausência e do número de transgenes/eventos que os híbridos possuem. Considerando que o híbrido convencional não foi manejado com HBGA em ambos os experimentos, a menor performance agronômica do híbrido NGM no experimento manejado quimicamente pode ter sido um efeito indireto da maior pressão de inóculo proveniente dos tratamentos mais suscetíveis (Hx e Hxrr) manejados quimicamente no mesmo experimento.

**Tabela 5.** Médias dos híbridos isogênicos de milho NGM (não geneticamente modificado), Hx (portador do evento TC1507), Hxrr (portador dos eventos TC1507 + NK603) para as variáveis NGF (número de grãos por fileira), CE (comprimento da espiga), DE (diâmetro da espiga) e DS (diâmetro do sabugo), avaliadas experimentalmente em dois sistemas de manejo de plantas ruderais. Florianópolis-SC, safra 2016/2017.

Híbridos	NGF			CE (cm)			DE (cm)			DS (cm)		
	S/H	C/H	Média <sup>1</sup>	S/H	C/H	Média	S/H	C/H	Média	S/H	C/H	Média
NGM	32,33	28,58	30,45	15,64	14,64	15,14	45,24b	41,75	43,39	27,01	25,87	26,44
Hx	31,01	30,28	30,65	15,30	14,51	14,90	45,72a	42,79	44,26	27,35	26,35	26,85
Hxrr	32,22	28,71	30,46	15,58	14,56	15,07	46,32a	41,87	44,09	28,24	25,53	26,88
Média <sup>2</sup>	31,85A	29,19B		15,51A	14,57B		45,76A	42,07B		27,53A	25,92B	
CV <sup>3</sup>	8,80	5,67		7,20	5,89		3,94	4,13		3,74	4,73	
Gen.(ind.) <sup>4</sup>	1,00 <sup>ns</sup>	0,11 <sup>ns</sup>		1,00 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>		1,00 <sup>ns</sup>	0,19 <sup>ns</sup>		0,29 <sup>ns</sup>	0,25 <sup>ns</sup>	
Gen(conj) <sup>5</sup>	0,98 <sup>ns</sup>			0,89 <sup>ns</sup>			0,55 <sup>ns</sup>			0,71 <sup>ns</sup>		
Ambiente <sup>6</sup>	0,02			0,04			0,00			0,00		
GxA <sup>7</sup>	0,41 <sup>ns</sup>			0,97 <sup>ns</sup>			0,66 <sup>ns</sup>			0,30 <sup>ns</sup>		

<sup>1</sup>Média da análise conjunta dos dois sistemas de manejos. <sup>2</sup>Média de cada sistema de manejo. <sup>3</sup>Coefficiente de variação das análises de variância individual. <sup>4</sup>Efeito de cada manejo de plantas ruderais (*p* valor). <sup>5</sup>Efeito dos dois manejos de plantas ruderais (*p* valor). <sup>6</sup>Efeito entre sistemas de manejo das plantas ruderais da análise conjunta (*p* valor). <sup>7</sup>Efeito da interação genótipo x sistema de manejo (*p* valor); <sup>ns</sup>Não significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste F. As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. S/H: capina manual; C/H: aplicação do herbicida glufosinato de amônio.

**Tabela 6.** Médias dos híbridos isogênicos de milho NGM (não geneticamente modificado), Hx (portador do evento TC1507), Hxrr (portador dos eventos TC1507 + NK603) para as variáveis rendimento de grãos e seus componentes, PECP (peso das espigas com palha), PESP (peso das espigas sem palha), P1000 (peso de mil grãos) e PROD (produtividade), avaliadas experimentalmente em dois sistemas de manejo de plantas ruderais. Florianópolis-SC, safra 2016/2017.

Híbridos	PECP (Kg)			PESP (Kg)			P1000 (g)			PROD (t. ha <sup>-1</sup> )		
	S/H	C/H	Média	S/H	C/H	Média	S/H	C/H	Média	S/H	C/H	Média
NGM	3,43	2,48	2,95	3,08	2,17	2,63	268,15	206,82	237,49	13,43	8,66	11,05
Hx	3,19	2,57	2,88	2,89	2,29	2,59	243,06	204,82	223,94	12,26	9,14	10,70
Hxrr	3,34	2,53	2,93	3,04	2,28	2,66	251,43	217,13	234,28	13,38	9,00	11,19
Média <sup>2</sup>	3,32A	2,52B			2,24B		254,21A	209,50B		13,0A	8,9B	
				3,00A								
CV <sup>3</sup>	15,23	12,79		15,42	13,78		7,47	6,65		16,25	24,03	
Gen. (ind.) <sup>4</sup>	1,00 <sup>ns</sup>	1,00 <sup>ns</sup>		1,00 <sup>ns</sup>	1,00 <sup>ns</sup>		0,24 <sup>ns</sup>	1,00 <sup>ns</sup>		1,00 <sup>ns</sup>	1,00 <sup>ns</sup>	
Gen (conj.) <sup>5</sup>		0,94 <sup>ns</sup>			0,93 <sup>ns</sup>			0,27 <sup>ns</sup>			0,90 <sup>ns</sup>	
Ambiente <sup>6</sup>		0,00			0,00			0,00			0,00	
GxA <sup>7</sup>		0,75 <sup>ns</sup>			0,74 <sup>ns</sup>			0,25 <sup>ns</sup>			0,73 <sup>ns</sup>	

<sup>1</sup>Média da análise conjunta dos dois sistemas de manejos. <sup>2</sup>Média de cada sistema de manejo. <sup>3</sup>Coefficiente de variação das análises de variância individual. <sup>4</sup>Efeito de cada manejo de plantas ruderais (*p* valor). <sup>5</sup>Efeito dos dois manejos de plantas ruderais (*p* valor). <sup>6</sup>Efeito entre sistemas de manejo das plantas ruderais da análise conjunta (*p* valor). <sup>7</sup>Efeito da interação genótipo x sistema de manejo (*p* valor); <sup>ns</sup>Não significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste F. As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. S/H: capina manual; C/H: aplicação do herbicida glufosinato de amônio.

## 4.0 DISCUSSÃO

### 4.1 EFEITOS DA TRANSGENIA SOBRE A RESISTÊNCIA A HELMINTOSPORIOSE

Trabalhos que avaliam a resistência das plantas a patógenos fúngicos, como organismos não-alvo das cultivares transgênicas, são escassos e os poucos estudos disponíveis na literatura, em geral, não mostram o efeito da presença dos transgenes ou da transgenia sobre a reação da planta e consequente desenvolvimento de doenças foliares. Os poucos estudos publicados sobre patossistemas envolvendo doenças fúngicas e plantas transformadas geneticamente analisam os efeitos dos eventos/transgenes sobre as interações de resistência do milho a fungos do gênero *Fusarium* (CLEMENTS et al. 2003; GATCH; MUNKVOLD, 2002; MUNKVOLD; HELLMICH, 1999; MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; MUNKVOLD et al. 1997). Com relação aos efeitos causados pelos eventos TC1507 e NK603 sobre a severidade foliar da helmintosporiose do milho, os trabalhos são inexistentes. Essa constatação reforça a necessidade de pesquisas envolvendo as interações estabelecidas entre microrganismos, plantas e transgenes.

No âmbito foliar, a escassez de estudos também ocorre para as interações entre microrganismos endofíticos e plantas transgênicas. Esses microrganismos estabelecem íntima interação simbióticas com as plantas hospedeiras, podendo trazer benefícios para o crescimento de raízes, aumento de área foliar e absorção de nutrientes e água, adaptação para as plantas expostas a condições abióticas de ambientes adversos (NAVEED et al., 2014; WORCHEL et al., 2013; REDMAN et al., 2011) e benefícios para os mecanismos de defesa da planta frente aos fatores de estresse biótico (GANLEY et al., 2008; HARDOIM et al., 2008; AZEVEDO et al., 2000; VAN LOON et al., 1998). A íntima interação simbiótica planta-endófitos são interessantes para estudos de efeito da transformação genética sobre e o comportamento das plantas, considerando que as alterações da diversidade das comunidades endofíticas podem acarretar mudanças significativas sobre a capacidade de crescimento e adaptação da planta (VANDENKOORNHUYSE et al., 2015; KIERS; VAN HEIJDEN, 2006), tal como a reação de resistência aos fitopatógenos.

Um estudo conduzido por Silva et al. (2016a) mostra os efeitos da transgenia a partir de interações planta e microrganismos endofíticos da folha do milho. Os autores

analisaram a estrutura das comunidades dos endófitos foliares bacterianos e fúngicos usando os mesmos híbridos isogênicos transgênicos (Hx e Hxrr) e convencional (NGM) do presente estudo, além de uma variedade crioula de milho conservada por agricultores do Extremo Oeste de Santa Catarina, no Sul do Brasil. Os resultados mostraram que os fungos são os endófitos foliares do milho que sofrem alterações na estrutura de suas comunidades, em função do genótipo da planta, da presença e ausência de transgenes e da quantidade de transgenes/eventos inseridos na planta transformada geneticamente. No entanto, a pesquisa realizada por esses autores não analisou se essas alterações das comunidades endofíticas traziam algum prejuízo ao crescimento, desenvolvimento, desempenho e adaptação do milho. A esse respeito, o experimento da safra 2013 do presente estudo fornece importantes evidências, uma vez que este foi o mesmo experimento no qual Silva et al. (2016) realizaram suas pesquisas.

Os dados mostraram que existe uma forte associação entre genótipos do milho, comunidades de endófitos e resistência à helmintosporiose, considerando os seguintes aspectos: (i) nos estádios vegetativos, o híbrido convencional foi diferenciado dos dois híbridos transgênicos (Hx e Hxrr) quanto a estrutura das comunidades de fungo endofíticos (SILVA et al., 2016a), enquanto que no presente estudo na safra 2013, foram constatadas diferenças correspondentes ao grau de resistência (AACPD) a helmistosporiose entre os mesmos híbridos (Tabela 3; Figura 1); (ii) no estágio reprodutivo R1, o híbrido Hxrr se diferenciou dos demais híbridos isogênicos (NGM e Hx) quanto aos endófitos fúngicos foliares (SILVA et al., 2016a), enquanto no presente estudo esse híbrido apresentou maior suscetibilidade a helmintosporiose em relação aos híbridos NGM e Hx (Tabela 3; Figura 7). Essas constatações são evidências de que a menor resistência à helmintosporiose apresentada pelos híbridos Hx e Hxrr ( $p \leq 0,05$ ), em relação à versão isogênica NGM (Tabela 3; Figura 7), pode estar associada à estrutura particular das comunidades foliares dos endófitos desses híbridos, nos estádios vegetativos (Silva et al., 2016a). Embora a AACPD de Hxrr não tenha diferido significativamente de Hx, o menor grau de resistência de Hxrr (Tabela 3; Figura 7), em relação aos demais híbridos isogênicos, pode estar associado à estrutura diferenciada de comunidades de endófitos fúngicos foliares, no estágio reprodutivo R1 (Silva et al., 2016a). Essa tendência sugere que o piramidamento de transgenes/eventos em Hxrr proporcionou uma maior redução da resistência do milho à helmistosporiose.

Esse comportamento inferior do híbrido Hxrr em relação aos demais também se repetiu nos dois experimentos conduzidos na safra 2016/2017, a partir da avaliação da incidência (INCI) e dos caracteres monocíclicos da helmintosporiose (INCU e LATE), mas não para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os maiores períodos de incubação e latência e a menor incidência ( $p \leq 0,05$ ), apresentados pelo híbrido isogênico convencional (NGM), sugerem que a transgenia favorece o estabelecimento inicial da helmintosporiose, principalmente para o híbrido transgênico Hxrr, que acumula a combinação de dois eventos (Tabela 2). Entretanto, nesses dois experimentos da safra 2016/2017, não foi objeto de análise associar as mudanças das comunidades de endófitos foliares à reação de resistência da planta a esse patógeno.

O desenvolvimento de uma pirâmide de transgenes tem sido uma estratégia usada para o controle de fatores bióticos sob a alegação da presença de efeitos sinérgicos decorrentes da combinação das proteínas produzidas pelas plantas portadoras de transgenes combinados em um mesmo genótipo (ALZATEMARIN et al., 2005; KELLY et al., 1994). Todavia, esses estudos desconsideram os efeitos negativos dessas combinações de genes exógenos sobre a expressão de outros caracteres da planta, sobretudo com relação a reação sobre organismos não alvo dos transgenes. Exemplo dessa assertiva foi fornecido pelo trabalho de Bowers et al. (2013), que avaliou os efeitos dos transgenes *cry1Ab* e *vip3Aa* separadamente e piramidados, em grãos de milho transgênicos contaminados pela micotoxina fumonisina, derivada de fungos do gênero *Fusarium*. A produção combinada das proteínas dos transgenes *cry1Ab* e *vip3A* é considerada uma técnica promissora para a construção de plantas piramidadas, visando o controle simultâneo das espécies *Anticarsia gemmatalis* (lagarta-da-soja) e *Chrysodeixis includens* (lagarta falsa-medideira), pois, quando combinados, os transgenes supostamente apresentam efeito sinérgico sobre o controle das pragas do milho alvejadas pelo transgênico. No estudo realizado por Bowers et al. (2013), os autores observaram que a combinação de ambos os transgenes em um único genótipo torna a planta mais propensa a produzir grãos de baixa qualidade e com elevado percentual de danos por fumonisina, em comparação aos híbridos que expressam as proteínas individuais destes dois transgenes.

Em outro trabalho realizado por Londo et al. (2011), com intuito de examinar os efeitos da combinação de transgenes, foi desenvolvido um genótipo piramidado de

canola (*Brassica napus* L.), a partir de uma população segregante F2 que expressa tanto resistência ao herbicida a base de glifosato (*CP4 EPSPS*), quanto resistência a insetos lepidópteros (*Cry1Ac*). As características associadas à aptidão foram avaliadas entre esse genótipo portador da pirâmide e cinco outros genótipos de *Brassica*, em comunidades de mesocosmos construídos e expostos a herbivoria da traça das crucíferas (*Plutella xylostella* L.) ou a deriva de herbicida a base de glifosato. A biomassa vegetativa, a produção de sementes e a fecundidade relativa foram reduzidas em plantas piramidadas com transgenes, quando comparadas às plantas não transgênicas.

Em outro trabalho desenvolvido por Waquil et al. (2002), os autores verificaram interações entre diferentes transgenes expressando a proteína Bt (*Cry1F*, *Cry1Ab*, *Cry1Ac* e *Cry9c*) e inseridos em diferentes genótipos de milho. Os autores constataram a presença de interação entre os transgenes e os genótipos da planta no controle das pragas alvejadas pelos transgenes, ao avaliarem a sobrevivência e o desenvolvimento larval de pragas expostas a uma toxina produzida por diferentes híbridos de milho portadores do mesmo transgene. O efeito dessa interação resultou em respostas diferenciadas do transgene inserido em diferentes genótipos quanto à capacidade de sobrevivência, produção de biomassa das larvas, dano foliar e produtividade de grãos.

O fato é que as interações gênicas entre transgenes são pouco conhecidas, e suas consequências potenciais no epigenoma dos novos organismos menos ainda. Cabe ressaltar que os produtos de expressão da transgenia interagem com fatores ambientais, podendo resultar em efeitos distintos daqueles esperados ou mesmos observados de forma isolada. Além disso, dificuldades de simulação e projeção impedem que com base em informações coletadas na ausência daquelas combinações, se realizem inferências adequadas sobre possíveis impactos relacionados à escala de adoção e à sinergia de produtos dessas tecnologias (FERMENT et al., 2015).

Nos ensaios da safra 2016/2017, a ausência de diferenças entre os híbridos isogênicos quanto a AACPD (Tabela 3) é outro resultado que merece reflexão, pois, ao contrário do exposto acima, a reação de resistência das plantas, expressa por essa variável, não esteve associada aos eventos de transformação isolados ou piramidados nos híbridos isogênicos. Ao invés disso, as diferenças ocorreram entre os híbridos manejados em sistemas distintos de controle das plantas ruderais (capinas manuais

e HBGA), tanto que a média dos três híbridos isogênicos foram significativamente ( $p \leq 0,05$ ) mais suscetíveis no ambiente manejado pelo herbicida (Tabela 3; Figura 7). Ao comparar o híbrido convencional (NGM), cultivado ao lado dos híbridos transgênicos (Hx e Hxrr) manejados quimicamente (experimento C/H), com o mesmo híbrido cultivado no experimento manejado por capinas manuais (S/H), o valor da AACPD para o híbrido NGM do experimento C/H foi superior ao valor estimado no experimento S/H, embora este tratamento não tivesse sido manejado com herbicida em ambos os experimentos.

Os estudos de Severns et al. (2014) e Estep et al. (2014) fornecem algumas pistas para esse comportamento particular do híbrido convencional das fases iniciais e de progresso de desenvolvimento da doença nos dois experimentos. Nesse trabalho realizado com diferentes linhagens resistentes e susceptíveis de trigo a ferrugem amarela do trigo (*Puccinia striiformis*), os autores concluíram que, independentemente da diferença de resistência entre os genótipos no foco inicial da doença, a epidemia produzida pelos genótipos mais suscetíveis vai exercer uma influência dominante sobre a epidemia subsequente, considerando a proximidade espacial entre os genótipos com diferentes graus de resistência. De fato, embora o híbrido NGM tenha sido significativamente mais resistente ( $p \leq 0,05$ ) no estabelecimento inicial da doença (INCI, INCU e LATE), independentemente do sistema de manejo das plantas ruderais (Tabela 2), essa diferença não se manteve com o progresso de desenvolvimento da doença. Ao invés disso, os três híbridos apresentaram uma velocidade de desenvolvimento da helmintosporiose muito similar dentro de cada um dos ambientes de manejo, que resultou na impossibilidade de distingui-los quanto a severidade (AACPD). Essa diferença na pressão de inóculo no entorno do híbrido convencional entre sistemas de manejo químico e manual também explica a menor resistência desse híbrido quando cultivado ao lado dos híbridos transgênicos manejados com HBGA. A maior suscetibilidade dos dois híbridos transgênicos cultivados no ambiente manejado com herbicida gerou uma maior pressão de inóculo sobre o híbrido convencional cultivado nesse experimento, em relação ao ambiente manejado com capinas manuais. Essa pressão de inóculo diferenciada também teve reflexos no grau de resistência apresentado por esse tratamento nos dois ambientes de controle das plantas ruderais, tanto que o híbrido convencional do experimento manejado por meio de capinas manuais foi significativamente mais resistente.

