



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA



**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS E SEVERIDADE DE  
*Exserohilum turcicum* EM CULTIVARES ISOGÊNICAS DE MILHO  
(*Zea mays* L.) CONVENCIONAL E TRANSGÊNICO**

**ALINE MARTINS CARDOZO**

**Florianópolis  
Novembro de 2013**

**Aline Martins Cardozo**

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS E SEVERIDADE DE  
*Exserohilum turcicum* EM CULTIVARES ISOGÊNICAS DE MILHO  
(*Zea mays* L.) CONVENCIONAL E TRANSGÊNICO**

Relatório de estágio apresentado ao curso de Graduação em Agronomia, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Professora Dra. Juliana Bernardi Ogliari

Supervisora: Msc. Kelly Justin da Silva

Universidade Federal de Santa Catarina

**Florianópolis/SC**

**2013.2**

Aos meus pais, Sérgio e Márcia, à minha avó Dionete e à  
minha irmã Mayara, **DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS.

Aos meus pais Sérgio e Márcia, à minha avó Dionete e minha irmã Mayara, por me apoiarem em todas as decisões, pelo amor e pela motivação.

À professora Juliana Bernardi Ogliari, pela orientação durante quatro anos da graduação e também no estágio de conclusão de curso.

À minha amiga e supervisora de estágio Kelly Justin da Silva, pela amizade, paciência em me ensinar e compartilhar seus conhecimentos.

Ao meu amigo André Felipe Lohn, pela ajuda, apoio e amizade durante a graduação.

Aos professores do MIP-UFSC, que gentilmente cederam seus laboratórios para a realização deste trabalho.

Aos colegas do NEABio.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela experiência de vida, crescimento profissional e pessoal.

A todos que participaram da minha formação.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	10
2.1. Importância econômica do milho .....	10
2.2. Culturas geneticamente modificadas .....	10
2.3. Milho geneticamente modificado .....	13
2.4. Aspectos gerais de microrganismos endofíticos .....	15
2.4.1. O que são microrganismos endofíticos? .....	15
2.4.2. Ocorrência e interação dos endófitos com plantas.....	16
2.4.3. Diversidade de fungos endofíticos .....	17
2.4.4. PCR-DGGE .....	18
2.5. Importância da doença causada por <i>Exserohilum turcicum</i> .....	19
2.6. Taxonomia, Sintomas, Etiologia e Controle de <i>E. turcicum</i> .....	20
2.7. Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade - NEABio.....	22
3. OBJETIVOS .....	23
3.1. Objetivo Geral.....	23
3.2. Objetivos específicos .....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
Área de cultivo e material vegetal .....	24
4.2. Caracterização da comunidade de endofíticos .....	25
4.2.1. Extração de DNA.....	25
4.4.2. PCR-DGGE .....	26
4.2.3. Análises estatísticas .....	27
Análises estatísticas.....	27
4.3. Avaliação da severidade de <i>Exserohilum turcicum</i> .....	27
4.3.1. Análise estatística .....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1. Fungos endofíticos .....	29
5.2. Severidade da doença causada por <i>Exserohilum turcicum</i> .....	31
6. CONCLUSÃO.....	35
7. REFERÊNCIAS .....	1
8. ANEXOS .....	12

## RESUMO

Os impactos da transgenia têm sido objeto de debates e investigações, particularmente com relação aos efeitos epistáticos dos transgenes sobre outros caracteres da planta não relacionados aos seus fins. Por essa razão, o objetivo deste trabalho foi avaliar a estrutura da comunidade de fungos endofíticos e a resistência genética de uma cultivar híbrida não geneticamente modificada (NGM), em comparação às suas duas versões isogênicas geneticamente modificadas, sendo uma delas portadora do evento Herculex® (T1507) (GMHx) e a outra portadora dos eventos Herculex® (T1507) + Roundup Ready® (NK603) combinados (GMHxrr). Para tanto, os híbridos (NGM), (GMHx) e (GMHxrr) foram avaliados quanto a resistência a helmintosporiose aos 105, 111, 123, 137 e 146 dias, após semeadura, sob condições de infecção natural, em um experimento desenhado em blocos completos casualizados com três repetições e parcelas constituídas de 10 m<sup>2</sup> de área útil e densidade de 60.000 plantas ha<sup>-1</sup>. A severidade foliar média foi estimada a partir da avaliação de uma amostra de oito plantas da área útil da parcela, por meio de escala diagramática exibindo percentuais de lesão de 0, 1, 3, 6, 10, 25, 50, 75 e 100 %. A estrutura da comunidade de fungos endofíticos foi avaliada por meio da técnica de PCR DGGE, após a extração do DNA total das folhas de milho da mesma amostra de oito plantas selecionadas para avaliação de resistência a helmintosporiose. Os tratamentos apresentaram diferenças significativas pelo teste de Fisher ( $p < 0.05$ ) quanto à severidade média foliar nas avaliações realizadas aos 111, 137 e 146 dias. A cultivar convencional separou-se das cultivares transgênicas pelo teste SNK ao mesmo nível de significância, sendo a cultivar convencional mais resistente a severidade de *Exerohilum turcicum* que as transgênicas. A comunidade de fungos endofíticos variou entre os tratamentos, sendo significativamente diferente entre a cultivar convencional e as cultivares transgênicas (Anosim, R Global = 0.543,  $p < 0,05$ ). As diferenças encontradas sugerem que um ou dois dos eventos inseridos nas cultivares transgênicas podem apresentar efeitos epistáticos sobre os genes associados à reação do milho frente a helmintosporiose, reduzindo a resistência da planta ao patógeno. Alternativamente, essa reação também pode estar associada às mudanças da estrutura da comunidade de fungos endofíticos entre as cultivares, como resultado dos efeitos epistáticos dos transgenes sobre os genes envolvidos nas interações entre plantas e endófitos.