O presente estudo detectou um aumento de suscetibilidade de 18 a 25%, na média dos genótipos mais e menos resistentes, em função do manejo das plantas ruderais e safras, e sob as dimensões reduzidas das parcelas experimentais. A pressão de inóculo gerada a partir de genótipos menos resistentes a helmintosporiose pode ser ainda maior em condições reais de cultivo (KAISER et al., 2010), já que nestas áreas fatores relacionados ao clima (vento, umidade e temperatura) são intensamente atuantes, proporcionando nas áreas de maiores dimensões cultivadas com genótipos suscetíveis uma maior pressão de inóculo sobre áreas menores, independentemente do grau de resistência ou susceptibilidade dos genótipos (MARCUIZZO et al., 2015).

No Brasil, estima-se que a área cultivada com milho transgênico representa aproximadamente 94% da área total cultivada com milho no país (ISAAA, 2018) e a maioria confere resistência a insetos e tolerância a um ou mais herbicidas (CTNBio, 2018). Particularmente no Extremo Oeste do estado de Santa Catarina, no Sul do país, onde predominam unidades de produção familiares (98%) (IBGE, 2010), estima-se que a área cultivada com milho transgênico represente de 40 a 65% da área total cultivada com esse cultivo, enquanto as dimensões médias das lavouras de milho transgênicas são de 2,7 a 31,7 vezes maiores em relação às lavouras cultivadas com híbridos convencionais, variedades de polinização aberta e variedades locais (dados não publicados). Nessas condições, as diferenças entre genótipos quanto ao grau de resistência e à pressão de inóculo podem contribuir para o aumento da demanda de fungicidas, visando o controle de helmintosporiose, sobretudo em áreas de produção de milho ricas em diversidade genética e diversas quanto aos sistemas de manejo de controle de plantas ruderais.

#### 4.2 EFEITOS INDIRETOS DA TRANSGENIA SOBRE A FENOLOGIA E CARACTÉRES DE RENDIMENTO

A maior severidade da doença (AACPD) (Tabela 3), o prolongamento da fenologia (30 graus dias para o FM e 70 graus dias para o FF) (Tabela 4) e a redução do rendimento de grãos e seus componentes (Tabelas 5 e 6) foram outras mudanças observadas nos híbridos isogênicos Hx e Hxrr, manejados com HBGA, e com o híbrido NGM manejado por capina manual, mas próximo aos tratamentos tratados com controle químico. Como hipótese para os efeitos observados, acreditamos que a

aplicação do herbicida para o controle das plantas ruderais, nas parcelas cultivadas com os híbridos transgênicos, deixou as mesmas mais susceptíveis à helmintosporiose (Tabelas 2 e 3 e Figura 7), desencadeando o prolongamento de características relacionadas a fenologia e a redução no rendimento de grãos e seus componentes.

Essa hipótese pode ser confirmada ao analisar o trabalho realizado por Carbonari et al. (2016), com algodão transgênico resistente a HBGA. A cultivar Liberty Link IMACD 6001- LL resistente ao herbicida apresentou intoxicação na faixa dos 15% para a maior dose  $3,0 \text{ L ha}^{-1}$ , aos 36 dias após a aplicação (DAA). Embora a cultivar WideStrike FM 975WS, também resistente ao HBGA, apresentasse comportamento semelhante à cultivar resistente LL, houve maior intoxicação, na faixa de 35% da morte das plantas para maior dose aplicada. Um dos resultados mais interessantes está relacionado a taxa de transporte de elétrons (ETR). Foi observada em plantas da cultivar Liberty Link a redução máxima da taxa de transporte de elétrons de 18% aos 22 DAA, enquanto a cultivar WideStrike apresentou redução máxima de 24% na ETR aos 2 DAA. A redução na ETR causa efeitos significativos no fotossistema I e II interferindo na redução da fotossíntese. Isso pode ter ocorrido com o milho resistente ao HBGA cultivado no sistema com aplicação de herbicida do presente estudo. Os efeitos gerados sob a redução da fotossíntese somados aos efeitos da helmintosporiose, que também reduzem a taxa fotossintética nas plantas hospedeiras (ZHANG et al., 2014), podem ter aumentado a severidade da helmintosporiose, prolongando os caracteres fenológicos FM e FF (Tabela 4) e reduzindo os caracteres associados ao rendimento e a produção de grãos (Tabelas 5 e 6).

Em plantas susceptíveis a helmintosporiose, foi relatado cerca de 90% de redução na taxa de fotossíntese quando a severidade excede 50% (REDDY et al., 2014). Isso ocorre porque estresses bióticos, como ataque de patógenos, reduzem a atividade fotosintética, causando perda maciça de integridade de organelas e de clorofila (DEL RÍO et al., 1998) reduzindo a produção de carboidratos, gorduras e proteínas (REDDY et al., 2014), causando senescência das folhas devido a acumulação de espécies reativas de oxigênio (PROCHAZKOVA et al., 2001).

A redução no potencial fotossintético da planta ocorre porque muitas proteínas envolvidas no metabolismo energético, destino e armazenamento de proteínas, e defesa da doença, apresentam níveis alterados em resposta a helmintosporiose. Na inoculação com *E. turcicum*. Algumas proteínas relacionadas à defesa, como a  $\beta$ -

glucosidase, superóxido desmutase, poliaminas oxidase e peptidilprolilisomerase cis/trans, são reguladas positivamente, enquanto a fotossíntese e as proteínas relacionadas ao metabolismo são reguladas de forma negativa. Esses resultados indicam que as plantas de milho resistentes a *E. turcicum* podem liberar diretamente proteínas de defesa, modulando o metabolismo primário e afetando a fotossíntese e o metabolismo de carboidratos (ZHANG et al., 2014).

Quando a área foliar atacada pela doença é grande, especialmente durante o período de enchimento do grão, na metade do florescimento até a maturidade fisiológica (REDDY et al., 2013; SEMANGUN, 2008), a formação de amido é retardada e os açúcares podem ser desviados do caule para o preenchimento dos grãos, acarretando o acamamento das plantas. Além disso, se a infecção espalhar para as folhas superiores nesta mesma fase, podem ocorrer perdas severas de rendimento (JAKHAR et al., 2017; MITTAL; BOORA, 2005).

Em trabalhos realizados por Raymondo e Hooker (1981) e Levy e Pataky (1992), a percentagem de perda de rendimento, devido à redução da taxa fotossintética das folhas com helmintosporiose, pode chegar a 63% para um híbrido susceptível de maturação precoce; 43% para um híbrido com resistência quantitativa e maturidade intermediária; e 17% para um híbrido com características quantitativas e qualitativas de resistências combinadas e amadurecimento tardio.

De maneira geral, a associação da aplicação do herbicida glufosinato de amônio nas parcelas com os híbridos transgênicos, associada a incidência da helmintosporiose, causaram prolongamento dos caracteres fenológicos e redução da produção, rendimento e seus componente.

Como precedentes para futuros trabalhos, temos duas questões. Primeiro quais seriam os efeitos do fluxo gênico entre transgênicos e não transgênicos levando em consideração as variedades crioulas e os efeitos causados pela helmintosporiose? Segundo, se fizermos uma avaliação isolando apenas o efeito do HBGA, excluindo o efeito da helmintosporiose, como seria o comportamento dos híbridos isogênicos transgênicos da série BG7060?

## 5.0 CONCLUSÕES

Os híbridos transgênicos com evento TC1507 combinado com NK603 apresenta maior incidência, menor período de incubação e menor período de latência da helmintosporiose em relação ao híbrido isogênico NGM.

A adição do herbicida glufosinato de amônio, nos híbridos com eventos transgênicos TC1507 isolado e combinado com NK603 influencia na maior susceptibilidade da helmintosporiose causando prolongamento de caracteres fenológicos e redução de caracteres de rendimento em milho.

## REFERÊNCIAS

AGAPITO-TENFEN, S.Z.; VILPERTE, V.; TRAAVIK, T.I.; NODARI, R.O. Systematic miRNome profiling reveals differential microRNAs in transgenic maize metabolism. **Environmental Sciences Europe**, 30:37, 2018.

AGBIOS. **Information on GM Approved Products (2008)**. Disponível em: <<http://www.agbios.com/dbase.php>>. Acesso em: 2 Maio. 2016.

AGROCERES. **Guia Agrocere de sanidade**. 2 edição. 1996. 72p.

ALBRECHT, L.P.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; ÁVILA, M. R.; ALBRECHT, A. J. P.; RICCI, T. T. Qualidade fisiológica das sementes de soja RR em resposta ao uso de diferentes tratamentos contendo glyphosate em aplicação sequencial. **Bioscience Journal**, v.27, n.2, p.211-220, 2011a.

ALDEMITA, R.R.; HAUTEA, R.A. Biotech Crop Planting Resumes High Adoption in 2016. **GM Crops & Food**, 2018.

ALZATE-MARIN, A.L., CERVIGNI, G.D.L., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. **Fitopatologia Brasileira**, 30(4): 333-342. 2005.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, 2000. Disponível em: <<http://ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/index.html>>. Acesso em: set. 2015.

BALIEIRO NETO, G.; CIVIDANES, T.M.S.; BRANCO, R.B.F.; BUENO, M.S.; POSSENTI, R.; JOSÉ RAMOS NOGUEIRA, J.R. Danos causados por pragas na estrutura, morfologia e composição de híbridos de milho *bt* para silagem. **B. Indústria Anim.**, v.70, n.3, p.252-260, 2013.

BENEVENUTO, R.F.; AGAPITO-TENFEN, S.Z.; VILPERTE, V.; WIKMARK, O-G.; VAN RENSBURG, P.J.; NODARI R.O. Molecular responses of genetically modified maize to abiotic stresses as determined through proteomic and metabolomic analyses. *PLoS ONE* 12(2): e0173069, 2017.

BENTOLILA, S.; GUITTON, C.; BOUVET, N.; SAILAND, A.; NYKAZA, S. Identification of RFLP marker tightly linked to the Ht1 gene in maize. *Theor. Appl. Genet.*, 82: 393–398, 1991.

BIOGENE, Híbridos de Milho: BG7060. DuPont: Pioneer, 2016. Disponível em: <http://www.biogene.com.br/milho/produtos/bg7060>. Acesso em: 05 mar, 2016.

BLEICHER, J. **Níveis de resistência a *Helminthosporium turcicum* Pass. em três ciclos de seleção em milho pipoca (*Zea mays* L.)**. Piracicaba. 1988. 130p. Tese (Doutorado) - ESALQ – SP, 1988.

BOWERS, E.L.; HELLMICH, R.L.; MUNKVOLD, G.P. *Vip3Aa* and *Cry1Ab* proteins in maize reduce *Fusarium* ear rot and fumonisins by deterring kernel injury from multiple Lepidopteran pests. *World Mycotoxin Journal*, 6: 2, 127-135, 2013.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley & Sons, 1990.

CARBONARI, C.A.; LATORRE, D.O.; GOMES, G.L.G.C.; VELINI, E.D.; OWENS, D.K.; PAN, Z.; DAYAN, F.E. Resistance to glufosinate is proportional to phosphinothricin acetyltransferase expression and activity in LibertyLink® and WideStrike® cotton. *Planta*, v. 1, p.1-9, 2016.

CARSON, M.L.; VAN DYKE, C.G. Effect of light and temperature on expression of partial resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. *Plant Disease*, v.78, p.519-522, 1994.

CÉLERES – your agribusiness intelligence. Adoção de biotecnologia 2016/17: análise geral. **INFORMATIVO BIOTECNOLOGIA**, v.16, n.3, 09 dez. 2016.

CERA - Center for Environmental Risk Assessment. **GM Crop Database**. ILSI Research Foundation, Washington D.C., 2010. Disponível em: [http://cera-gmc.org/index.php?action=gm\\_crop\\_database](http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database). Acesso em: 10 out. 2016.

CHEEKE, T.E.; DARBY, H.; ROSENSTIEL, T.N.; BEVER, J.D.; CRUZAN, M.B. Effect of *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize cultivation history on arbuscular mycorrhizal fungal colonization, spore abundance and diversity, and plant growth. *Agric. Ecosys. Environ.*, 195: 29–35, 2014.

CHEEKE, T.E.; ROSENSTIEL, T.N.; CRUZAN, M.B. Evidence of reduced arbuscular mycorrhizal fungal colonization in multiple lines of *Bt* maize. *Am. J. Bot.*, 99: 700–707, 2012.

CLEMENTS, M, J., CAMPBELL, K, W., MARAGOS, C, M., PILCHER, C., HEADRICK, J, M., PATAKY, J, K., WHITE, D, G, Influence of *Cry 1Ab* protein and

hybrid genotype on fumonisin contamination and *Fusarium* ear rot of corn. **Crop Sci**, 43 (4): 1283–1293, 2003.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento, Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v, 4 – safra 2016/17 – n.7: Sétimo levantamento, abr. 2017, Brasília, 2017, 160 p.

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). **Tabela de plantas transgênicas aprovadas para comercialização no Brasil**. 2018. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial>. Acesso em: 15 mar 2018.

DEL RIO, L.A.; PASTORI, G.M.; PALMA, J.M. SANDALIO, L.M.; SEVILLA, F.; CORPAS, F.J.; JIMENEZ, A.; LOPEZ-HUERTAS, E.; HERNANDEZ, J.A. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. **Plant Physiol.**, 116:1195–1200, 1998.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA-SPI, 2006.

ESTEP, L.K.; SACKETT, K.; MUNDT, C.C. Influential disease foci in epidemics and underlying mechanisms: a field experiment and simulations. **Ecological Applications**, 24(7): 1854-1862, 2014.

FERMENT, G.; MELGAREJO, L.; FERNANDES, G.B.; FERRAZET, J.M. **Lavouras transgênicas – riscos e incertezas**: mais de 750 estudos desprezados pelos órgãos reguladores de OGMs. Brasília: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2015. 450p.

FERREIRA, K.C.Z.; MARINO, C.L.; FURTADO, E.L. Seleção de genótipos de eucalipto resistentes à ferrugem (*Puccinia psidii*) através de parâmetros monocíclicos. **Summa Phytopathol.**, v. 43, n. 2, p. 103-110, 2017.

FORLANI, G.; KLIMEK-OCHAB, M.; JAWORSKI, J.; LEJCZAK, B.; PICCO, A.M. Phosphonoacetic acid utilization by fungal isolates: occurrence and properties of a phosphonoacetate hydrolase in some penicillia. **Mycol Res.**, 110:1455–1463, 2006.

FRALEY, R.T., ROGERS, S.G.; HORSCH, R.B.; SANDERS, P.R.; FLICK, J.S.; ADAMS, S.P.; BITTNER, M.L.; BRAND, L.A.; FINK, C.L.; FRY, J.S.; GALLUPPI, G.R.; GOLDBERG, S.B.; HOFFMANN, N.L.; WOO, S.C. Expression of bacterial genes in plants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 80: 4803-4807, 1983.

GANLEY, R.J.; SNIEZKO, R.A.; NEWCOMBE, G. Endophyte-mediated resistance against white pine blister rust in *Pinus monticola*. **Forest Ecology and Management**, 225: 2751-2760, 2008.

GATCH, E. W.; MUNKVOLD, G. P. Fungal species composition in maize stalks in relation to European corn borer injury and transgenic insect protection, **Plant Disease**, Quebec, v, 86, p, 1156-1162, 2002.

HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends Microbiol.**, 16: 463–471, 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2010, 2010. Disponível em: <https://censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?dados=210&uf=42>. Acesso em: 5 out. 2016.

Instituto do Controle do Espaço Aéreo - ICEA. **Arquivo meteorológico**. Subdivisão de Climatologia e Arquivos Meteorológicos. 2017. Disponível em: <http://pesquisa.icea.gov.br/climatologia/arquivo.php>. Acesso em: abril, 2017.

International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications – ISAAA. Situação global dos transgênicos em 2017. ISAAA, 2018. Disponível em: <https://d335luupugsy2.cloudfront.net/cms/files/50569/15306214042018-07-03-ISAAA-Resumo-Executivo.pdf>. Acesso em: 26 jul. 2018.

JAKHAR, D.S.; SINGH, R.; KUMAR, S.; SINGH, P. Turcicum Leaf Blight: A Ubiquitous Foliar Disease of Maize (*Zea mays* L.). **Int. J. Curr. Microbiol.App.Sci.**, 6(3): 825- 831, 2017.

KAISER, U.; KLUTH, C.; MÄRLÄNDER, B. Variety-specific Epidemiology of *Cercospora beticola* Sacc. and Consequences for Threshold-based Timing of Fungicide Application in Sugar Beet. **Journal of Phytopathology**, 158(4): 296–306, 2010.

KAY, R.; CHAN, A.; DALY, M.; MC PHERSON, J. Duplication of CaMV 35S promoter sequences create a strong enhancer for plant genes. **Science**, 236:1299-1302.

KELLY, J.; AFANADOR, L.; HALEY, S.; MIKLAS, P. Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento del frijol. **Agronomía Mesoamericana**, 5:1-7, 1994.

KIERS, E.T.; VAN DER HEIJDEN, M.G.A. Mutualistic stability in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: exploring hypotheses of evolutionary cooperation. **Ecology**, 87:1627–1636, 2006.

KMOCH, M.; ŠAFRÁNKOVÁ, I.; HOLKOVÁ, L.; POLIŠENSKÁ, I.; KRÉDL, Z.; POKORNÝ, R. Fungi of the *Fusarium* genus in the grains of conventional hybrids and transgenic *Bt*-hybrids of maize (*Zea mays* L.) in the Czech Republic. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, 60: 5, p, 115-124, 2012.

KRENCHINSKI, F.H.; ALBRECHT, L.P.; ALBRECHT, A.J.P.; CESCO, V.J.S.; RODRIGUES, D.M.; PORTZ, R.L.; ZOBIOLE, L.H.S. Glyphosate affects chlorophyll, photosynthesis and water use of four Intacta RR2 soybean cultivars. **Acta Physiologiae Plantarum**, 39:63, February 2017.

LEVY, Y.; PATAKY, J. K. Epidemiology of northern leaf blight on sweet corn. **Phytoparasitica**, 2053–66, 1992.

- LONDO, J.; BOLLMAN, M.; SAGERS, C.; LEE, E.; WATRUD, L. Changes in fitness-associated traits due to the stacking of transgenic glyphosate resistance and insect resistance in *Brassica napus* L. **Heredity**, 107: 328–337, 2011.
- MARCUZZO, L.L.; Duarte, T.S.; Fernandes, J.M.C.; Hilleshein, P.C.; Scheidt, B.T. Progresso temporal da cercosporiose da beterraba em diferentes genótipos e épocas de semeadura na primavera. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 41, n. 3, p. 219-223, 2015.
- MESNAGE, R.; AGAPITO-TENFEN, S.; VILPERTE, V.; RENNEY, G.; WARD, M.; SÉRALINI, G.; NODARI, R.O.; ANTONIOU, M.N. An integrated multi-omics analysis of the NK603 Roundup-tolerant GM maize reveals metabolism disturbances caused by the transformation process. **Scientific Reports**, 6:37855, 2016.
- MITTAL, M.; BOORA, K.S. Molecular tagging of gene conferring leaf blight resistance using microsatellites in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Indian Journal of Experimental Biology**, 43(5):462-6, 2005.
- MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). Controle biológico. Jaguariuba: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v.3, p.163-2000.
- MUNKVOLD, G, P., DESJARDINS, A, E., 1997: Fumonisin in maize: Can we reduce their occurrence? **Plant Dis.**, 81: 556–565, 1997.
- MUNKVOLD, G, P., HELLMICH, R, L. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids. **Plant Dis.**, 83:130–138, 1999.
- MUNKVOLD G, P.; HELLMICH, R, L.; SHOWERS, W, B. Reduced *fusarium* ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. **Phytopathology**, 87: 1071–1077, 1997.
- NAVEED, M.; MITTER, B.; REICHENAUER, T.G.; WIECZOREKC, K.; SESSITSCH, A. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. **Environ. Exp. Bot.**, 97: 30–39, 2014.
- OGLIARI, J.B.; GUIMARÃES, M.A.; CAMARGO, L.E.A. Chromosomal locations of the maize (*Zea mays* L.) *HtP* and *rt* genes that confer resistance to *Exserohilum turcicum*. **Genet. Mol. Biol.**, 30:630–634, 2007.
- OGLIARI, J.B.; GUIMARÃES, M.A.; GERALDI, I.O.; CAMARGO, L.E.A. New resistance genes in the *Zea mays* L. - *Exserohilum turcicum* pathosystem. **Genet. Mol. Biol.**, 28:435-439, 2005.
- PADGETTE, S.R.; NIDA, D.L.; BIEST, N.A.; BAILEY, M.R.; ZOBEL, J.F. Glyphosate tolerant soybeans in the US in 1992: field test, processing studies, and analytical evaluation. **Monsanto Study** 92–01-30–02. Technical Report MSL-12906. St., 1993

PEREIRA FILHO, I.A.; BORGHI, E. **Mercado de sementes de milho no Brasil: safra 2016/2017**. Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2016.

POLAND, J.A.; BRADBURY, P.J.; BUCKLER, E.S.; NELSON, R.J. Genome-wide nested association mapping of quantitative resistance to northern leaf blight in maize, **Proc, Natl, Acad, Sci**, U S A, 108:6893–8, 2011.

PRADO, W.S.; ESTEVÃO, W.L.; MAEDA, A.K.M; CARLESSO, A.; GONÇALVES, M.C.; DAVIDE, L.M.C. Agronomic performance of transgenic and isogenic corn hybrids in the state of Mato Grosso do Sul. **Rev. Ceres**, v. 63, n.6, p. 796-806, nov/dez, 2016.

PROCHAZKOVA, D.; SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C.; SINGH, D.V. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*, 161:765–771, 2001.

R Core Team. **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017.

RAYMONDO, A.; HOOKER, A. Measuring the relationship between northern corn leaf blight and yield losses. **Plant. Dis.**, 65, 325-327, 1981.

RAMATHANI, I.; BIRUMA, M.; MARTIN, T.; DIXELIUS, C.; OKORI, P. Disease severity, incidence and races of *Setosphaeria turcica* on sorghum in Uganda, **European Journal of Plant Pathology**, v, 131, p, 383-392, 2011.

REDDY, T.R.; REDDY, P.N.; REDDY, R.R. Turcicum Leaf Blight Incited by *Exserohilum turcicum*. **Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.**, 5(1): 54-59, 2014.

REDDY, T.R.; REDDY, P.N.; REDDY, R.R.; REDDY, S.S. Management of Turcicum Leaf Blight of Maize caused by *Exserohilum turcicum*. *Int. J. Sci. Res. Publ.*, 3(10): 1-4, 2013.

REDMAN, R.S.; KIM, Y.O.; WOODWARD. C.J.D.A; GREER, C.; ESPINO, L.; DOTY, S.L.; RODRIGUEZ, R.J. Increased fitness of rice plants to abiotic stress via habitat adapted symbiosis: a strategy for mitigating impacts of climate change. **PLoS ONE**, 6(7):e14823, 2011.

ROCHESTER, D.E.; WINTER, J.A.; SHAH, D.M. The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp70. **EMBO J.**, 5:451-458, 1986.

ROLAS - Rede Oficial de Análise de Solo e de Tecido Vegetal. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**, 10,ed, Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2004, 400p.

SASSE, S. **Caracterização de variedades locais de milho procedentes de Anchieta-SC quanto à resistência a *Exserohilum turcicum***, Florianópolis, 2008,

88f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

SEMANGUN, H. **Crops Diseases in Indonesia**. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press, 2008.

SEVERNS, P.M.; ESTEP, L.K.; SACKETT, K.E.; MUNDT, C.C. Degree of host susceptibility in the initial disease outbreak influences subsequent epidemic spread. **Journal of Applied Ecology**, 51:1622–1630, 2014.

SHAH, D.; HORSCH, R.B.; KLEE, H.J.; KISHORE, G.M.; WINTER, J.; TURNER, N.; HIRONAKA, C.M.; SANDERS, P.R.; GASSER, C.S.; AYKENT, S.; SIEGEL, N.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. Engineering herbicide tolerance in plants. **Science**, 233:478–481, 1986.

SILVA, K.J.; ARMAS, R.D.; SOARES, C.R.F.S.; OGLIARI, J.B. Communities of endophytic microorganisms in different growth stages in local variety, and transgenic and conventional isogenic hybrids of maize, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 32:189, 2016a.

STEINRUCKEN, H.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylskimate-3-phosphate synthase. **Biochemistry and Biophysical Research Community**, 94: 1207-1212, 1980.

THAKUR, R.; LEONARD, K.; LEATH, S. Effects of temperature and light on virulence of *Exserohilum turcicum* on corn. **Phytopathol.**, 79, 631-635, 1989.

THOMAS, W.E. et al. Glyphosate negatively affects pollen viability but not pollination and seed set in glyphosate resistant corn. **Weed Science**, v.52, n.4, p.725-734, 2004.

TIBCO Statistica 13.3: Tibco Software Inc, 3307 Hillview Avenue Palo Alto, CA 94304, USA. 2017. Disponível em: <https://docs.tibco.com/products/tibco-statistica-13-3-0>. Acesso em: mar. 2017.

VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 36: 453–483, 1998.

VANDENKOORNHUYSE, P.; QUAISSER, A.; DUHAMEL, M.; LE VAN, A.; DUFRESNE, A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, 206: 1196–1206, 2015.

VELASCO, A.G.V.; KOWALCHUK, G.A.; MÃNERO, F.J.G.; RAMOS, B.; YERGEAU, E.; GARCÍA, J.A.L. Increased microbial activity and nitrogen mineralization coupled to changes in microbial community structure in the rhizosphere of Bt corn. **Appl Soil Ecol**, 68: 46–56, 2013.

WANG, X.; ZHANG, X.; YANG, J.; WANG, Z. Effect on transcriptome and metabolome of stacked transgenic maize containing insecticidal *cry* and glyphosate tolerance *epsps* genes. **The Plant Journal**, 93:1007–1016, 2018.

WAQUIL, J.M.; VILELLA, F.M.F.; FOSTER, J.E. Resistência do milho (*Zea mays* L) transgênico (Bt.) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v,1, n,3, p,1-11, 2002.

WORCHEL, E.R.; GIAUQUE, H.E.; KIVLIN, S.N. Fungal symbionts alter plant drought response. **Microbial Ecology**, 65: 671–678, 2013.

ZHANG, X. L.; SI, B. W.; FAN, C. M.; LI, H. J.; WANG, X. M. Proteomics identification of differentially expressed leaf proteins in response to *Setosphaeria turcica* infection in resistant maize. **J. Integr. Agric.**, 13: 789–803, 2014.

ZHU, Y.; ZHAO, F.; ZHAO, D, Regeneration and transformation of a maize elite inbred line via immature embryo culture and enhanced tolerance to a fungal pathogen *Exserohilum turcicum* with a balsam pear class I chitinase gene, **African Journal of Agricultural Research**, 6 (7), pp, 1923-1930, 4 April 2011.

ZOBIOLE, L.H.S. et al. Effect of glyphosate on symbiotic N<sub>2</sub> fixation and nickel concentration in glyphosate-resistant soybeans. **Applied Soil Ecology**, v.44, n.2, p.176-180, 2010a.

ZOBIOLE, L.H.S. et al. Glyphosate affects lignin content and amino acid production in glyphosate-resistant soybean. *Acta Physiologiae Plantarum*, v.32, n.5, p.831-837, 2010c.

ZOBIOLE, L.H.S. et al. Water use efficiency and photosynthesis of glyphosate-resistant soybean as affected by glyphosate. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.97, n.3, p.182-193, 2010b.

## CAPÍTULO 2. FLUXO GÊNICO ENTRE TRANSGÊNICOS E UMA VARIEDADE CRIOLA MILHO E SEUS IMPACTOS SOBRE A RESISTÊNCIA AO FUNGO *Exserohilum turcicum*, PERFORMANCE AGRONÔMICA E ADAPTATIVA DO MILHO

### RESUMO

O Extremo Oeste de Santa Catarina apresenta uma grande diversidade de variedades crioulas de milho evoluindo na presença do seu parente silvestre em processo de domesticação. Por isso, foi indicada como um microcentro de diversidade do milho, fora da sua área nuclear de origem filogenética, no México. Como contraponto, coexistem milhos híbridos convencional e transgênico e variedades melhoradas de polinização aberta - próximas a lavouras cultivadas com variedades crioulas. Em razão desse cenário, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da transgenia sobre uma típica variedade crioula do EOSC, quanto à reação de resistência a *Exserohilum turcicum*, performance agronômica e adaptativa, sob condições simuladas de fluxo gênico recorrente procedente de híbridos isogênicos da série Biogene-Pionner. Para este estudo, elegeu-se três híbridos isogênicos BG7060: NGM não geneticamente modificado; híbrido Hx portador dos transgenes *cry1F* e *pat* (evento TC1507); e híbrido Hxrr portador do transgene *cp4 epsps* (evento NK603) combinado a TC1507. Na safra 2013, foi realizado um experimento no esquema de blocos completos casualizados, com três repetições e parcelas contendo quatro fileiras de 5 m lineares de comprimento, espaçadas 1 m entre si, para avaliar a severidade da helmintosporiose (AACPD), em condições naturais de ocorrência da doença. A fim de simular a ocorrência de fluxo gênico recorrente, foram desenvolvidas nove populações derivadas da combinação da variedade crioula com cada um dos três híbridos separadamente, em três proporções (25, 50 e 75%). Os treze tratamentos foram constituídos pelos três híbridos (NGM, Hx, Hxrr), pela variedade crioula e pelas nove populações derivadas das gerações F1 (50% NGM, 50% Hx e 50% Hxrr) e RCF1 (25% NGM, 25% Hx e 25% Hxrr; 75% NGM, 75% Hx e 75% Hxrr). Na safra 2016, as populações contendo 25, 50 e 75% da composição genética de cada híbrido foram multiplicadas em áreas isoladas para o desenvolvimento das respectivas populações F2 e RC1F2. Estes nove tratamentos e seus respectivos genitores foram avaliados na safra 2016/2017, em um experimento conduzido no delineamento em blocos completos casualizados, com quatro repetições e parcelas contendo quatro fileiras de 4 m lineares de comprimento, espaçadas 0,80 m entre si. O controle das plantas ruderais foi realizado por meio de capinas manuais, exceto as parcelas contendo os híbridos transgênicos Hx e Hxrr, onde as plantas ruderais foram controladas por meio de dose única do herbicida Finale, na base de 2,0 L ha<sup>-1</sup> (200 g L<sup>-1</sup> de glifosinato de amônio) + 0,2% v/v de óleo mineral Joint Oil AgroSciences. Após as plantas atingirem estágio V6, foi realizada a inoculação de *Exserohilum turcicum*, a uma concentração de 4 x 10<sup>4</sup> esporos/mL. A resistência ao fungo foi avaliada por meio da incidência e dos períodos de incubação e latência, além da severidade da helmintosporiose (AACPD), enquanto o desempenho foi avaliado por meio de caracteres fenológicos (florescimento masculino e feminino, período em antése e maturação fisiológica) e agronômicos (alturas, número de ramificações do pendão, número de folhas acima da espiga principal, prolificidade, número de fileiras na espiga e de grãos por fileira na espiga, comprimento e diâmetro da espiga, diâmetro do sabugo, peso da espiga com

e sem palha, peso de 1000 grãos e produtividade. Para a maioria dos caracteres analisados, foram observadas diferenças entre os híbridos isogênicos NGM, Hx e Hxrr, em ambas as safras, que podem ser atribuídas aos transgenes ou à transgenia, bem como à quantidade de eventos inserida no genoma do milho. Esse padrão se repete nas populações derivadas da variedade crioula combinada com os híbridos em todas as proporções, principalmente, com o híbrido Hxrr portador dos dois eventos (TC1507+NK603). De maneira geral, o fluxo gênico simulado entre os híbridos isogênicos com a variedade crioula Rosado, ocasionou mudanças em caracteres de resistência a helmintosporiose, em alguns casos, os fluxos gênicos gerados se diferenciaram totalmente dos dois parentais (Híbridos e Rosado), gerando indivíduos com características diferentes dos seus pais, como por exemplo: para AACPD safra 2013, INCI, FM, FF, PA, AE, AFB, AIP, AIPP, AP, NRP, NFAE, PRO, NGF, DE, P1000 e PROD. A pesquisa sugere que, sob ocorrência simulada de fluxo gênico recorrente proveniente de pólen produzido por cultivares híbridas, a variedade crioula é descaracterizada progressivamente com o aumento do grau de contaminação para os todos os caracteres analisados, e sobretudo quando a fonte de contaminação é do híbrido que acumula dois eventos transgênicos. Desta forma, os impactos biológicos do fluxo gênico entre híbridos e variedades crioulas são imprevisíveis sobre a conservação e uso da agrobiodiversidade do EOSC.

**Palavras-chave:** Helmintosporiose; *Zea mays* L.; Híbridos; Resistência; Agrobiodiversidade.

## 1.0 INTRODUÇÃO

O milho é cultivado em todo território brasileiro, devido a sua capacidade de adaptação às diferentes condições ambientais e seu valor nutricional. No Brasil, são plantados aproximadamente 17 milhões de hectares (ABRAMILHO, 2011; CONAB, 2018). No estado de Santa Catarina, a cultura é muito importante, e apresenta diferentes usos, como consumo humano (amido, farinha, xarope de glucose, milho doce, pipoca e mini milho), alimentação animal (silagem, forragem e ração), confecção de artesanato a partir da palha e do grão e também como matéria-prima essencial para uma ampla gama de produtos industriais (OGLIARI et al., 2013; KIST et al., 2014). No Extremo Oeste de Santa Catarina-EOSC, muitas famílias de agricultores ainda produzem e cultivam a própria semente de variedades crioulas de diversos cultivos (CANCI et al., 2004; CANCI 2006; CANCI et al., 2010), inclusive de milho. As variedades crioulas são consumidas pelas famílias mantenedoras, principalmente, dentro de seus próprios estabelecimentos.