Palavras-chaves: epistasia, milho geneticamente modificado, requeima foliar, PCR-DGGE.

## 1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais cultivados e consumidos no mundo, devido ao seu potencial produtivo, composição química e valor nutritivo. Tem grande importância econômica devido às diversas formas de uso, que vai desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. O uso do milho em grão como alimentação animal representa a maior parte do consumo desse cereal (DEMARCHI, 2011).

Com a crescente demanda deste cereal em todo o mundo, busca-se o aumento da produção aliado à melhor qualidade dos grãos. Em virtude disto, maiores são também as buscas para minimizar fatores que dizimam a produção. Dentre estes fatores, as pragas e as doenças que atacam o milho são os maiores problemas enfrentados pelos produtores e, sob essa alegação, o cultivo de variedades transgênicas tem aumentado em todo o país.

Após a liberação comercial do milho transgênico pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), em 2007, as cultivares geneticamente modificadas deverão ocupar mais de 80 % da área esperada de cultivo da safra 2013-2014 (CÉLERES, 2013).

Organismos geneticamente modificados (OGMs) podem ser definidos como organismos, cujo material genético (DNA) foi alterado através de técnicas utilizadas pela engenharia genética (BRASIL, 2005). Estas técnicas possibilitam transformação genética através da inserção no genoma da planta de uma ou mais sequências de DNA, geralmente isoladas de espécies diferentes, de forma a garantir a expressão do(s) gene(s) de interesse. Tais métodos são empregados para a obtenção de plantas geneticamente modificadas (GM) desde a década de 1980 (PRETTY, 2001).

A introdução de sequências de DNA exógeno no genoma de uma planta (transgenia), para conferir propriedades desejadas, pode resultar em efeitos epistáticos não conhecidos, sendo esta uma das preocupações levantadas sobre a aplicação de técnicas de DNA recombinante para a produção de alimentos (CELLINI et al., 2004).

Tem sido muito estudado o efeito dos transgenes sobre organismos não alvo, como por exemplo, os microrganismos endofíticos. A avaliação de microrganismos endofíticos pode fornecer um indicativo dos impactos causados à agrobiodiversidade, visto sua importância para muitos mecanismos utilizados pelas plantas, principalmente de defesa e adaptação às condições adversas de ambiente. Esta habilidade é resultante de longo processo evolutivo de coevolução entre plantas e espécies microbianas, que ao longo do tempo selecionou tais mecanismos (FIGUEIREDO et al, 2008).

O acesso a essas comunidades pode ser feito de diversas maneiras, sendo a metodologia utilizada determinante na fração da comunidade a ser acessada e seu respectivo estudo. Tanto a utilização de novas metodologias de isolamento, como o emprego de técnicas moleculares, capazes de acessar os endófitos de maneira independente de cultivo, ampliam o espectro de exploração desse nicho biológico (FIGUEIREDO et al., 2008).

Os distúrbios que ocorrem nas interações entre plantas e endófitos podem ser oriundos do efeito natural, relacionados às condições de ambiente, tipo de solo e interação com outros microrganismos. Também podem ser oriundos de efeito artificial, associados a aplicação de herbicidas e pesticidas, contaminação com metais pesados, manejos culturais e, recentemente, o desenvolvimento de plantas GM e os produtos de seus transgenes (STUART, 2006).

Além de mudanças nas comunidades de endófitos, os transgenes e seu manejo também podem ser responsáveis por outros fatores. Um dos problemas referentes ao cultivo do milho é a elevada incidência de moléstias foliares. A requeima das folhas, causada por *Exserohilum turcicum* (Pass), é uma importante doença do milho (*Zea mays* L.), que ocorre em todo o mundo. Este patógeno pode causar extenso desfolhamento durante o período de enchimento de grãos, o que pode resultar em perdas que variam 27 a 90 % na produção de grãos (PERKINS & PEDERSEN, 1987). O controle da doença é feito através do plantio de cultivares com resistência genética, sendo a rotação de culturas também uma importante prática recomendada para o manejo.