Tomando como exemplo a cultura do milho, foram identificados em dois municípios do EOSC, 374 populações de milho crioulo comum, 1.078 de milho crioulo pipoca (COSTA et al., 2016) e 61 variedades de milho crioulo doce e adocicado

(SOUZA, 2015), além de 136 populações de parentes silvestres do milho, algumas das quais pertencentes a espécie *Zea luxurians* (SILVA et al. 2015). As variedades de milho pipoca foram caracterizadas em cinco raças, dentre as quais, pelo menos, três constituem novas raças ainda não descritas na literatura (SILVA et al, 2016b). Com base na riqueza de variedades crioulas de milho em evolução e na presença do seu parente silvestre em processo de domesticação, essa região foi indicada como um microcentro de diversidade dessa espécie (COSTA et al., 2016), fora da sua área nuclear de origem filogenética, no México.

Na região EOSC, diante da grande diversidade de variedades crioulas e parentes silvestres de milho, coexistem cultivos de milho híbrido convencional e transgênico, este último, em sua maioria, com transgenes para tolerância a herbicidas como o glifosato (HBG) e o glufosinato de amônia (HBGA) e resistência a insetos, principalmente, da ordem Lepidoptera. Dentre os principais eventos transgênicos inseridos em híbridos de milho cultivados na região sul do Brasil, destacam-se os eventos: TC1507 e NK603, aprovados em setembro de 2008.

A coexistência entre milho transgênico, variedades crioulas e parentes silvestres gera riscos, e os efeitos ecológicos e biológicos da transgenia ameaçam a biodiversidade agrícola, em consequência do fluxo gênico (BURGEFF et al., 2014; HUFFORD et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2012). Segundo a Resolução Normativa n. 4 da CTNBio de 16 de agosto de 2007, para permitir a coexistência de organismos geneticamente modificados - OGM e organismos não geneticamente modificados - NGM, a distância entre uma lavoura comercial de milho, localizada em área vizinha, deve ser igual ou superior a 100 metros ou, alternativamente, 20 metros, desde que acrescida de bordadura com, no mínimo, 10 fileiras de plantas de milho convencional de porte e ciclo vegetativo similar ao milho geneticamente modificado. O fato é que essa distância não é suficiente e nem sempre é respeitada, por isso, são reais as preocupações com o potencial de contaminação causado por fluxo de genes mediada por pólen (LU, 2008; STEWART et al., 2000). O milho é uma cultura de polinização pelo vento e o fluxo gênico via pólen entre outras plantas de milho pode ocorrer além dessa distância de 100 m determinada pela resolução normativa nº 4 da CTNBio.

No ano de 2011, o Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade realizou o Censo da Diversidade que teve como objetivo a caracterização das variedades crioulas de milho existentes na região EOSC. Através dos resultados do censo, foi verificado que nos municípios de Anchieta e Guaraciaba, existe um sistema bimodal de produção,

onde variedades crioulas e híbridos comerciais não transgênicos e transgênicos são cultivados pelo mesmo agricultor. No mesmo estudo, foi identificado que cerca de 70% das áreas destinadas ao cultivo das variedades crioulas estão sendo cultivadas a uma distância menor ou igual a 100 metros das lavouras de milho geneticamente modificado - GM (SILVA et al., 2013). Outro resultado observado pelo Censo da Diversidade é a preocupante formação de híbridos naturais entre milho e teosinto (parente silvestre do milho). Os agricultores do EOSC relatam que observaram no campo alterações de características morfológicas, processo este favorecido pela ocorrência de populações espontâneas de teosinto em áreas cultivadas com milho, pela proximidade das áreas de pastagem às lavouras de milho e pela coincidência na época de plantio (SILVA, 2015).

Além dos riscos do efeito direto do fluxo de genes entre milho transgênico e não transgênico, estudos tem avaliado os impactos indiretos dos transgênicos sobre organismos não alvo, como o caso clássico das lagartas das borboletas monarcas em milho transgênico no México, que comiam menos, cresciam mais lentamente e sofriam maior mortalidade em contato com pólen transgênico (LOSEY et al., 1999). Outro risco assumido são as possíveis alterações na associação entre plantas e microorganismos. Alguns exemplos sobre microorganismos são: a redução de fungos micorrízicos arbusculares em cultivos de milho contendo o transgene *cry* (CHEEKE et al., 2014, 2012); a redução na comunidade de bactérias fixadoras de nitrogênio em solo com cultivo de milho transgênico *cry1F* (COTTA et al., 2014); a redução da comunidade microbiana da rizosfera de cultivo de milho *cry1Ab* (VELASCO et al., 2013); e mudança na diversidade de endófitos da folha de cana-de-açúcar usando transgênicos para a tolerância a herbicida (STUART et al., 2010).

Estudos anteriores ao presente trabalho realizados por Silva et al. (2016a), que serviram como base para a realização do mesmo, envolveu milho e endófitos. Neste trabalho, o foco era a observação da estrutura das comunidades de fungos e bactérias endofíticas em folhas de milho, com base em um estudo feito com os mesmos híbridos isogênicos da série BG7060 utilizados nesta tese (*NGM*, *Hx* e o *Hxrr*), juntamente com uma variedade crioula conservada *on farm* por agricultores familiares do EOSC e denominada localmente de “Rosado” (*RS*).

Através de polinizações manuais controladas, foram inseridos os pólenes dos híbridos em plantas de milho crioulo, durante duas gerações, a fim de simular a ocorrência de fluxo gênico reincidente e, assim, gerar as populações de milho crioulo

contendo 25, 50 e 75% da composição genética de cada híbrido, separadamente. Como resultado, os autores observaram que a estrutura de comunidade de fungos endofíticos associados a variedade crioula foi diferente dos demais tratamentos, assim como a comunidade de fungos endofíticos associada ao híbrido transgênico Hxrr (TC1507 + NK603) diferiu significativamente do híbrido transgênico Hx (TC1507) e do híbrido isogênico NGM. As populações de milho crioulo que sofreram apenas uma introgressão com seus respectivos híbridos e que, na geração seguinte, foram retrocruzadas com o mesmo milho crioulo (NGM-25, Hx-25 e Hxrr-25), não voltaram a apresentar a mesma estrutura de comunidade de fungos antes observada na variedade crioula. Diante desta constatação para o sistema endófitos fúngicos x transgênicos, surgiram como questionamentos: i) a resistência da planta ao fungo fitopatogênico *Exserohilum turcicum*, causador da helmintosporiose, seria diferente entre os híbridos isogênicos?

Levando em consideração o primeiro capítulo desta tese, sabemos que os híbridos isogênicos Hx e Hxrr inoculados com o fungo causador da helmintosporiose, predispõem tais genótipos a maior suscetibilidade a doença, aumentando a incidência do fungo e reduzindo os períodos de incubação e latência, em relação ao híbrido NGM. Essas diferenças entre genótipos quanto ao grau de resistência e à pressão de inóculo, podem contribuir com o aumento da demanda de fungicidas para o controle de doenças fúngicas, sobretudo em áreas de produção de milho ricas em diversidade genética e diversas quanto aos sistemas de manejo de controle de plantas invasoras como é o EOSC. Neste caso, as pressões de inóculo advindas dessas áreas são maiores do que as áreas cultivadas com híbridos NGM, variedades de polinização aberta e variedades crioulas de milho.

A partir destes resultados surgiram como próximos questionamentos: ii) o fluxo gênico direcionado dos híbridos isogênicos NGM, Hx e Hxrr sobre a variedade crioula Rosado interfere na reação de resistência ao fungo fitopatogênico *Exserohilum turcicum*, performance agrônômica e adaptativa do milho? iii) existe um efeito diferenciado do fluxo gênico sobre a variedade crioula, em função da origem do pólen ser de áreas cultivadas com milho transgênico ou convencional?

Sabe-se que a helmintosporiose, causada por *E. turcicum*, é considerada uma das doenças foliares do milho mais graves. Sua incidência nas folhas pode reduzir até 50% a produção de grãos (ZHU et al., 2011; POLAND et al., 2011; RAMATHANI et al., 2011). Os híbridos isogênicos da série BG7060 são moderadamente resistentes a

helmintosporiose (BIOGENE, 2016) e a variedade crioula Rosado é tolerante ao patógeno (dados não publicados). Diante destas informações, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da transgenia sobre uma típica variedade crioula do EOSC, quanto à reação de resistência a *Exserohilum turcicum*, performance agronômica e adaptativa, sob condições simuladas de fluxo gênico recorrente procedente de híbridos isogênicos da série Biogene-Pionner.

## 2.0 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

Três híbridos isogênicos da Dupont do Brasil S/A – Pioneer, pertencentes à série Biogene (BG7060®), foram usados nesse estudo como representantes de cultivares comerciais transgênicas e convencional. O híbrido BG7060 (NGM) não possui transgenes e, por isso, é dito convencional ou não geneticamente modificado; o híbrido isogênico BG7060H (Hx) é portador dos transgenes *cry1F* e *pat* (evento TC1507, tecnologia *Herculex I*); e o híbrido isogênico BG7060HR (Hxrr) é portador do transgene *cp4epsps* (evento NK603, tecnologia *Roundup Ready 2*), combinado aos transgenes do evento TC1507 (AGBIOS, 2008). Os híbridos isogênicos da série BG7060® são híbridos triplos precoces, recomendados para a região sul do Brasil, visando a produção de grãos e silagem. São responsivos ao uso de fungicidas para o controle da cercosporiose, além de serem moderadamente tolerantes a *Exserohilum turcicum* e às principais doenças fúngicas do milho (BIOGENE, 2016).

Como representante das variedades crioulas conservadas *on farm* por agricultores familiares do EOSC, foi escolhida a variedade denominada “Rosado” (RS), originalmente mantida no município de Anchieta-SC pela família do agricultor Miguel Cagnin. Trata-se de um material localmente adaptado ao cultivo com baixo uso de insumo, com elevado potencial nutricional e agronômico, além de ser uma das variedades de milho mais antigas dessa região (KUHLEN et al., 2012; OGLIARI et al., 2013). Para evitar a ocorrência de cruzamentos indesejáveis com outras plantas, RS tem sido cultivada pelos seus mantenedores em áreas isoladas especialmente de outras lavouras de milho.

Para simular situações de recorrência indesejável de fluxo gênico dos híbridos para a variedade crioula, em safras sucessivas de cultivo, foram desenvolvidas por

Silva (2015) progênies derivadas da combinação de cada híbrido com a variedade RS, baseada em três proporções gênicas (25%, 50% e 75%). Ao final dos cruzamentos e retrocruzamentos, foram constituídas três progênies F1 (50% NGM, 50% Hx e 50% Hxrr) e seis progênies RC1F1 (75% NGM, 75%Hx, 75% Hxrr, 25% NGM, 25% Hx e 25% Hxrr). Os quatro genitores (RS, NGM, Hx e Hxrr) e as nove progênies derivadas foram avaliadas no presente estudo em condições experimentais, na safra 2013.

Para o experimento conduzido na safra 2016/2017, além dos quatro genitores (RS, NGM, Hx e Hxrr), foram avaliadas três populações segregantes da geração F2 contendo 50% da composição genética de cada híbrido (50%NGM, 50%Hx e 50%Hxrr), três populações RC1F2 contendo 25% de cada híbrido (25%NGM, 25%Hx e 25%Hxrr) e três populações RC1F2 com 75% de cada híbrido (75%NGM, 75%Hx e 75%Hxrr). Para a produção das referidas populações segregantes, foi realizada previamente a multiplicação das sementes das progênies F1 e RC1F1, em nove áreas distintas e isoladas espacialmente, no primeiro semestre de 2016. Cada uma dessas áreas foi constituída por seis fileiras de 10 m, espaçadas 1 m entre si. Após a colheita e debulha das espigas, os grãos foram secos até atingirem umidade de 13%, acondicionados em recipientes hermeticamente fechados e armazenados a 4°C até a data de implantação do experimento realizado na safra 2016/2017.

## 2.2 ENSAIO A CAMPO

Foram realizados dois experimentos em condições de campo, sendo o primeiro, na safra 2013, e o segundo, na safra 2016/2017. A área experimental está situada na latitude 27,41°S e longitude 48,32°O, na Fazenda Experimental da Ressacada da Universidade Federal de Santa Catarina, localizada em Florianópolis - Santa Catarina. O clima da região é classificado como mesotérmico úmido (Cfa Köppen) e o solo é classificado como Neossolo Quartzarênico Hidromórfico Típico (EMBRAPA, 2006), de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos.

As condições de ambiente vigentes durante o período experimental da safra 2013 (03/03/2013 a 03/07/2013) apresentaram um total acumulado de chuvas de 522,5 mm, umidade relativa média de 81% e temperatura média de 20,3 °C, com mínima registrada de 8,4 °C e máxima de 31,8 °C (ICEA, 2017). Na safra 2016/2017, a temperatura média durante o período de condução do experimento (25/10/2016 a 25/03/2017) foi de 24 °C, com mínima registrada de 13,3 °C e máxima de 36,7 °C. O

total acumulado de chuvas nesse período foi de 583,8 mm e a umidade relativa média foi de 81% (ICEA, 2017).

O experimento da safra 2013 foi conduzido no delineamento de blocos completos casualizados, com três repetições e parcelas contendo quatro fileiras de 5 m lineares de comprimento, espaçadas 1 m entre si. A área útil da parcela (8 m<sup>2</sup>) foi constituída pelas duas fileiras centrais, excluindo 0,50 m de cada extremidade das duas fileiras centrais. O estande final foi de seis plantas por metro linear, estabelecendo, assim, uma densidade final de 60.000 plantas ha<sup>-1</sup>. O controle de plantas ruderais de todos os tratamentos desse experimento foi feito por meio de capinas manuais, independentemente de se tratar de milho transgênico tolerante ao herbicida glufosinato de amônio.

O experimento da safra 2016/2017 foi conduzido no delineamento em blocos completos casualizados, com quatro repetições e parcelas contendo quatro fileiras de 4 m lineares de comprimento, espaçadas 0,80 m entre si. As duas fileiras centrais constituíram uma área útil de parcela de 4,8 m<sup>2</sup>. O estande final foi de seis plantas por metro linear, estabelecendo assim, uma densidade de 75.000 plantas ha<sup>-1</sup>. No experimento desta safra, às parcelas cultivadas com os híbridos Hx e Hxrr foram aplicadas dose única do herbicida Finale, na base de 2,0 L ha<sup>-1</sup> (200 g L<sup>-1</sup> de glufosinato de amônio) + 0,2% v/v de óleo mineral Joint Oil AgroSciences, quando as plantas ruderais estavam com um par de folhas e as plantas de milho estavam em estágio vegetativo V4 á V5. Nas demais parcelas cultivadas com as populações segregantes da geração F2 e RC1F2 e com o híbrido NGM, o controle das plantas ruderais foi realizado por meio de capinas manuais.

A correção com nitrogênio, fósforo e potássio dos dois experimentos foi efetuada com base em análise prévia de solo e recomendação do Manual de Adubação e de Calagem, para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (ROLAS, 2004), para a cultura do milho.

### 2.3 AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL

O experimento conduzido na safra 2013 tinha como objetivo inicial avaliar apenas o efeito da transgenia sobre a estrutura da diversidade das comunidades de microrganismos endofíticos da folha do milho, cujo tema foi publicado por Silva et al. (2016a). Em razão da ocorrência natural da helmintosporiose nesse experimento, o

mesmo também foi usado para a realização de uma primeira análise dos efeitos da transgenia sobre a resistência da planta a este fitopatógeno (vide item 2.3.2).

A falta de dados na literatura dos efeitos da transgenia sobre fitopatógenos foliares não alvo dos transgenes e os resultados preliminares obtidos nessa primeira safra, levaram ao planejamento do experimento conduzido na safra 2016/2017, mas por meio de inoculação controlada do patógeno, conforme procedimentos descritos nos itens 2.3.1 e 2.3.2. Em ambos os experimentos dessa mesma safra, ainda foram avaliados o florescimento masculino e feminino, o rendimento de grãos e seus componentes, conforme descrito no item 2.3.3.

### **2.3.1 Coleta, isolamento, cultura monospórica e inoculação do patógeno**

No início do ano de 2016, folhas contendo lesões típicas de helmintosporiose foram coletadas em lavouras de milho da Fazenda Experimental da Ressacada, em Florianópolis-SC. O isolamento do patógeno foi efetuado a partir de partes da folha contendo lesões, mantidas em câmara úmida dentro de placas de Petri, em temperatura ambiente, por 24 horas. As partes da folha mais abundantes em esporulação foram colocadas sobre vidro-relógio e, com auxílio de uma alça de platina, as estruturas reprodutivas foram raspadas e, a seguir, diluídas em água destilada esterilizada. A suspensão contendo os conídios foi então filtrada em gaze estéril, para reter as demais estruturas e impurezas contidas sobre a folha lesionada (Sasse, 2008).

Após a filtragem, 10  $\mu$ L do meio líquido foi pipetado e transferido em lâmina oca para a obtenção das culturas monospóricas. A localização dos conídios na lâmina foi efetuada com o auxílio de uma lente objetiva com aumento de 40x do microscópio óptico. Uma vez localizado um conídio na lâmina, este era “sugado” com pipeta e transferido para placa de Petri, contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). O depósito de um único conídio ao meio de cultura também foi efetuado com auxílio da mesma lente objetiva. As culturas monospóricas foram então mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 25 °C, no escuro, por sete dias (Sasse, 2008).

Para a obtenção do inóculo, foram utilizados grãos de sorgo como substrato, acondicionados em frascos Erlenmeyers de 250 ml. Cada frasco recebeu 25 g de grãos mais 40 mL de água destilada, para ambos serem autoclavados durante 30 minutos. Após a autoclavagem, foram adicionados fragmentos de meio de cultura

BDA, contendo estruturas provenientes do cultivo monospórico de *Exserohilum turcicum*. Após a repicagem, o fungo foi incubado a 25 °C, no escuro, por 15 dias, até a completa colonização dos grãos de sorgo. A partir do terceiro dia, cada frasco de Erlenmeyer foi agitado periodicamente para possibilitar a colonização mais homogênea de todos os grãos. Cerca de 20 grãos do sorgo colonizado pelo fungo foram adicionados em placas de Petri esterilizadas, contendo 10 mL de BDA. O material fúngico foi incubado a 25 °C, no escuro, por sete dias e, após este período, as colônias geradas em cada placa foram “raspadas” e adicionadas a 100 mL de água destilada em um béquer, até atingirem a concentração de  $10^4$  esporos/mL, com auxílio de uma câmara de Neubauer.

A inoculação dos conídios foi realizada 36 dias após a semeadura, em plantas no estágio vegetativo V6 a V7. Para a inoculação, foi utilizado um pulverizador de compressão prévia Guarany de 6 L, com bico atomizador adaptado (tipo magno cônico de 0,15 mm). Testes prévios foram realizados com este pulverizador usando apenas água, para determinar a quantidade total de suspensão a ser utilizada durante a inoculação. Para as condições do presente estudo, foram utilizados 2 mL de suspensão/planta. Considerando o total de 576 plantas, foram gastos 1,152 L de solução mais 25%, chegando a um total de aproximadamente 1,5 L de solução para os dois experimentos. A inoculação do patógeno foi efetuada por meio de distribuição homogênea dessa suspensão em toda a área. Esta etapa foi realizada no fim da tarde, sob baixa intensidade luminosa e na ausência de precipitação pluviométrica.

### **2.3.2 Severidade causada pela helmintosporiose**

No experimento da safra 2013, as avaliações de severidade foliar foram realizadas aos 105, 111, 123, 137 e 146 dias após a semeadura (DAP), cujas datas corresponderam aos estádios fenológicos reprodutivos compreendidos entre R3 (grão pastoso) e R5 (grãos duros). Foram avaliadas oito plantas aleatórias da área útil da parcela e todas as plantas avaliadas nessa primeira vez foram marcadas, para que as mesmas fossem acompanhadas nas quatro avaliações posteriores. A severidade foliar foi estimada a partir da avaliação de uma amostra de oito plantas da área útil da parcela, por meio de escala diagramática elaborada por Bleicher (1988). Nessa escala, a avaliação da percentagem do tecido foliar infectado por *E. turcicum* exibe percentuais de lesão de 0, 1, 3, 6, 10, 25, 50 e >50%. A partir da análise de três folhas

por planta contendo lesões, foi estimada a severidade média da doença para a planta inteira.

No experimento da safra 2016/2017, foram avaliadas as variáveis incidência (INCI), período de incubação (INCU), período latente (LATE) e severidade da doença. A incidência foi medida em 10 plantas da parcela útil (cinco em cada fileira da parcela útil), 14 dias após a inoculação dos fungos e, a partir disso, foi estimada a porcentagem ou frequência relativa das plantas afetadas com a doença. O período de incubação foi considerado como o tempo (em dias) decorrido da inoculação até o aparecimento dos primeiros sintomas. O período latente foi avaliado com auxílio de uma lupa (10x aumento) e medido com base no tempo (em dias) decorrido da inoculação até a esporulação (Ferreira et al., 2017). As avaliações de severidade foram realizadas aos 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98 e 105 DAP, ou seja, entre os estádios fenológicos vegetativo V6 (6 folhas completas) e reprodutivo R5 (grãos duros). Foram avaliadas 20 plantas aleatórias da parcela útil e, de maneira similar ao experimento da safra 2013; todas as plantas avaliadas pela primeira vez foram marcadas, para que as mesmas fossem avaliadas nas demais avaliações.

A severidade foliar do experimento da safra 2016/2017 foi estimada por meio de escala diagramática elaborada pela AGROCERES (1996). Nessa escala, a avaliação da porcentagem do tecido foliar infectado por *Exserohilum turcicum* exibe percentuais de lesão de 0, 1, 3, 6, 10, 25, 50 e >50%. As plantas foram divididas em três terços (inferior, mediano e superior) e de cada terço foram avaliadas três folhas para a inferência do progresso da doença. A severidade média de cada planta foi estimada a partir da média das nove folhas.

A evolução da doença, para os dois ensaios, foi estimada através da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), com base nos dados de severidade obtidos em cada avaliação e aplicado à fórmula de Campbell & Madden (1990):

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(Y_{i+1} + Y_i) \cdot (T_{i+1} + T_i)}{2},$$

onde:  $Y_i$  = severidade da doença na época de avaliação  $i$  ( $i=1,2,\dots,n$ );  $Y_{i+1}$  = severidade da doença na época de avaliação  $i+1$ ;  $T_i$  = época da avaliação  $i$ ;  $T_{i+1}$  = época de avaliação  $i+1$  e;  $n$  = número total de observações.

### 2.3.3 Caracteres Fenológicos, Agronômicos e de Rendimento

Para o ensaio conduzido na safra 2016/2017, além da severidade da doença, foram avaliados caracteres fenológicos, agronômicos e de rendimento.

As variáveis fenológicas avaliadas foram florescimento masculino (FM), florescimento feminino (FF), período em antese (PA) e maturação fisiológica (MATU). Para FM, foi considerado o tempo (em dias) transcorrido da emergência até 50% + 1 de plantas da parcela útil contendo anteras liberando pólen. Para o (FF), foi considerado o tempo (em dias) transcorrido da emergência até 50% + 1 de espigas da parcela útil contendo estigma e estiletos expostos. Para PA, foi considerado o tempo em que 50% + 1 dos pendões das plantas da parcela útil ficaram liberando pólen. A MATU, foi considerada quando 50% + 1 das plantas apresentavam a ponta do grão com a “camada preta”.

Os caracteres agronômicos avaliados foram: altura até a espiga principal (AE), altura até a folha bandeira (AFB), altura até o início do pendão (AIP), altura até o início do pendão principal (AIPP), altura da planta toda, expressos em metros (AP), e número de ramificações do pendão (NRP) e número de folhas acima da espiga principal (NFAE).

Nessa mesma safra, também foram avaliados o rendimento de grãos (PROD) e seus componentes: prolificidade (PRO), número de fileiras na espiga (NFE), número de grãos por fileira na espiga (NGF), comprimento da espiga (CE), diâmetro da espiga (DE), diâmetro do sabugo (DS), peso da espiga com palha (PECP), peso da espiga sem palha (PESP) e peso de 1000 grãos (P1000). Para os caracteres prolificidade, número de fileiras na espiga, número de grãos por fileira, diâmetro da espiga (cm), diâmetro do sabugo (cm), peso da espiga com palha (kg) e peso das espigas sem palha (kg), foram consideradas as espigas de 20 plantas da parcela útil, sendo 10 plantas marcadas com fita vermelha em cada uma das duas fileiras da parcela útil.

Para a característica peso de 1000 grãos (g), foram debulhadas as espigas das 20 plantas da parcela útil e aleatoriamente feita a contagem de 1000 grãos, para posterior pesagem. A produtividade foi estimada a partir da colheita e debulha manual de todas as espigas da parcela útil e transformado em  $t\ ha^{-1}$  de grãos.

## 2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O modelo estatístico matemático das análises de variância é dado por  $Y_{ij} = \mu + b_j + t_i + e_{ij}$ , em que  $Y_{ij}$  corresponde a observação do  $i$ -ésimo tratamento ( $i = 1, 2$  e  $3$ ) e do  $j$ -ésimo bloco ( $j = 1, 2, 3$  e  $4$ ) com  $J = 3$  e  $J = 4$ , nos experimentos das safras 2013 e 2016/2017, respectivamente;  $\mu$  é a média geral do experimento (constante);  $b_j$  é o efeito dos blocos, suposto aleatório;  $t_i$  é o efeito dos tratamentos (fixo);  $e_{ijk}$  corresponde ao erro experimental. A diferença entre os tratamentos foi calculada pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro, quando o teste de F foi significativo ao mesmo nível de significância.

Para calcular a AACPD, em função do tempo, foi utilizado o modelo de regressão linear:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \varepsilon_i, \quad \text{para } i = 1, \dots, n,$$

onde:

$Y_i$  : é uma variável aleatória e representa o valor da variável resposta (variável dependente) na  $i$ -ésima observação;

$x_i$ : representa o valor da variável explicativa (variável independente, variável regressora) na  $i$ -ésima observação;

$\varepsilon_i$ : é uma variável aleatória que representa o erro experimental;

$\beta_0$  e  $\beta_1$ : são os parâmetros do modelo, que serão estimados, e que definem a reta de regressão; e  $n$ : é o tamanho da amostra.

As análises foram efetuadas com o programa STATISTICA 13.3 (TIBCO, 2017), para blocos completos casualizados e com o programa R (R TEAM, 2017), para o heat map.

## 3.0 RESULTADOS

### 3.1 EFEITOS DO FLUXO GÊNICO ENTRE TRANSGÊNICOS E CRIOULO SOBRE A RESISTÊNCIA A HELMINTOSPORIOSE

A Tabela 7 contém as médias para as variáveis INCI, INCU, LATE e severidade da helmintosporiose (AACPD) safras 2013 e 2016/2017, avaliadas nos três híbridos isogênicos da série BG7060, na variedade crioula de milho Rosado e nos cruzamentos resultantes da combinação entre os três híbridos isogênicos e a variedade crioula

Rosado em três porcentagens (75, 50 e 25%). As estimativas dos coeficientes de variação foram de 42,23%, 13,99%, 16,43%, 8,45% e 5,66% para INCI, INCU, LATE, AACPD 2013 e AACPD 2016/2017 respectivamente, indicando que os fatores de variação não controlados pelo experimento foram mais pronunciados para a variável INCI (Tabela 7).

Os híbridos isogênicos diferiram significativamente entre si pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), para todas as variáveis associadas à helmintosporiose. Para as características INCI, INCU e LATE, o híbrido isogênico portador de dois eventos transgênicos (Hxrr) apresentou a maior incidência e os menores períodos de incubação e latência, diferenciando-se estatisticamente dos híbridos portadores de um evento (Hx) e do híbrido NGM; estes dois últimos híbridos não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 7). Neste caso, o piramidamento de genes exógenos (Hxrr com TC1507 + NK603) influenciou na maior incidência e menores períodos de incubação e latência da helmintosporiose.

Considerando a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), baseada nos dados obtidos em cinco avaliações de severidade da helmintosporiose (105, 111, 123, 137 e 145 DAP) na safra 2013 e em oito avaliações (56, 63, 70, 77, 84, 91, 98 e 105 DAP) na safra 2016/2017, o híbrido NGM apresentou a menor AACPD, em comparação aos híbridos Hx e Hxrr, demonstrando que o híbrido convencional se a presença de transgenes contribui para a menor severidade da helmintosporiose (Tabela 7). Por outro lado, o híbrido Hxrr (dois eventos transgênicos) não apresentou diferença significativa para INCI, INCU e LAT, em relação à variedade crioula Rosado e às progênies resultantes da sua combinação com Rosado.

Considerando a severidade da helmintosporiose, através da AACPD, na safra 2013, os tratamentos constituídos por 75 e 50% do híbrido NGM com o Rosado apresentaram as menores severidade da helmintosporiose em relação às demais progênies combinadas, mantendo o padrão de resistência que os híbridos 100% (Tabela 7). Para a mesma variável analisada na safra 2016/2017, somente a progênie portadora de 75% do híbrido Hx com o Rosado se diferencia do parental Rosado e se iguala ao seu parental 100% Hx; as demais progênies mantêm a mesma severidade da variedade crioula.

**Tabela 7.** Médias obtidas de três híbridos isogênicos de milho da série BG7060, sob fluxo gênico com a variedade crioula de milho Rosado, para a variável incidência e os caracteres monocíclicos da helmintosporiose. Florianópolis-SC, Safra 2013 e 2016/2017.

Variável	Híbridos	Fluxos Gênicos			Rosado	Média	CV (%)	
		75%	50%	25%				
INCI	NGM	4,75 c	7,25 c	35,50 b	62,50 a	83,75a	48,62	42,23
	Hx	21,25 c	41,25 b	63,25 a	55,00 a			
	Hxrr	57,52 a	60,00 a	70,00 a	70,00 a			
INCU	NGM	22,50 a	22,25 a	19,50 a	15,75 b	13,50b	17,41	13,99
	Hx	22,00 a	18,00 b	16,00 b	16,50 b			
	Hxrr	16,75 b	16,00 b	15,00 b	15,00 b			
LATE	NGM	28,25 a	29,50 a	25,50 a	18,00 b	16,50b	27,71	16,43
	Hx	26,25 a	23,00 a	20,00 b	19,00 b			
	Hxrr	18,50 b	19,50 b	19,00 b	19,00 b			
AACPD 2013	NGM	1300,02d	1590,96c	1845,41c	2204,18b	2179,95b	1930,62	8,45
	Hx	1633,69c	2001,36b	2055,51b	2456,67a			
	Hxrr	1722,59c	1984,20b	2033,43b	2090,23b			
AACPD 2016/2017	NGM	1688,33b	1883,96 <sup>a</sup>	1904,53 <sup>a</sup>	1927,29a	1934,43a	1917,64	5,66
	Hx	1951,57 <sup>a</sup>	1829,78b	2002,30 <sup>a</sup>	1987,29a			
	Hxrr	1948,56 <sup>a</sup>	1886,23 <sup>a</sup>	1974,80 <sup>a</sup>	2010,20a			

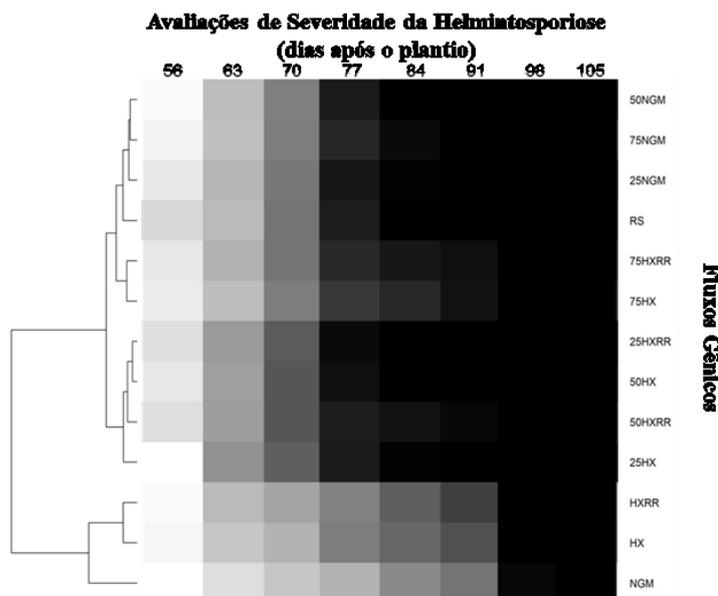
\*Médias seguidas pela mesma letra para cada variável não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade. NGM (não geneticamente modificado), Hx (um evento transgênico) e Hxrr (dois eventos transgênico). INCI (incidência), INCU (período de incubação), LATE (período de latência), AACPD-2013 (área abaixo da curva de progresso da doença safra 2013), AACPD-2016/2017 (área abaixo da curva de progresso da doença safra 2016/2017).

O dendrograma construído por meio da análise de heatmaps da severidade da helmintosporiose, na safra 2016/2017, apresenta a formação de três grupos. O primeiro, com a menor severidade da doença, é constituído pelos híbridos isogênicos (NGM, Hx e Hxrr), logo acima ocorre a formação de um segundo grupo com as maiores severidades da helmintosporiose, formado pelos tratamentos 25% Hx, 25% Hxrr, 50% Hx e 50% Hxrr. O terceiro grupo formado é constituído por indivíduos intermediários entre a menor e a maior severidade da helmintosporiose, constituído pelos tratamentos 75% Hx 75% Hxrr, 25% NGM, 50% NGM, 75% NGM e Rosado (Figura 8). Neste caso, todas as progênies derivadas dos híbridos isogênicos (NGM, Hx e Hxrr) com a variedade Rosado sofrem alterações.

No primeiro grupo, constituído pelos híbridos isogênicos, nota-se que o híbrido NGM apresenta-se distante dos dois híbridos transgênicos, resultado que corrobora com a AACPD apresentada na Tabela 7. Desta maneira, a presença de genes exógenos na constituição dos híbridos transgênicos o diferencia quanto a resistência da helmintosporiose do híbrido isogênico sem a presença de transgenia.

Vale ressaltar que, no grupo constituído pelos indivíduos com as maiores severidades da helmintosporiose, não há nenhum tratamento gerado entre o híbrido NGM com a variedade crioula Rosado. Ainda, pode-se afirmar neste mesmo grupo, que a sua composição é referente aos fluxos gênicos com menores porcentagens dos híbridos transgênicos (25% Hx e 25% Hxrr) ou quando estão na proporção meio a meio (50% Hx e 50% Hxrr) com a variedade crioula (Figura 8). Neste caso, o fluxo gênico do híbrido NGM sobre a variedade Rosado tem uma interferência mais positiva quanto a reação de resistência a helmintosporiose em relação às progênies resultantes da combinação entre os híbridos transgênicos e Rosado.

**Figura 8.** Heatmap da severidade da helmintosporiose para o fluxo gênico gerado entre os híbridos isogênicos de milho NGM, Hx e HxRR com a variedade crioula Rosado, em relação as oito avaliações da doença (56, 63, 70, 77, 84, 91, 98 e 105 dias após o plantio) safra 2016/2017, na forma de heatmap, construído pela análise de agrupamento hierárquico, utilizando distância Euclidiana Média Padronizada e o modelo de agrupamento por UPGMA. Escala: Branco menor severidade e Preto maior severidade. Coef. Correlação Cofenética: 0,82.