Diversos fatores estão ligados com o aumento da incidência de patógenos na cultura do milho. Alguns destes são o surgimento de híbridos mais produtivos, com diferentes níveis de resistência às moléstias, o uso inadequado de produtos e os sistemas de cultivo, onde não se realiza rotações de culturas (WEBER, 2010).

Se considerarmos que a interação entre a planta e microrganismos epifíticos da rizosfera deve permanecer em equilíbrio, um aspecto importante na avaliação dos riscos das plantas geneticamente modificadas ao ambiente é o efeito sobre a comunidade microbiana associada às plantas. A expressão desses transgenes ou a demanda de um novo manejo cultural, em decorrência da transgenia, pode estimular ou inibir o desenvolvimento de diferentes espécies microbianas (DUNFIELD & GERMIDA, 2004), alterando, dessa forma, o equilíbrio microbiológico daquele ambiente.

Não existe ainda um consenso estabelecido a respeito dos efeitos dos transgenes sobre comunidades microbianas e severidade de *Exserohilum turcicum*. Alguns dos efeitos negativos dos transgenes incluem: (i) a invasão e dispersão das próprias plantas no ecossistema nativo causando efeitos indiretos; (ii) o fluxo do transgene através do pólen ou da transferência gênica para outras plantas em detrimento do possível efeito sobre a comunidade microbiana; (iii) o desenvolvimento de resistência em organismos alvo e efeitos em organismos não alvo e; (iv) os efeitos sobre a biodiversidade de microrganismos benéficos e antagonistas (DUNFIELD & GERMIDA, 2004).

Este trabalho foi realizado em conjunto com os projetos de pesquisa da doutoranda Kelly Justin da Silva e do mestrando André Felipe Lohn, ambos integrantes do Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade (NEABio) e orientados da Professora Juliana Bernardi Ogliari. O NEABio tem trabalhado em comunidades de agricultores do Oeste de Santa Catarina, sob coordenação da referida professora, há mais de uma década, sobretudo com os agricultores que conservam variedades crioulas de milho, pipoca, milho doce, arroz, feijão e mandioca.

Neste contexto, o presente trabalho visou avaliar as possíveis alterações na composição da comunidade de fungos endofíticos, assim como a severidade de *Exserohilum turcicum*, associada ao cultivo de milho isogênico convencional (não

geneticamente modificado), em comparação com dois isogênicos geneticamente modificados.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Importância econômica do milho**

O milho (*Zea mays* L.) é o principal cereal cultivado em todo o mundo, com produção em um quinto das terras agrícolas (AMOS & WALTERS, 2006). No Brasil, é amplamente utilizado na alimentação humana e animal, devido ao seu elevado valor nutritivo. Quanto ao consumo humano, esse cereal pode ser consumido *in natura*, como milho verde ou industrializado, na forma de amido, óleo, farinha, na composição de cereais matinais, pipoca, entre outros. Os animais também podem consumir o milho como grãos *in natura* ou como produtos industrializados, assim como consumir a própria planta, na forma de silagem (MATTOSO et al., 2006)

Na safra de 2012/2013, foi cultivado milho em uma área de 176,1 milhões de hectares em todo o mundo, com uma produção total de 862,7 milhões de toneladas e uma produtividade média de 4,9 t ha<sup>-1</sup> (USDA, 2013). Nesse cenário, o Brasil encontra-se em terceiro lugar em área plantada de 15,9 milhões de hectares, atrás de Estados Unidos e China, com uma produção total de 81,3 milhões de toneladas e produtividade média de 5,1 t ha<sup>-1</sup>. A produção, na safra 2012/2013, concentrou-se nas regiões Sul (45 %), Sudeste (30 %) e Centro-oeste (12 %). A participação dessas regiões, em área plantada e produção, vêm se alterando ao longo dos anos. Quanto à produtividade, o Distrito Federal e os Estados do Paraná e Goiás têm as melhores médias, enquanto Santa Catarina é o oitavo maior produtor de milho do país. Na safra 2012/13, a área plantada foi de 500,7 mil hectares, com uma produção de 3,4 mil toneladas e produtividade média de 6,9 t ha<sup>-1</sup>, bem acima da média nacional (CONAB, 2013).

### **2.2. Culturas geneticamente modificadas**

A área de cultivo de plantas geneticamente modificadas (GM) no mundo superou 170 milhões de hectares em 2010. Os principais produtores de lavouras GM

no mundo são: Estados Unidos, Brasil, Argentina, Canadá, Índia, China, Paraguai, África do Sul, Paquistão e Uruguai. A soja GM é a planta mais cultivada com 80,7 milhões de hectares, seguida pelo milho GM, com 55,2 milhões de hectares, algodão GM, com 24,3 milhões, e canola GM, com 9,2 milhões de hectares, correspondendo, respectivamente, a 47 %, 32 %, 14 % e 5 % da área global destinada ao cultivo GM (JAMES, 2012). Entretanto, há discussão na comunidade acadêmica de que estes dados podem estar superestimados pelas empresas, não existindo ainda dados científicos conclusivos sobre o assunto.