Fonte: O autor.

### 3.2 EFEITOS DO FLUXO GÊNICO ENTRE TRANSGÊNICOS E CRIOULO SOBRE CARACTERES FENOLÓGICOS, AGRONÔMICOS E DE RENDIMENTO DE GRÃOS

Os resultados das análises de variância para os caracteres fenológicos (FM, FF, PA e MF), avaliados nos três híbridos isogênicos da série BG7060, na variedade crioula e nos cruzamentos resultantes da combinação entre os híbridos e Rosado em três proporções (25, 50 e 75%) estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Médias obtidas de três híbridos isogênicos de milho da série BG7060, sob fluxo gênico com a variedade crioula de milho Rosado, para os caracteres fenológicos do milho. Florianópolis-SC. Safra 2016/2017.

Variável	Híbridos	Fluxos Gênicos			Rosado	Média	CV(%)	
		75%	50%	25%				
FM (graus dia)	NGM	745,03 d	838,01 b	847,30 b	860,34 a	873,14 a	835,86	2,67
	Hx	761,53 d	889,01 a	847,11 b	820,68 b			
	Hxrr	786,50 c	851,29 b	868,70 a	877,58 a			
FF (graus dia)	NGM	769,88 d	871,69 c	965,19 a	904,44 b	956,01 a	885,58	2,80
	Hx	836,70 c	904,44 b	873,14 c	860,00 c			
	Hxrr	848,13 c	884,24 c	912,75 b	926,06 b			
PA (dias)	NGM	6,01 c	7,50 c	14,50 a	10,75 b	11,75 b	9,47	19,78
	Hx	7,26 c	8,75 c	10,00 b	9,75 b			
	Hxrr	7,26 c	6,50 c	11,25 b	11,75 b			
MF (graus dia)	NGM	1308,15 c	1435,59 a	1459,10 a	1427,60 a	1439,51 a	1399,70	2,43
	Hx	1367,63 b	1412,31 a	1419,85 a	1387,89 a			
	Hxrr	1312,13 c	1403,34 a	1407,18 a	1415,85 a			

\*Médias seguidas pela mesma letra para cada variável não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade. - NGM (não geneticamente modificado), Hx (um evento transgênico) e Hxrr (dois eventos transgênico). FM (Florescimento Masculino), FF (Florescimento Feminino), PA (Período em Antese) e MF (Maturação Fisiológica).

Para os caracteres fenológicos FM, FF e MF foram observadas diferenças significativas entre os híbridos isogênicos estudados (Tabela 8). O híbrido portador de dois eventos (Hxrr) apresentou maior período para o FM em relação aos demais híbridos avaliados, assim como os híbridos Hx e Hxrr apresentaram maior período de FF em relação ao híbrido NGM. O híbrido Hx também apresentou maior prolongamento do ciclo da cultura avaliado através da MF, em relação aos demais híbridos avaliados (Tabela 8). Os híbridos sempre apresentaram os menores graus dias em relação ao Rosado e os cruzamentos derivados (Tabela 8).

Para PA, os cruzamentos 75% híbridos e 25% Rosado não diferenciam dos parentais híbridos, mas diferenças existem em relação às progênes 50% e 25% que por sua vez não se diferenciam do Rosado, com exceção da progênie 50% NGM com o maior período em antese. Os valores estimados para o coeficiente de variação para as características FM, FF, PA e MF foram de 2,67%, 2,80%, 19,78% e 2,43% respectivamente (Tabela 8). Diferenças entre híbridos e variedades crioulas são muito comuns de observar, já que os híbridos passaram por programas de melhoramento para que chegassem ao máximo de sincronismo no florescimento e menor período em antese. A variedade crioula Rosado apresenta um maior período em antese (PA), aproximadamente 12 dias, se diferenciando dos híbridos isogênicos que apresentam de 6 a 7 dias, o que compensa a sua menor sincronia no florescimento em relação aos híbridos.

Para a variável MF, os cruzamentos entre os híbridos e o Rosado não sofrem alterações e todas as simulações de fluxo gênico, se igualaram à variedade crioula Rosado (Tabela 8). Neste caso, os híbridos isogênicos avaliados não influenciam na maturação fisiológica dessas progênes.

Os resultados das análises de variância para os caracteres agrônômicos, avaliados em três híbridos isogênicos da série BG7060, na variedade Rosado e nos seus respectivos descendentes (75, 50 e 25%) estão apresentados na Tabela 9. Os valores estimados para o coeficiente de variação para as características AE, AFB, AIP, AIPP, AP, NRP e NFAE foram de 9,72%, 6,44%, 6,23%, 6,33%, 5,60%, 12,94% e 5,83% respectivamente (Tabela 9).

**Tabela 9.** Médias obtidas de três híbridos isogênicos de milho da série BG7060, sob fluxo gênico com a variedade crioula de milho Rosado, para os caracteres agrônômicos do milho. Florianópolis-SC. Safra 2016/2017.

Variável	Híbridos	Fluxos Gênicos			Rosado	Média	CV (%)
		75%	50%	25%			
AE (m)	NGM	0,91 c	1,11 c	1,29 b	1,62 a	1,21	9,72
	Hx	0,99 c	1,10 c	1,25 b			
	Hxrr	1,03 c	1,10 c	1,41 b			
AFB (m)	NGM	1,93 c	2,12 c	2,21 b	2,65 a	2,18	6,44
	Hx	2,01 c	1,92 c	2,17 c			
	Hxrr	2,01 c	2,07 c	2,43 b			
AIP (m)	NGM	2,02 d	2,22 c	2,30 b	2,72 a	2,27	6,23
	Hx	2,08 d	1,98 d	2,24 c			
	Hxrr	2,07 d	2,18 c	2,49 b			
AIPP (m)	NGM	2,14 c	2,35 c	2,48 b	2,84 a	2,39	6,33
	Hx	2,19 c	2,09 c	2,34 c			
	Hxrr	2,18 c	2,27 c	2,60 b			
AP (m)	NGM	2,35 c	2,56 c	2,66 b	3,01 a	2,58	5,60
	Hx	2,40 c	2,26 c	2,53 c			
	Hxrr	2,39 c	2,44 c	2,78 b			
NRP	NGM	6,49 d	12,4 b	15,08 a	12,96 b	10,87	12,94
	Hx	6,95 d	9,74 c	13,58 a			
	Hxrr	6,80 d	7,16 d	11,44 b			
NFAE	NGM	5,98 a	5,93 a	5,32 b	5,85 a	5,91	5,83
	Hx	6,01 a	5,65 b	6,23 a			
	Hxrr	5,91 a	6,05 a	5,88 a			

\*Médias seguidas pela mesma letra para cada variável não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade. NGM (não geneticamente modificado), Hx (um evento transgênico) e Hxrr (dois eventos transgênico). AE (altura até a espiga), AFB (altura até a folha bandeira), AIP (altura até o início do pendão), AIPP (altura até o início do pendão principal), AP (altura da planta), NRP (número de ramificações do pendão) e NFAE (número de folhas acima da espiga principal).

Para os caracteres agrônômicos relacionados à altura das plantas são constatados dois extremos, onde as maiores alturas (AE, AFB, AIP e AP) são observadas na variedade crioula Rosado, diferenciando dos híbridos isogênicos NGM, Hx e Hxrr (Tabela 9). Para AE, não há diferença entre os híbridos isogênicos e os cruzamentos descendentes dentro da mesma proporção, mas diferenças são observadas entre as progênies com 50 e 25%, em relação às progênies com 75% e 100%, os quais possuem as menores alturas até a espiga principal. Para a variável AP, não ocorreram diferenças estatísticas entre os híbridos isoladamente e nem entre os cruzamentos 75% híbridos e 25% Rosado e 25% híbridos e 75% Rosado (Tabela 9).

Para as variáveis relacionadas a altura das plantas (AE, AFB, AIP e AFP), observa-se que todos os cruzamentos com os híbridos, diferenciaram estatisticamente da variedade crioula Rosado, apresentando-se com menores alturas que a variedade crioula em estudo (Tabela 9).

Os resultados das análises de variância para os caracteres de rendimento (PRO, NFE, NGF, CE, DE, DS, PECP, PESP, P1000 e PROD), avaliados em três híbridos isogênicos da série BG7060, na variedade crioula de milho Rosado e nos seus respectivos descendentes (75, 50 e 25%) estão apresentados na Tabela 4. Os valores estimados para o coeficiente de variação para as características PRO, NFE, NGF, CE, DE, DS, PECP, PESP, P1000 e PROD foram de 3,99%, 4,02%, 7,24%, 5,67%, 3,31%, 4,01%, 12,80%, 14,20%, 6,26% e 14,38% respectivamente (Tabela 10).

Para os caracteres PRO, NFE, CE, DE, PECP, PESP, P1000 e PROD, diferenças significativas foram observadas entre os híbridos isogênicos em estudo (Tabela 10). O híbrido NGM se diferenciou dos híbridos transgênicos Hx e Hxrr para NFE, CE, DE, PECP, PESP, P1000 e PROD, apresentando menor número de fileiras nas espigas, maior comprimento e diâmetro das espigas, maiores pesos das espigas com e sem palha, maior peso de mil grãos e maior produtividade que os híbridos Hx e Hxrr. Para estes caracteres, a presença de transgênia interferiu no aumento do número de grãos por fileira, algo positivo e esperado, e reduziu o comprimento, o diâmetro e o peso das espigas, além do peso dos grãos e produtividade.

Para NGF e DS, por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre os híbridos isogênicos (NGM, Hx e Hxrr). Mas todos os híbridos apresentaram maior número de grãos por fileira e maior diâmetro do sabugo do que a variedade crioula Rosado (Tabela 10).

**Tabela 10.** Médias obtidas de três híbridos isogênicos de milho da série BG7060, sob fluxo gênico com a variedade crioula de milho Rosado, para os caracteres de rendimento do milho. Florianópolis-SC. Safra 2016/2017.

Variável	Híbridos	Fluxos Gênicos			Rosado	Média	CV (%)	
		75%	50%	25%				
PRO	NGM	1,01 b	0,96 b	0,88 c	0,98 b	0,91 c	0,99	3,99
	Hx	0,99 b	0,99 b	1,02 a	1,05 a			
	Hxrr	1,04 a	1,05 a	0,99 b	1,03 a			
NFE	NGM	12,64 b	13,15 a	11,28 c	12,36 b	12,05 b	12,63	4,02
	Hx	13,44 a	12,38 b	12,76 b	12,70 b			
	Hxrr	13,19 a	13,37 a	12,36 b	12,53 b			
NGF	NGM	32,33 a	29,38 a	23,10 c	27,08 b	26,33 b	28,93	7,24
	Hx	30,29 a	29,40 a	29,48 a	31,77 a			
	Hxrr	28,71 a	28,72 a	30,82 a	28,65 a			
CE (cm)	NGM	15,64 a	15,86 a	14,36 b	14,88 b	14,11 b	14,92	5,67
	Hx	14,51 b	14,56 b	14,38 b	15,78 a			
	Hxrr	14,57 b	14,83 b	15,60 a	14,92 b			
DE (mm)	NGM	45,24 a	43,43 a	39,25 c	45,04 a	45,56 a	43,79	3,31
	Hx	42,79 b	42,79 b	44,63 a	44,58 a			
	Hxrr	41,87 b	43,50 a	44,06 a	46,55 a			
DS (mm)	NGM	27,02 a	26,21 a	23,39 b	27,30 a	26,01 a	26,25	4,01
	Hx	26,35 a	26,68 a	27,31 a	25,41 a			
	Hxrr	25,53 a	26,38 a	26,11 a	27,60 a			
PECP (Kg)	NGM	3,43 a	3,27 a	1,97 c	2,95 a	2,94 a	2,91	12,80
	Hx	2,57 b	2,79 b	3,03 a	3,55 a			
	Hxrr	2,53 b	2,67 b	3,02 a	3,11 a			
PESP (Kg)	NGM	3,08 a	2,80 a	1,49 c	2,55 b	2,42 a	2,53	14,20
	Hx	2,29 b	2,42 b	2,64 b	3,14 a			
	Hxrr	2,28 b	2,36 b	1,94 b	2,69 b			
P1000 (g)	NGM	268,15 b	256,83 b	261,74 b	295,13 a	278,14 a	255,08	6,26
	Hx	204,82 c	244,76 b	260,27 b	264,93 b			
	Hxrr	217,14 c	230,43 c	265,67 b	268,08 b			
PROD (t ha <sup>-1</sup> )	NGM	13,44 a	10,76 b	5,83 d	8,51 c	8,97 c	9,57	14,38
	Hx	9,15 c	9,59 c	9,63 c	11,76 b			
	Hxrr	9,00 c	8,53 c	9,59 c	9,71 c			

\*Médias seguidas pela mesma letra para cada variável não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade. NGM (não geneticamente modificado), Hx (um evento transgênico) e Hxrr (dois eventos transgênico). PRO (prolificidade), NFE (número de fileiras de grãos na espiga), NGF (número de grãos por fileira na espiga), CE (comprimento da espiga), DE (diâmetro da espiga), DS (diâmetro do sabugo), PECP (peso das espigas com palha da parcela), PESP (peso das espigas sem palha da parcela), P1000 (peso de 1000 grãos) e PROD (produção).

Para PRO, o híbrido Hxrr se diferenciou dos demais híbridos (Hx e NGM), apresentando maior prolificidade. Em relação aos cruzamentos, a maioria diferiu da variedade crioula, com exceção do cruzamento 50% NGM e 50% Rosado. O mesmo padrão pode ser observado para a característica NGF, onde a única progênie semelhante à variedade crioula foi 25% NGM; as demais diferenciaram da variedade Rosado, apresentando número de grãos por fileiras nas espigas maiores (75NGM, 75Hx, 50Hx, 25Hx, 75Hxrr, 50Hxrr e 25Hxrr) ou menores (50NGM).

Para a variável NFE e DE, o híbrido NGM não difere estatisticamente da variedade crioula Rosado, porém se diferencia dos demais híbridos transgênicos que apresentam maior número de fileiras nas espigas e menor diâmetro da espiga. Para a variável CE, ocorre o oposto, considerando que os híbridos transgênicos (Hx e Hxrr) não diferem significativamente do Rosado, porém, diferem do híbrido NGM com os maiores comprimentos de espiga. A falta de tendência também foi observada nas progênies analisadas para essa variável. Para DS, não há diferença significativa entre os híbridos avaliados em relação ao Rosado. Quanto aos descendentes, somente a progênie 50% NGM se diferencia das demais e do Rosado, apresentando o menor diâmetro do sabugo.

Para PECP, as progênies 75% Hx e 75% Hxrr não apresentam diferenças entre si, nem com seus genitores, porém, as progênies 50% Hx e 50% Hxrr e 25% Hx e 25% Hxrr de fluxo gênico, diferem apenas de seus respectivos genitores, mas não da variedade crioula Rosado (Tabela 10). Para PESP, o híbrido NGM difere em relação aos transgênicos (Hx e Hxrr), para os cruzamentos de 75% híbridos e 25% Rosado e 50% Híbridos e Rosado, a diferenças entre os cruzamentos com o híbrido NGM difere em relação aos cruzamentos com os transgênicos (Hx e Hxrr).

Para PROD, os híbridos Hx e Hxrr não se diferenciam da variedade crioula Rosado, embora estes híbridos tenham passado por programas de melhoramento.

## 4.0 DISCUSSÃO

### 4.1 EFEITOS DO FLUXO GÊNICO ENTRE TRANSGÊNICOS E CRIOULO SOBRE A RESISTÊNCIA A HELMINTOSPORIOSE

Os resultados observados nos caracteres de resistência a helmintosporiose (INCI, INCU, LATE, AACPD 2013 e 2016/2017) sugerem que as diferenças quanto à reação dos híbridos isogênicos transgênicos (Hx, Hxrr) e convencional (NGM) podem ser atribuídas aos genes exógenos ou aos eventos inseridos no genoma do milho, considerando que o único componente genético que os diferencia decorre da ausência (NGM) ou presença dos transgenes, de qual evento foi inserido no seu genoma (TC1507 ou TC1507+NK603), da quantidade de eventos inseridos no genoma e da localização das inserções.

A esse respeito, para os caracteres AACPD safra 2013 e 2016/2017, a presença de genes exógenos faz com que as plantas apresentem maior severidade da helmintosporiose. Para as características INCI, INCU, LATE, a presença de genes exógenos e a maior quantidade de genes exógenos influencia na maior incidência, no menor período de incubação e menor período latente da helmintosporiose.

Os efeitos de TC1507 isolado (transgenes *cry1F* e *pat* em Hx) e de TC1507 combinado a NK603 (transgene *cp4 epsps* em Hxrr), sobre a interação com os caracteres de resistência a helmintosporiose avaliados, não foram similares e sugere que ocorra algum tipo de interação entre os eventos TC1507 e NK603 capaz de gerar um efeito diferenciado sobre os caracteres da planta. A esse respeito, no capítulo anterior, este resultado já foi discutido, comprovando que outros estudos ainda poderiam agregar novos conhecimentos sobre os efeitos individuais e combinados dos transgenes, a partir de um conjunto de cultivares isogênicas portadoras de genes exógenos isolados e piramidados em todas as combinações.