As primeiras culturas GM liberadas comercialmente foram desenvolvidas para conferir melhorias de ordem agrônômica, a fim de diminuir perdas nas lavouras e, conseqüentemente, aumento na produtividade. A soja e o algodão são as plantas GMs com maior aprovação comercial no mundo, sendo que, em 2012, 81 % do total de lavouras de soja e algodão plantadas foram GMs (JAMES, 2012). Como exemplo, temos o evento RR, que confere à soja tolerância ao herbicida glifosato e o algodão Bt, resistente a insetos.

Para garantir segurança e proteção aos consumidores, principalmente relacionado à saúde, culturas GMs estão sujeitas a diferentes legislações em todo o mundo, quando destinados ao consumo humano e animal. Entretanto, a preocupação com os riscos ambientais ainda é grande, sobretudo com relação ao fluxo gênico de plantas GM para plantas silvestres (THOMSON, 2003; GOGGI et al., 2006), já que espécies selvagens de milho, no México, foram contaminadas com pólen de milho GM cultivado nos EUA (QUIST & CHAPELA, 2001). Outro fator prejudicial é a modificação genética que confere resistência a insetos, assim como a morte de outros insetos, além do inseto alvo, o que pode causar um desequilíbrio ecológico (THOMSON, 2003).

No Brasil, o cultivo e a liberação comercial de cultivares GM depende da aprovação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e do Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS). As cultivares de alimentos GMs aprovadas para comércio e plantio no Brasil incluem 18 produtos comerciais de milho GMs, cinco de soja GMs, oito de algodão GM, sendo que todas as três culturas GM possuem resistência a inseto e/ou tolerância a herbicida, e uma de

feijão GM resistente ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (MAPA, 2012). A maioria dessas plantas GMs já é comercializada em outros países da América do Sul, inclusive na Argentina, Colômbia e Uruguai.

No ano de 1998, o Brasil teve a primeira cultura GM liberada comercialmente pela CTNBio, a soja *Roundup Ready* (RR). O evento RR foi desenvolvido pela empresa MONSANTO S.A. e apresenta o gene cp4-epsps de *Agrobacterium tumefaciens*, que codifica a enzima 3-enolpiruvil-chiquimato-5-fosfatossintase (EPSPS), responsável pela tolerância ao glifosato (BORÉM, 2005).

A produção de organismos geneticamente modificados (OGM) baseia-se na transformação genética através da inserção no genoma da planta receptora de uma ou mais sequências de DNA, de uma maneira que não ocorreria naturalmente, geralmente isoladas de espécies diferentes, de forma a garantir a expressão do(s) gene(s) de interesse. As características genéticas modificadas em plantas são direcionadas para um maior nível de proteção das plantações, por meio de introdução de códigos genéticos para a resistência a doenças, a insetos ou vírus, tolerância às intempéries climáticas, aumento da qualidade e do valor nutricional de culturas alimentares, tolerância a herbicidas, entre outros (ANKLAM et al., 2002; CELLINI et al., 2004; MAPA, 2013).

Para a construção de um organismo GM, com o intuito de expressar determinada proteína, normalmente, são utilizados três elementos básicos no cassete de expressão: (i) o promotor, que controla a expressão do gene recombinante no organismo; (ii) a região codificadora, que codifica a proteína recombinante de interesse e; (iii) a região terminadora, que determina o final do processo de transcrição do gene recombinante. Além disso, pode ser adicionado um gene marcador, que confere resistência a antibióticos, tal como o gene que codifica a enzima  $\beta$ -lactamase, que confere a resistência ao antibiótico penicilina e serve para selecionar as células que, de fato, foram transformadas (MARCELINO et al., 2003). O elemento promotor mais utilizado é o PCaMV 35S, derivado do vírus fitopatogênico do mosaico da couve-flor. Por outro lado, o elemento terminador mais utilizado é o TNOS, derivado do gene da nopalina sintase do plasmídeo Ti da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (WOLF et al, 2000).

Quanto à biossegurança e monitoramento de organismos GMs, em escala global, deseja-se alcançar uma uniformização dos procedimentos de análise de riscos para liberação de culturas GMs, bem como a harmonização na avaliação de riscos, nos diferentes países. Recentemente, grupos de pesquisa relacionados ao tema têm debatido intensamente sobre a uniformização e harmonização para análise e monitoramento de OGMs (BALSAMO, 2011).

### **2.3. Milho geneticamente modificado**

O milho é segunda planta GM mais cultivada no mundo, com 28 eventos aprovados e 129 combinações, para diferentes objetivos, como tolerância a herbicida, resistência a insetos, sistema de controle de polinização e estresse abiótico. Desta forma, diversas linhagens de milho transgênico apresentam diferentes cassetes de expressão com diferentes sequências de DNA recombinante introduzidas. As modificações genéticas do milho que conferem resistência a pragas e tolerância ao herbicida glifosato são as mais comuns, e esses tipos de modificações geralmente resultam na expressão dos genes: cry1Ab e bar/pat, respectivamente. Além desses, também são encontrados eventos para o controle da polinização (confere esterilidade masculina), melhoria da qualidade dos grãos e tolerância ao estresse abiótico (ISAAA, 2013). No Brasil, existem 18 produtos comerciais GMs autorizados para o cultivo do milho, com eventos para garantir tolerância ao herbicida glifosato e resistência a insetos, podendo o produto ter as duas características (MAPA, 2012).