No presente estudo, foi observado que os híbridos transgênicos apresentam para os caracteres de resistência a helmintosporiose maior incidência, menor período de incubação e latência na safra 2016/2017 e maior severidade da helmintosporiose para safra 2013 em relação ao híbrido convencional. Em alguns casos, a reação dos

cruzamentos frente a helmintosporiose distingui-se inclusive dos dois parentais (híbridos e Rosado), tal como ocorreu para INCI e AACPD safra 2013.

A coexistência entre variedades modernas melhoradas e as variedades crioulas, especialmente em centros de origem e diversidade biológica do milho, teve seu destaque em 2001, quando David Quist e Ignacio Chapela, dois biólogos de plantas da Universidade da Califórnia em Berkeley, publicaram na Nature que haviam encontrado transgenes introgridos em variedades locais de milho nas montanhas de Oaxaca, México (Quist e Chapela, 2001). A partir daí a indefinição das possíveis causas ou entendimento do comportamento do fluxo gênico entre cultivares transgênicas e variedades crioulas ainda é uma incógnita.

No trabalho realizado por Lu et al. (2016), os efeitos de contaminação de transgenes de culturas domesticadas sobre ancestrais selvagens ou plantas ruderais revelam que a adequação relativa de linhagens, que são o resultado do fluxo gênico entre uma cultura transgênica e um parente silvestre/daninho, não podem ser facilmente previstos a priori. A presença de transgenes, por vezes, se correlaciona com o aumento da aptidão relativa, diminuição da aptidão relativa, ou nenhuma mudança na aptidão relativa. Da mesma forma, estudos suficientes se acumularam para demonstrar que o background genético e o ambiente podem, às vezes, desempenhar um papel-chave na determinação da direção e magnitude dos efeitos de adequação dos transgenes

Um desses estudos é apresentado por Xia et al. (2016), no qual foi medido os efeitos de aptidão de transgenes cultivados resistentes a insetos que foram introgridos em várias linhagens de arroz. O efeito de aptidão relativa do transgene variou com o ambiente (nível de infestação de insetos) e com o genótipo (fundo genético das diferentes linhagens). Os resultados sugerem que os efeitos de aptidão de um transgene resistente a insetos introgridido em populações de plantas ruderais não são uniformes em diferentes ambientes e genótipos das plantas receptoras que adquiriram o transgene. Portanto, esses fatores devem ser considerados ao avaliar o impacto ambiental do fluxo de transgenes para plantas ruderais ou de arroz silvestre.

## 4.2 EFEITOS DO FLUXO GÊNICO ENTRE TRANSGÊNICOS E CRIOULO SOBRE CARACTERES FENOLÓGICOS, AGRONÔMICOS E DE RENDIMENTO DE GRÃOS

Os resultados observados para os caracteres FM, FF, MF, PRO, NFE, CE, DE, PECP, PESP, P1000 e PROD indicam que as diferenças quanto à reação dos híbridos isogênicos podem ser atribuídas aos genes exógenos ou aos eventos inseridos no genoma do milho. A esse respeito, para os caracteres FF, NFE, CE, DE, PECP, PESP, P1000 e PROD, a presença de genes exógenos faz com que as plantas apresentem maior número de graus dias para entrar em florescimento feminino, maior número de fileiras nas espigas, menor comprimento e diâmetro das espigas, menor peso das espigas com e sem palha, menor peso de 1000 grãos e menor produtividade. Para a característica MF, a presença de transgênes com excessão do evento transgênico NK603, faz com que as plantas necessitem de maior número de graus dias para entrar em maturação fisiológica. Na avaliação das características FM e PRO a presença de genes exógenos e a maior quantidade de genes exógenos (TC1507+NK603) influencia no menor período de incubação e menor período latente da helmintosporiose, maiores graus dias para entrar em florescimento masculino e maior prolificidade. Para os demais caracteres avaliados não foram observadas diferenças significativas entre os híbridos isogênicos.

Os efeitos de TC1507 isolado (transgenes *cry1F* e *pat* em Hx) e de TC1507 combinado a NK603 (transgene *cp4epsps* combinado a *cry1F* e *pat* em Hxrr) sobre os caracteres associados a helmintosporiose não foram similares e sugere que ocorre algum tipo de interação entre os eventos TC1507 e NK603 capaz de gerar um efeito diferenciado sobre os caracteres da planta. A esse respeito, outros estudos poderiam agregar novos conhecimentos sobre os efeitos individuais e combinados dos transgenes, a partir de um conjunto de cultivares isogênicas portadoras de genes exógenos isolados e piramidados em todas as combinações.

Alguns estudos na literatura mostram divergência em comparação aos resultados obtidos no presente trabalho, como por exemplo, o estudo realizado por Cerqueira et al. (2017), os quais trabalharam com um híbrido de milho quase-isogênico não-geneticamente modificado (não-GM) e dois híbridos comerciais GM, visando determinar o desempenho agronômico dos híbridos de milho GM e sua

equivalência ao milho híbrido não transgênico. Os autores constataram que os atributos agronômicos para todas as entradas GM foram estatisticamente indistinguíveis do híbrido próximo-isogênico não-GM. Além disso, a maioria das avaliações agronômicas caiu dentro do intervalo das variedades comerciais incluídas no estudo. Tomados em conjunto, verificou-se que MON 89034 × TC1507 × NK603 × DAS-40278, MON 89034 × TC1507 × NK603 e DAS-40278-9 eram agronomicamente equivalentes ao milho não GM

Em contrapartida, outros estudos apresentam semelhanças aos resultados obtidos no presente trabalho, como por exemplo, o estudo realizado por Balieiro Neto et al. (2013), com o objetivo de avaliar o efeito de danos ocasionados por pragas sobre as características morfológicas, estruturais e a composição química dos híbridos de milho DKB390 e AG8088, contendo o gene *cry1Ab*, e de suas contrapartes convencionais. Nesse estudo, os autores detectaram que os híbridos contendo o gene *cry1Ab* tiveram maiores quantidade e percentual de material morto, altura da planta e altura da espiga, quando comparados aos seus isogênicos não-GM, além de haver maior transferência de nutrientes do colmo para o enchimento dos grãos e menor relação espiga/colmo na planta transgênica.

Em outro estudo realizado por Prado et al. (2016), objetivando avaliar o desempenho agronômico de híbridos de milho transgênico e seus respectivos isogênicos não geneticamente modificados em dois locais de Mato Grosso do Sul, os autores observaram que em todos os ambientes as maiores médias de produtividade de grãos foram dos híbridos transgênicos e o híbrido que obteve a maior média de produtividade de grãos em relação aos ambientes foi o isogênico convencional não geneticamente modificado, AG7000.

Esses estudos mostram que os efeitos dos transgenes sobre variados caracteres em milho ainda são conflitantes ou, no mínimo, insuficientes para se chegar a um consenso sobre prejuízos, benefícios ou neutralidade para as plantas frente a presença ou ausência de transgenes ou o número de transgenes inseridos em seu genoma. Isso reforça a necessidade de mais estudos envolvendo as interações estabelecidas entre plantas e transgenes.

No presente estudo, foi observado que os fluxos gênicos entre a variedade Rosado com os híbridos isogênicos em três proporções, diferiram entre si para a

maioria dos caracteres avaliados (FF, FM, PA, AFB, AIP, AIPP, AP, NRP, NFAE, PRO, NFE, NGF, CE, DE, DS, PECP, PESP, P1000 e PROD). Para os caracteres NFAE, PRO, PECP, PESP e PROD, a presença de genes exógenos contribuiu para o aumento do número de folhas acima da espiga e da prolificidade, bem como para a redução do peso de espigas com e sem palha e da produtividade.

O fluxo gênico simulado entre os híbridos isogênicos com a variedade crioula Rosado, influenciou em caracteres fenológicos, agronômicos e de rendimento do milho. Em alguns casos, os fluxos gênicos gerados se diferenciaram totalmente da variedade crioula, como por exemplo: FF para os fluxos gênicos com os híbridos transgênicos, AE, AFB, AIP, AIPP e AP para todos os fluxos gênicos avaliados, NGF, PRO e P1000 para os fluxos gênicos com os híbridos transgênicos. Em outra situação, diferenças ocorreram inclusive dos dois parentais (Híbridos e Rosado), gerando indivíduos com características diferentes dos seus pais, como por exemplo: para FM, FF, PA, AE, AFB, AIP, AIPP, AP, NRP, NFAE, PRO, NGF, DE, P1000 e PROD.

Trabalhos já realizados pelo Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade com estes mesmos híbridos da série BG7060, observaram diferenças na diversidade de endófitos nas folhas do milho, entre as populações sem transgenia daquelas que continham o transgene com dois eventos transgênicos *Hxrr*. Isso sugere que a expressão dos transgenes, interação entre eles ou, até mesmo, a epistasia entre esses e o genoma do milho, afetam a comunidade de fungos endofíticos (SILVA et al., 2016a). Em outro trabalho realizado por Lohn (2014), avaliando o mesmo material vegetal, o autor observou que os grupos funcionais proteínas e carboidratos sofreram alterações, na avaliação de grãos inteiros por Drifts, quando comparado a variedade crioula Rosado com as introgressões do híbrido transgênico *Hxrr* sobre o Rosado. Assim, pode-se inferir que houve alterações significativas quando o milho crioulo sofre introgressões do híbrido *Hxrr*, tanto sobre os fungos endofíticos quanto sobre o metaboloma dos grãos.

#### 4.3 IMPACTOS SOBRE A AGROBIODIVERSIDADE DO EOSC

Os estudos realizados até então sobre o tema ‘transgenes e seus efeitos sobre organismos não-alvo’ requerem um aprofundamento, sobretudo quanto aos impactos

dessas biotecnologias sobre a conservação da agrobiodiversidade no âmbito da agricultura familiar (VAN HEERWAARDEN et al., 2012).

Como foi observado nos resultados deste trabalho o fluxo gênico entre os híbridos isogênicos com a variedade crioula Rosado, apresentou influência sobre caracteres de resistência a doença, fenológicos, agronômicos e de rendimento do milho. Observou-se em alguns dos caracteres avaliados que os fluxos gênicos gerados se diferenciaram da variedade crioula, em outra situação, as diferenças ocorreram entre os híbridos com e sem transgenia e com número de transgenias diferentes e ainda houve diferenças inclusive dos dois parentais estudados os híbridos e o Rosado, gerando indivíduos com características diferentes dos seus pais.

Neste contexto, o presente trabalho traz em discussão a necessidade da realização de pesquisas que analisem os impactos decorrentes do fluxo gênico responsável pela contaminação dos cultivos convencionais (MELLON; RISSLER, 2004; BUCCHINI; GOLDMAN, 2002) ou de base agroecológica, assim como das variedades crioulas (SILVA et al., 2016b; IVERSEN et al., 2014; JACOBSON; MYHR, 2012; EZCURRA, ORTIZ; SOBERON-MAINERO, 2002; QUIST; CHAPELA, 2001) e de seus parentes silvestres (COSTA et al., 2016; SILVA et al., 2015; SCHOEN et al., 2008), por pólen de cultivares transgênicas.

No caso das variedades crioulas, os riscos ainda podem ser maiores, já que ao contrário dos agricultores que produzem variedades convencionais ou transgênicas, a maioria dos pequenos agricultores familiares recuperam suas sementes da colheita anterior e, frequentemente, adquirem sementes de outros agricultores através de um sistema tradicional apoiado em regras, expectativas e práticas baseadas na família e redes sociais locais (SILVA; OGLIARI, 2015; CHAMBERS; BRUSH, 2010). Este sistema tradicional liga de forma eficaz todas as populações de milho individuais ou lotes de sementes, em uma única metapopulação (SILVA; OGLIARI, 2015; LOUETTE, 2000). O destino de um transgene, que ultrapassou os limites da área de cultivo, está sujeito aos efeitos, a longo prazo, dos processos genéticos populacionais como a deriva, o fluxo de genes e a seleção (VAN HEERWAARDEN et al., 2010), podendo resultar na perda de diversas variedades crioulas mantidas por agricultores familiares.

Se for levado em consideração que este fato está ocorrendo na região EOSC, onde há uma ligação entre populações de milho através dos mantenedores de

variedades crioulas, que estabelecem redes de trocas de sementes bem definidas (COSTA et al., 2016; SILVA; OGLIARI, 2015), a iminência de contaminação de algumas destas populações e a perpetuação dos transgenes poderia ser alavancada dentro desta rede e expandida à toda região.

Os impactos biológicos sobre a conservação da agrobiodiversidade seriam imprevisíveis, considerando que o EOSC tem sido indicado como microcentro de diversidade de milho. Essa indicação da região de estudo como um microcentro de diversidade do gênero *Zea*, fora da sua área nuclear de origem filogenética, no México, deveu-se às seguintes particularidades: existência de rica diversidade de variedades crioulas (COSTA et al., 2016); presença de raças indígenas antigas (SILVA et al., 2016b); evolução de novas raças pelo manejo dos agricultores (SILVA et al., 2016b); e presença de populações de parentes silvestres do milho em processo de domesticação, coexistindo simpatricamente com as formas cultivadas, algumas das quais foram classificadas como *Zea luxurians* (ANDRÉ, 2016; SILVA et al., 2015).

Apenas uma pequena parte dessa diversidade do gênero *Zea* tem sido caracterizada e destacada como recursos genéticos de elevado potencial agrônomo (ANDRÉ, 2016; OGLIARI et al, 2013), adaptativo (GONÇALVES, 2016; SASSE, 2008), culinário (SILVA et al., 2016b), bem como nutricional, funcional e medicinal (KUHLEN et al, 2012; KUHLEN et al., 2011; KUHLEN et al., 2010). Com a contaminação da agrobiodiversidade por transgenes, todas essas funções poderiam ser perdidas como consequência da erosão genética e da perda de atributos tão essenciais para os agricultores que as conservam.

Os impactos ecológicos do fluxo gênico entre as cultivares transgênicas e as populações de teosintes nessa região do Brasil são relevantes para os ecossistemas agrícolas da região EOSC, por isso, também deveria ser analisado do ponto de vista da biossegurança. A constatação de fluxo gênico entre as formas silvestres do gênero *Zea* e o milho transgênico é consequência da contaminação de plantas espontâneas de teosinto (parente silvestre do milho), em lavouras cultivadas por híbridos de milho transgênico (SILVA et al., 2015).

Os riscos de danos ao ecossistema agrícola da região são imprevisíveis, considerando que alguns híbridos transgênicos mais cultivados na região são portadores de eventos que conferem resistência a herbicidas, tais como TC1507

(transgene *pat*) e NK603 (transgene *cp4 epsps*). Além disso, os híbridos F1 entre ambas as espécies já foram identificadas no EOSC e, a partir disso, as populações espontâneas de teosinto podem estar servindo como espécie-ponte para a ocorrência indesejável de transferências de genes interespecífica, ou seja, entre teosintos contaminados e variedades crioulas.

A liberação comercial do primeiro milho transgênico no Brasil – evento MON810 ou Milho Guardian – baseou-se em Parecer Técnico nº 1100/2007, que desconsiderou a presença do parente silvestre do milho em algumas regiões do país, ao afirmar que *“não há no Brasil espécies silvestres que o milho possa se intercruzar, já que a espécie silvestre mais próxima ao milho é o teosinte, encontrado apenas no México e em alguns locais da América Central, onde pode cruzar com milho cultivado em campos de produção”*.

A inexistência de avaliações de risco particulares aos diferentes ecossistemas agrícolas do Brasil também resultou na padronização da norma de biossegurança, que permitiu a coexistência entre diferentes sistemas de produção no campo, ou seja, entre cultivos de milho geneticamente modificados (GM) e cultivos não geneticamente modificados (NGM) - melhorados ou crioulos - sem a ocorrência de contaminação destes últimos.

O princípio da coexistência entre GM e NGM, baseado em distâncias mínimas de isolamento entre lavouras de milho GM e NGM, está disposto no artigo 2 da Resolução Normativa nº 4 (RN4), publicada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), no Diário Oficial da União de 23/08/2007, conforme o seguinte texto: *“Para permitir a coexistência, a distância mínima entre uma lavoura de milho geneticamente modificado e outra de milho não geneticamente modificado, localizada em área vizinha, deve ser igual ou superior a 100 metros ou, alternativamente, 20 metros, desde que acrescida de bordadura com, no mínimo, dez fileiras de plantas de milho convencional de porte e ciclo vegetativo similar ao milho geneticamente modificado”*.

Essa resolução também desconsiderou a vulnerabilidade do ecossistema agrícola particular da região sul do país ao desconsiderar levantamento prévio à liberação do milho transgênico, publicado por Cordeiro et al (2008). Nesse levantamento, os autores já haviam destacado os riscos de contaminação por razões

espaciais e geográficas, principalmente com relação às limitações topográficas, elevada densidade das propriedades agrícolas por área, tamanho pequeno das propriedades rurais (em geral, menores do que 20 ha), falta de isolamento temporal e espacial entre lavouras de milho e ajustes de conduta às exigências da legislação florestal.

Diante disso, faz-se necessário maior empenho das autoridades para com essa situação que é tão recorrente e que pode prejudicar uma grande biodiversidade existente, além é claro dos mantenedores dessa grande biodiversidade que cuidam e lidam no dia-a-dia com as variedades crioulas de milho, tirando seu sustento das mesmas.

## 5.0 CONCLUSÕES

O fluxo gênico entre híbridos isogênicos e a variedade crioula Rosado é diferente entre os híbridos isogênicos da série BG7060 (NGM, Hx e Hxrr) e a resistência a helmintosporiose, caracteres fenológicos, agrônômicos e de rendimento são influenciados pelo mesmo.

Os impactos biológicos do fluxo gênico entre híbridos e variedades crioulas, são imprevisíveis sobre a conservação e uso da agrobiodiversidade do EOOSC.