A proteína inseticida originada do gene cry1Ab, é codificada por um gene isolado da bactéria *Bacillus thuringiensis* (presente naturalmente no solo), e promove resistência a insetos da ordem Lepidóptera. Dentre os insetos dessa ordem, encontra-se a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), principal parasita do milho e responsável pela redução da produção em até 36 % (CTNBio, 2002; VIANA, 2006).

Várias subespécies de *B. thuringiensis* (Bt) são conhecidas e efetivas contra diferentes tipos de insetos, porque apresentam diferentes genes cry e produzem

toxinas específicas. Os principais genes utilizados em milho são *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry2Ab2*, que codificam toxinas efetivas aos lepidópteros (CTNBio, 2010). As linhagens de milho GM que contém os eventos MON810, Bt11, MON89034, TC1507 e os cruzamentos que resultam destas, possuem genes *cry* inseridos (MAPA, 2012).

O evento TC1507 (Herculex®) foi utilizado como modelo de avaliação do presente trabalho. A tecnologia Herculex® garante tolerância ao herbicida glufosinato de amônio, por meio de uma enzima (fosfinotricina-N-acetil transferase, PAT), obtida da bactéria *Streptomyces viridochromogenes*. Além disso, também garante resistência a insetos da ordem Lepidoptera, por meio da introdução do gene *cry1F*, isolado da bactéria presente no solo *Bacillus thuringiensis* (Bt) var. *aizawai* (Figura 1). A tecnologia foi desenvolvida pela Dow AgroSciences e Pioneer Hi-Bred (CIB, 2013).

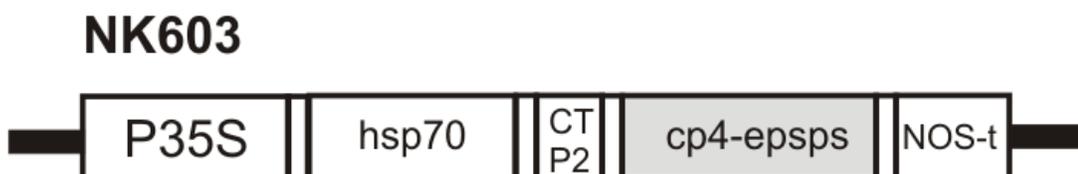
**Figura 1.** Esquema do inserto para o milho transgênico Herculex I (TC1507). Gene inserido: *cry1F* e *pat*, promotor *ubiZM* (oriundo do milho) e P35S, terminador: T35S. Adaptado de TAKABATAKE et al., 2010.



Além de TC1507, também foi utilizado neste trabalho uma cultivar transgênica que possui o evento TC1507 e o evento NK603 combinados. Este último, também desenvolvido pela Dow AgroSciences, garante tolerância ao herbicida glifosato (Figura 2). O evento NK603 foi obtido por meio da introdução de duas cópias do gene da enzima 3-enolpiruvil-shiquimato-5-fosfato sintase (EPSPS), proveniente da cepa CP4 de *A. tumefaciens* (CIB, 2013). A proteína CP4-EPSPS, expressa nas plantas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato, é funcionalmente idêntica à proteína EPSPS endógena de plantas. Em plantas convencionais, o herbicida

glifosato se liga à enzima EPSPS e bloqueia a biossíntese do 5-hidroxilshiquimato-3-fosfato, impedindo a formação de aminoácidos aromáticos e metabólitos secundários. Nas plantas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato, como o milho NK603, os aminoácidos aromáticos e outros metabólitos necessários para o desenvolvimento das plantas continuam sendo produzidos pela atividade da proteína CP4-EPSPS (CTNBio, 2009).

**Figura 2.** Esquema do inserto para o milho transgênico, evento NK603 Roundap Ready 2. Promotor: P35S, terminador: NOS. Adaptado de TAKABATAKE, et al., 2010.



As cultivares GM BG7060H (Herculex®) e BG7060HR (Herculex® + Roundup Ready®) possuem um e dois dos eventos citados acima, respectivamente. Assim, BG7060H possui o evento TC1507 e BG7060HR, os eventos TC1507 e NK603. Esta última cultivar foi obtida por meio do cruzamento convencional entre as cultivares genitoras TC1507 e NK603.

## 2.4. Aspectos gerais de microrganismos endofíticos

### 2.4.1. O que são microrganismos endofíticos?

Alguns autores definem microrganismos endofíticos como aqueles que habitam o interior das plantas, sem causar danos ao seu hospedeiro (PETRINI, 1991), ou como todos os microrganismos do interior das plantas saudáveis, após a desinfecção externa, eliminando assim os microrganismos epifíticos (HALMMAN et al., 1997). Uma definição mais abrangente define endófitos como sendo todo microrganismo, cultivado ou não, que coloniza o interior da planta hospedeira e que não causa danos aparentes e nem forma estruturas externas visíveis (AZEVEDO &

ARAÚJO, 2007). Recentemente, a definição de endofíticos foi ampliada, considerando como endófitos todos os microrganismos cultiváveis ou não e que não causam danos aparentes, sendo divididos em dois tipos: (i) os que não produzem estruturas externas à planta e, (ii) os que produzem estruturas externas à planta (MENDES & AZEVEDO, 2007).

Endófitos são encontrados em órgãos e tecidos vegetais como folhas, ramos e raízes (AZEVEDO et al., 2000; AZEVEDO & ARAÚJO, 2007). Estes microrganismos colonizam um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógeno e, desta forma, podem ser importantes candidatos para o controle destes. Muitos estudos observaram o potencial dos endófitos para o controle biológico de doenças e pragas, e na promoção de crescimento da planta hospedeira. Dessa forma, o amplo conhecimento da comunidade microbiana e das interações que ocorrem na planta pode permitir a utilização destes microrganismos na agricultura, promovendo o crescimento vegetal e/ou controlando patógenos de interesse e, assim, reduzindo a utilização de agroquímicos e custos de produção (ARAÚJO et al., 2010).

#### **2.4.2. Ocorrência e interação dos endófitos com plantas**

Microrganismos endofíticos já foram isolados de todas as espécies de plantas até agora analisadas. Tem sido sugerido que estes microrganismos coevoluíram com os seus hospedeiros, devido a íntima associação entre os endófitos e espécies vegetais (MISAGHI & DONDELINGER, 1990), apresentando uma íntima interação mutualística, onde os endófitos recebem nutrientes e proteção da planta hospedeira e a planta também apresenta vantagens decorrentes dessa interação (ARAÚJO et al., 2010). Dentre elas destacam-se uma maior resistência em ambientes com intenso estresse causado por fatores bióticos ou abióticos, promoção do crescimento vegetal, estímulo e indução do processo de germinação de sementes e fixação de N<sub>2</sub> (HALLMANN et al., 1997; SAIKKONEN et al., 1998; SELOSSE et al., 2004; SCHULZ & BOYLE, 2005).

A colonização dos tecidos vegetais por microrganismos endofíticos ocorre pela transferência dos microrganismos já presentes nas plantas para as gerações seguintes através dos frutos e sementes, bem como pela entrada de microrganismos do solo, logo após a germinação das sementes. Plantas adultas podem ser colonizadas pela entrada dos microrganismos pelos estômatos ou por fissuras nas folhas, caules e raízes (WAGNER & LEWIS, 2000; STROBEL, 2003; SAIKKONEN et al., 2004; SCHULZ & BOYLE, 2005).

Com o objetivo de se entender a íntima relação entre os microrganismos e as plantas hospedeiras, inúmeros trabalhos foram desenvolvidos. Entretanto, ainda pouco se sabe sobre os aspectos genéticos, ecológicos e fisiológicos da interação planta/endófitos (LACAVA et al, 2008).

#### **2.4.3. Diversidade de fungos endofíticos**

A diversidade de fungos compreende aproximadamente 80.000 espécies descritas. No entanto, a verdadeira escala de diversidade de fungos ainda é debatida. Inicialmente, considera-se que os fungos ocorrem em uma proporção de seis espécies fúngicas para cada espécie vegetal, compreendendo aproximadamente 1.500.000 espécies (ARAÚJO et al., 2010). Esses números refletem o grande potencial de exploração da diversidade fúngica conhecida e desconhecida. A existência de fungos endofíticos já foi comprovada em todas as espécies vegetais estudadas até o momento (REDLIN & CARRIS, 1996).

As estimativas dos números de espécies de fungos, em sua maioria, são baseadas em regiões de clima temperado e na colonização de espécies mais frequentes e normalmente descritas, tal como aquelas relacionadas a doenças em plantas e animais, bem como aquelas que produzem estruturas sexuais bem aparentes. Considerando-se a elevada diversidade associada aos climas tropicais, a proporção sugerida para o número total de espécies de fungos é de 33 espécies fúngicas para cada espécie vegetal, compreendendo aproximadamente 8.250.000 espécies (FRÖHLICH & HYDE, 1999; GAMBOA et al., 2002).

Em geral os fungos endofíticos vêm sendo encontrados em associações com algas, briófitas, pteridófitas, coníferas, gramíneas, palmeiras, arbustos e árvores, em geral (ARAÚJO et al., 2010). Dentre as espécies comumente encontradas como endofíticas, destacam-se principalmente os membros do Filo ascomycota, que produzem ascostromas (Loculoascomicetos) e peritécios (Pirenomicetos). Este é o maior filo dos fungos, com 50 % de todas as espécies conhecidas (ARAÚJO, 2010).