## REFERÊNCIAS

ABRAMILHO - Associação Brasileira dos produtores de milho. **Área para milho e soja deve crescer**. 2011. Disponível em:

<<http://www.abramilho.org.br/noticias.php?cod=1601>>, Acessado em: 16 de janeiro de 2016.

AGBIOS. **Information on GM Approved Products (2008)**. Disponível em:

<<http://www.agbios.com/dbase.php>>. Acesso em: 2 Mai. 2016.

AGROCERES. **Guia Agrocere de sanidade**. 2 edição. 1996. 72p.

ANDRÉ, R.V. **Diversidade das populações locais de milho de Anchieta e Guaraciaba, Oeste de Santa Catarina: múltiplas abordagens para sua compreensão**. Florianópolis, 2016, 195f, Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

ANDREOTE, F.D.; ROSSETTO, P.B.; MENDES, R.; AVILA, L.A.; LABATE, C.A.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Bacterial community in the rhizosphere and rhizoplane of wild type and transgenic eucalyptus. **World J. Microb. Biot.**, 25:1065–1073, 2009.

ARIYAWANSA, H.A.; THAMBUGALA, K.M.; MANAMGODA, D.S.; JAYAWARDENA, R.; CAMPORESI, E.; BOONMEE, S.; WANASINGHE, D.N.; PHOOKAMSAK, R.; HONGSANAN, S.; SINGTRIPOP, C.; CHUKEATIROTE, E.; KANG, J.; GARETH JONES, E. B.; HYDE, K.D. Towards a natural classification and backbone tree for *Pleosporaceae*. **Fungal Diversity**, 71:85–139, 2015.

BALIEIRO NETO, G.; CIVIDANES, T.M.S.; BRANCO, R.B.F.; BUENO, M.S.; POSSENTI, R.; NOGUEIRA, J.R. danos causados por pragas na estrutura, morfologia e composição de híbridos de milho *bt* para silagem. **B. Indústria Anim.**, v.70, n.3, p.252-260, 2013.

BIOGENE, Híbridos de Milho: BG7060. DuPont: Pioneer, 2016. Disponível em: <http://www.biogene.com.br/milho/produtos/bg7060>. Acesso em: 05 mar, 2016.

BLEICHER, J. **Níveis de resistência a *Helminthosporium turcicum* Pass. em três ciclos de seleção em milho pipoca (*Zea mays* L.)**. Piracicaba. 1988. 130p. Tese (Doutorado) - ESALQ – SP, 1988.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Resolução normativa nº 04, de 16 de agosto de 2007. Dispõe sobre as distâncias mínimas entre cultivos comerciais de milho geneticamente modificado e não geneticamente modificado, visando à coexistência entre os sistemas de produção. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 23 ago. 2007. Seção 1, p.19.

\_\_\_\_\_. Parecer Técnico nº 1100/ 2007. Dispõe sobre a Liberação Comercial de Milho Geneticamente Modificado resistente a Insetos Evento MON810. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 2007.

\_\_\_\_\_. Parecer Técnico nº 2053/2009. Dispõe sobre a Liberação Comercial de Milho Resistente a Insetos da Ordem Lepidoptera e Tolerância ao Herbicida Glifosato, evento TC 1507 x NK 603. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 2009.

BUCCHINI, L.; GOLDMAN, L.R. Starlink corn: a risk analysis. **Environmental health perspectives**, 110: 5, 2002.

BURGEFF, C.; HUERTA, E.; ACEVEDO, F.; SARUKHÁN, J. How Much Can GMO and Non-GMO Cultivars Coexist in a Megadiverse Country? **AgBioForum**, 17(1): 90-101, 2014.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley & Sons, 1990.

CANCI, A., ALVES, A.C.; GUADAGNIN, A. **Kit diversidade, estratégias para a segurança alimentar e valorização das sementes locais**. São Miguel do Oeste: Mclee, 2010. 208 p.

CANCI, A.; VOGT, J.A.; CANCI, I.J. **A Diversidade das espécies crioulas em Anchieta - SC**. São Miguel do Oeste: Mclee, 2004. 212 p.

CANCI, I. **Relações dos sistemas informais de conhecimento no manejo da agrobiodiversidade no Oeste de Santa Catarina**. Florianópolis. 191p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

CERQUEIRA, D.T.R.; SCHAFER, A.C.; FAST, B.J.; HERMAN, R.A. Agronomic performance of insect-protected and herbicide-tolerant MON 89034 × TC1507 × NK603 × DAS-40278-9 corn is equivalent to that of conventional corn. **GM Crops Food**, 8(3):149-155, 2017.

CHAMBERS, K.J.; BRUSH, S.B. Geographic Influences on Maize Seed Exchange in the Bajío, Mexico. **The Professional Geographer**, 62: 305–322, 2010.

CHEEKE, T.E.; DARBY, H.; ROSENSTIEL, T.N.; BEVER, J.D.; CRUZAN, M.B. Effect of *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize cultivation history on arbuscular mycorrhizal fungal colonization, spore abundance and diversity, and plant growth. **Agric. Ecosys. Environ.**, 195: 29–35, 2014.

CHEEKE, T.E.; ROSENSTIEL, T.N.; CRUZAN, M.B. Evidence of reduced arbuscular mycorrhizal fungal colonization in multiple lines of *Bt* maize. **Am. J. Bot.**, 99: 700–707, 2012.

CHEN, Y.; TIAN, J.; WANG, W.; FANG, Q.; AKHTAR, Z. R.; PENG, Y.; CUI, H.; GUO, Y.; SONG, Q.; YE, G. *Bt* rice expressing *Cry1Ab* does not stimulate an outbreak of its non-target herbivore, *Nilaparvata lugens*. **Transgenic Research**, 21:2, p. 279-291, 2012.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento, Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v.5 – safra 2017/18 – n.7: Sétimo levantamento, abr. 2018. Brasília, 2018. 144 p.

CONTI, R.; GUIMARAES, D.O.; PUPO, M.T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Cienc. Cult.**, v.64, n.3, pp. 43-47, 2012.

CORDEIRO, A., ALVES, A. C. OGLIARI, J. B. Challenges for co-existence in small-scale farming: the case of maize in Brazil. In: BRECKLING, B., REUTER, H. e

VERHOEVEN, R. (Org.). Implications of GM-Crop Cultivation at Large Spatial Scales. **Theorie in der Ökologie**, 14. Frankfurt: Peter Lang, 2008, p. 134-139.

COSTA, F, M,; SILVA, N, C, A,; OGLIARI, J, B,, Maize diversity in southern Brazil: indication of a microcenter of *Zea mays* L, **Genet, Resour, Crop, Evol**,, 2016.

COTTA, S. R.; DIAS, A.C.F.; MARRIEL, I.E.; ANDREOTE, F.D.; SELDIN, L.; ELSAS, J.D. Different effects of transgenic maize and nontransgenic maize on nitrogen-transforming archaea and bacteria in tropical soils. **Applied and Environmental Microbiology**, 80: 20, p. 6437–6445, 2014.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v.35, n.3, p.271-276, 2013.

EZCURRA, E.; ORTIZ, S.; SOBERON-MAINERO, J. **Evidence of gene flow from transgenic maize to local varieties in Mexico**. Lmos and the environment: An international conference. 2002.

GONÇALVES, G.M.B. Caracterização e divergência genética de variedades crioulas de milho pipoca conservadas por agricultores do Oeste de Santa Catarina. Florianópolis, 2016, 141f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

HUFFORD, M.B.; LUBINKSY, P.; PYHÄJÄRVI, T.; DEVENGENZO, M.T.; ELLSTRAND, N.C. The Genomic Signature of Crop-Wild Introgression in Maize. **PLoS Genet.**, 9(9): 10, 2013.

Instituto do Controle do Espaço Aéreo - ICEA. **Arquivo meteorológico**. Subdivisão de Climatologia e Arquivos Meteorológicos. 2017. Disponível em: <http://pesquisa.icea.gov.br/climatologia/arquivo.php>. Acesso em: abril, 2017.

IVERSEN, M.; GRØNSBERG, I.M.; van den BERG, J.; FISCHER, K.; AHETO, D.W.; BØHN, T. Detection of Transgenes in Local Maize Varieties of Small-Scale Farmers in Eastern Cape, South Africa. **PLoS ONE**, v. 9, e116147, 2014.

JACOBSON, K.; MYHR, A.I. GM Crops and Smallholders: Biosafety and Local Practice. **Journal of Environment & Development**, v.22, p. 104-124, 2012.

KIST, V,; ALBINO, V,S,; MARASCHIN, M,; OGLIARI, J,B, Genetic variability for carotenoid content of grains in a composite maize population, **Sci, Agr**,, 1:480-487, 2014.

KUHNEN, S,; DIAS, P,; OGLIARI, J,B,; MARASCHIN, M, Brazilian Maize Landraces Silks as Source of Lutein: An Important Carotenoid in the Prevention of Age-Related Macular Degeneration, **Food and Nutri, Sci**,, 3:1609-1614, 2012.

KUHNEN, S.; MENEL LEMOS, P. M.; CAMPESTRINI, L.H.; OGLIARI, J.B.; DIAS, P.F.; MARASCHIN, M. Carotenoid and anthocyanin contents of grains of Brazilian maize landraces. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 1548-1553, 2011.

KUHNEN, S.; OGLIARI, J.B.; DIAS, P.F.; SANTOS, M.S; FERREIRA, A.G.; BONHAM, C.C.; WOOD, K.V.; MARASCHIN, M. Metabolic Fingerprint of Brazilian Maize Landraces Silk (Stigma/Styles) Using NMR Spectroscopy and Chemometric Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2194-2200, 2010.

LIMA JUNIOR, I.S.; DEGRANDE, P. E.; BERTONCELLO, T. F.; MELO, E. P.; SUEKANE, R. Avaliação quantitativa do impacto do algodão-bt na população de araneae, carabidae e formicidae predadores ocorrentes sobre o solo. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 29, n. 1, p. 32-40, Jan./Feb. 2013.

LOHN, A. F. **Metaboloma parcial de milho crioulo submetido a diferentes graus de fluxo gênico por cultivares geneticamente modificadas**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

LOSEY, J. E.; RAYOR, L.S.; CARTER, M.E. Transgenic pollen harms monarch larvae. **Nature**, 399, 214, 1999.

LOUETTE, D. Traditional management of seed and genetic diversity: what is a landrace? In: BRUSH, S.B. (Ed). **Genes in the field: on-farm conservation of crop diversity**. IDRC (International Development Research Centre), 2000.

LU, B.R. Transgene escape from GM crops and potential biosafety consequences: an environmental perspective. **Collection of Biosafety Reviews**, 4: 66–141, 2008.

LU B.R.; YANG X.; ELLSTRAND N.C. 2016. Fitness correlates of crop transgene flow into weedy populations: a case study of weedy rice in China and other examples. **Evolutionary Applications**, 9:857–870.

MELLON, M.; RISSLER, J. **Gone to seed: transgenic contaminants in the traditional seed supply**. Union of Concerned Scientists, 2004.

MESNAGE, R.; AGAPITO-TENFEN, S.; VILPERTE, V.; RENNEY, G.; WARD, M.; SÉRALINI, G.; NODARI, R.O.; ANTONIOU, M.N. An integrated multi-omics analysis of the NK603 Roundup-tolerant GM maize reveals metabolism disturbances caused by the transformation process. **Scientific Reports**, 6:37855, 2016.

NASCIMENTO, V,E,; VON PINHO, E,V,R,; VON PINHO, R,G, SOUZA, J,C,; NASCIMENTO JÚNIOR, A,D. Fluxo gênico em milho geneticamente modificado com resistência a insetos, **Pesq, agropec, bras.**, v,47, n,6, p,784-790, 2012.

OGLIARI, J,B.; KIST, V.; CANCI, A, The participatory genetic enhancement of a local maize variety in Brazil, In: BOEF, W,S,; SUBEDI, A,; PERONI, N,; THIJSSSEN, M,; O'KEEFFE, E, (eds,), **Community biodiversity management, promoting resilience and the conservation of plant genetic resources**, 1rd edn, Abingdon, Oxon, 2013, p, 265-271.

PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos: Interação com as plantas e potencial biotecnológico. **Biociências e Desenvolvimento**, 29: 62- 76, 2002.

POLAND, J,A,; BRADBURY, P,J,; BUCKLER, E,S,; NELSON, R,J, Genome-wide nested association mapping of quantitative resistance to northern leaf blight in maize, **Proc, Natl, Acad, Sci, U S A**, 108:6893–8, 2011.

PRADO, W.S.; ESTEVÃO, W.L.; MAEDA, A.K.M; CARLESSO, A.; GONÇALVES, M.C.; DAVIDE, L.M.C. Agronomic performance of transgenic and isogenic corn hybrids in the state of Mato Grosso do Sul. **Rev. Ceres**, v. 63, n.6, p. 796-806, nov/dez, 2016.

QUIST, D.; CHAPELA, I.H. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oxaca, Mexico. **Nature**, 414 (6863), p. 541-543, 2001.

RAMATHANI, I,; BIRUMA, M,; MARTIN, T,; DIXELIUS, C,; OKORI, P, Disease severity, incidence and races of *Setosphaeria turcica* on sorghum in Uganda, **European Journal of Plant Pathology**, v, 131, p, 383-392, 2011.

ROLAS - Rede Oficial de Análise de Solo e de Tecido Vegetal. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**, 10,ed, Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2004, 400p.

SASSE, S. **Caracterização de variedades locais de milho procedentes de Anchieta-SC quanto à resistência a *Exserohilum turcicum***, Florianópolis, 2008, 88f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

SCHOEN, D.J.; REICHMAN, J.R.; ELLSTRAND, N.C. Transgene escape monitoring, population genetics, and the law. **BioScience**, 58: 71–77, 2008.

SCHWESSINGER, B.; ZIPFEL, C. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 4, p. 389- 395, ago. 2008.

SILVA, K. J. **D Introgessão de híbridos transgênicos e convencional em milho crioulo: efeitos sobre fungos e bactérias endofíticas**, Florianópolis, 2015, 143f, Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

SILVA, K.J.; ARMAS, R.D.; SOARES, C,R,F,S.; OGLIARI, J,B, Communities of endophytic microorganisms in different growth stages in local variety, and transgenic and conventional isogenic hybrids of maize, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 32:189, 2016a.

SILVA, N.C.A.; OGLIARI, J,B. Milho pipoca: mulheres agricultoras conectando o passado e o presente no Extremo Oeste de Santa Catarina. **Agriculturas**,v.12, n. 4, p.31-36, dezembro 2015.

SILVA, N.C.A.; VIDAL, R,; COSTA, F,M,; VAIO, M,; OGLIARI, J,B. Presence of *Zea luxurians* (Durieu and Ascherson) bird in southern Brazil: implications for the conservation of wild relatives of maize, **Plos One** 10: e0139034, 2015.

SILVA, N.C.A.; VIDAL, R,; OGLIARI, J,B. New popcorn races in a diversity microcenter of *Zea mays* L. in the Far West of Santa Catarina, Southern Brazil. **Genetic Resources and Crop Evolution (Print)**, v. 1, p. 1-14, 2016b.

SOUZA, R, **Diversidade de variedades crioulas de milho doce e adocicado conservadas por agricultores do oeste de Santa Catarina**, Florianópolis, 2015, 190f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

STEWART, C.N.; RICHARDS, H.A.; HALFHILL, M.D. Transgenic plants and biosafety: science, misconception and public perceptions. **Biotechniques**, 29: 5, 832–836, 838–843, 2000.

STUART, R.M.; ROMÃO, A.S.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Culturable endophytic filamentous fungi from leaves of transgenic imidazolinone-tolerant sugarcane and its non-transgenic isolines. **Arch Microbiol.**, 192(4):307–313, 2010.

TEAM R, C. **A language and environment for statistical computing**, Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013, Disponível em: <[http://www,R-project.org/](http://www.R-project.org/)>, Acesso em: 10 fev, 2016.

VAN HEERWAARDEN, J.; ORTEGA, D.E.L.; VECCHYO, D.; ALVAREZ-BUYLLA, E.R.; BELLON, M.R. New Genes in Traditional Seed Systems: Diffusion, Detectability and Persistence of Transgenes in a Maize Metapopulation. **PLoS ONE**, 7(10): e46123, 2012.

VAN HEERWAARDEN, J.; VAN EEUWIJK, F.A.; ROSS-IBARRA, J. Genetic diversity in a crop metapopulation. **Heredity**, 104: 28–39, 2010.

VELASCO, A.G.V.; KOWALCHUK, G.A.; MÃNERO, F.J.G.; RAMOS, B.; YERGEAU, E.; GARCÍA, J.A.L. Increased microbial activity and nitrogen mineralization coupled to changes in microbial community structure in the rhizosphere of Bt corn. **Appl Soil Ecol**, 68: 46–56, 2013.

WHITE, D, G, **Compendium of corn diseases**, 3th ed, St, Paul: American Phytopathological Society, 2000, 78 p.

XIA, H.; ZHANG, H. B.; WANG, W.; YANG, X.; WANG, F.; SU, J.; XIA, H. B. et al. Ambient insect pressure and recipient genotypes determine fecundity of transgenic crop-weed rice hybrid progeny: implications for environmental biosafety assessment. *Evolutionary Applications* 9: 847– 856, 2016.

ZHU, Y,; ZHAO, F,; ZHAO, D, Regeneration and transformation of a maize elite inbred line via immature embryo culture and enhanced tolerance to a fungal pathogen *Exserohilum turcicum* with a balsam pear class I chitinase gene, **African Journal of Agricultural Research**, 6 (7), pp, 1923-1930, 4 April 2011.