Para a cultura do milho, os fungos endofíticos mais frequentemente isolados são *Aspergillus sp.*, *Curvularia sp.*, *Dreschlera sp.*, *Fusarium sp.*, *Glomerella cingulada*, *Humicola sp.*, *Penicillium sp.*, *Periconia sp.*, *Phomopsis sp.*, *Rhizopus sp.*, *Syncephalastrum sp.*, *Trichoderma sp.*, entre outros (SILVA et al., 1992).

#### 2.4.4. PCR-DGGE

A técnica de DGGE é um método de estudo utilizado em levantamentos e comparações na composição de comunidades microbianas. Esta técnica consiste na separação de *amplicons* de PCR de tamanhos similares, com base na diferença de composição de sequências, em um gel com gradiente de desnaturação. Apresenta alta resolução, na qual um grande número de amostras pode ser rapidamente comparado revelando a dinâmica de comunidades endofíticas (ARAÚJO et al., 2010).

A separação dos *amplicons* por diferença na composição ocorre com base nas ligações entre as fitas de DNA. A ligação entre os nucleotídeos adenina (A) e timina (T) é feita por duas pontes de hidrogênio, enquanto a ligação entre citosina (C) e guanina (G) é feita por três pontes de hidrogênio. *Amplicons* com maior porcentagem de pareamentos GC são mais resistentes à desnaturação. Dessa forma, o perfil das bandas ocorre separando *amplicons* com menores porcentagens de GC, que se estabilizam na parte de cima do gel; os *amplicons* com maiores porcentagens de GC, por sua vez, migram por mais tempo na forma de dupla fita, até a parte de baixo do gel. Esta diferença é gerada pelo gradiente desnaturante, o qual é formado pelo aumento na concentração dos agentes desnaturantes, ureia e formamida. Com a eletroforese, os *amplicons* são expostos à concentração

crescente destes agentes o que faz com que sejam separados de acordo com as respectivas porcentagens de GC (ARAÚJO et al., 2010).

Em alguns estudos, a técnica de DGGE é escolhida como método *fingerprinting*, pois fornece indicação rápida visual de mudanças na estrutura da comunidade microbiana. Além disso, as bandas individuais podem ser retiradas e sequenciadas na tentativa de indicar a sua origem (ANDERSON, 2003).

A DGGE tem recebido especial atenção por ser utilizada para análises de comunidades fúngicas no solo e ambientes complexos e para estudar a comunidade microbiana associada às plantas transgênicas (ARAÚJO et al, 2010).

## **2.5. Importância da doença causada por *Exserohilum turcicum***

As condições de ambiente onde o milho é cultivado são variáveis e, desta forma, a cultura está sujeita à ocorrência de diversas doenças, as quais podem ser limitantes à qualidade, palatabilidade, valor nutritivo dos grãos e da forragem, e à quantidade da produção. Dentre as doenças que ocorrem na cultura do milho, merecem destaque as doenças foliares, as podridões do colmo e das raízes, além das doenças causadas por vírus, fitoplasmas e nematóides (SASSE, 2008).

Uma importante doença que ataca a cultura do milho é a queima de Turcicum ou requeima das folhas, causada pelo fungo *Exserohilum turcicum* (Pass) K.J. Leonard & Suggs. Suggs; syn. = *Helminthosporium turcicum* Pass, a qual ocorre em quase todas as áreas de produção do país (KIMATI, 1995; OGLIARI, 1999; OGLIARI et al., 2005; 2007).

A queima de Turcicum é uma doença bastante comum no milho e de elevado impacto econômico. O prejuízo causado pela doença depende da severidade e do estágio de desenvolvimento da cultura na época da infecção, ocorrendo principalmente em condições favoráveis ao fungo, que é proporcionada por elevada umidade e temperatura entre 18 e 27°C. Se a cultivar utilizada não possuir nível de resistência satisfatório, o dano econômico pode ser ainda mais significativo. Incidência severa antes do embonecamento é altamente danosa (KIMATI, 1995).

No Brasil, o problema tem sido maior em plantios de safrinha, onde as perdas podem atingir 50 % em ataques antes do período de floração (CASELA et al., 2006). Epidemias de queima de *Turcicum* ocorrem com maior frequência na região Sul do país e nas chapadas da região Centro-oeste, causando altas quedas na produtividade do milho (PEREIRA, 1995; OGLIARI, 1999; OGLIARI et al., 2005).

## 2.6. Taxonomia, Sintomas, Etiologia e Controle de *E. turcicum*

O fungo agente causal da requeima foliar pertence à Classe dos Deuteromicetos, ordem Moniliales, família Dematiaceae e ao gênero e espécie *Exserohilum turcicum*, (sinonímia *Helminthosporium turcicum*), tendo como forma sexuada *Setosphaeria turcica* (REIS et al., 2004).

As lesões são necróticas, elípticas e variam de 2,5 a 15 cm de comprimento. O tecido necrosado das lesões varia de verde-cinza a marrom e, no interior das lesões, observa-se intensa esporulação do patógeno (Figura 3). As lesões começam a aparecer nas folhas inferiores da planta (KIMATI et al., 1995).

**Figura 3.** Sintoma de helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*) em milho.



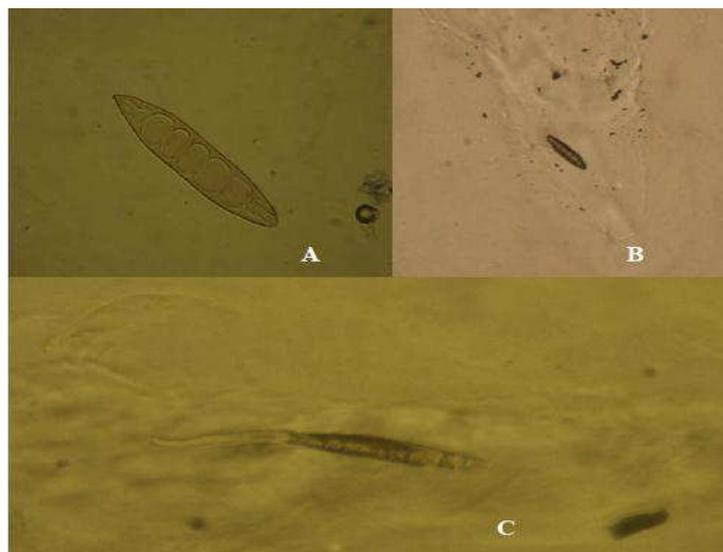
Fonte: Acervo pessoal.

Os conídios de *E. turcicum* têm cor verde-oliva ou marrom escuro, são fusiformes, ligeiramente curvos, com 3 a 8 septos, dimensões de 20 x 105 µm, com

hilo saliente e germinação através de tubos de germinação polares (Figura 4). Os conidióforos são oliváceos, com 2 a 4 septos, medindo de 7-9 x 150-250  $\mu\text{m}$ .

A fase sexual ocorre raramente na natureza. Em laboratório, porém, produz peritécio globoso, de coloração escura. Os ascos são cilíndricos, contendo de 1 a 8 ascósporos, usualmente de 2 a 4, que são hialinos, retos ou ligeiramente curvos, com 3 septos e dimensões de 13-17 x 42-78  $\mu\text{m}$ . O patógeno apresenta boa capacidade de sobrevivência, na forma de micélio e conídios, em restos de cultura. Clamidósporos podem ser formados. Os conídios são disseminados a longas distancias através do vento. Temperaturas moderadas (18-27  $^{\circ}\text{C}$ ) são favoráveis à doença, bem como a ocorrência de longos períodos de molhamento foliar ou a presença de orvalho (COSTA et al., 2009). Infecções secundárias resultam da disseminação de conídios produzidos abundantemente em lesões foliares. As condições ambientais favoráveis à ocorrência da doença são encontradas nos primeiros plantios, em agosto e setembro, e nos plantios após dezembro, considerados como plantios da safrinha. Nas regiões altas, as chamadas chapadas, estas condições podem ser observadas durante o ano todo (KIMATI, 1995).

**Figura 4.** Observações de *Exserohilum turcicum* em meio de cultura BDA, mediante microscopia óptica. A) Seleção do conídio sob lupa. B) Deposição do conídio sobre o meio de cultura. C) Observação da formação do tubo germinativo. Fonte: Sasse (2008).



O patógeno tem como hospedeiros o sorgo, o capim sudão, o sorgo de halepo e o teosinto. No entanto, isolados provenientes do sorgo não são capazes de infectar plantas de milho (COSTA et al., 2009).

Os prejuízos causados pela queima de *Turcicum* nos cultivos de milho têm feito com que se busquem alternativas para diminuir ou mesmo isentar as lavouras atacadas por este patógeno. Uma maneira de reduzir a probabilidade dos patógenos sofrerem mutações vantajosas ou conseguirem por recombinação reunir genes que possibilitem uma infecção vitoriosa sobre as plantas é a utilização de genes de resistência parcial, ou então, através do piramidamento de genes de resistência a raças-específicas (WAKELYNS, 1997). Sendo assim, a utilização de germoplasma resistente é considerada uma estratégia de controle satisfatória da queima do milho (OGLIARI, 1999), pois além de evitar as perdas causadas pela doença, não aumenta os custos de produção, garantindo maior retorno aos produtores e menor impacto ambiental (PRIESTLEY & BAYLES, 1988).

Além da utilização de cultivares resistentes, deve-se fazer a escolha da melhor época, adubação equilibrada, rotação de culturas e quando necessário, fazer aplicação de fungicidas (KIMATI, 1995; COSTA et al., 2009).

Os efeitos benéficos dos endófitos do milho sobre a expressão da resistência a queima de *Turcicum* ainda não foram relatadas na literatura.

## **2.7. Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade - NEABio**

O NEABio é composto por um grupo de professores universitários, pesquisadores e estudantes, associado aos Programas de pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais e em Agroecossistemas da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis. Tem como proposta de trabalho desenvolver e incentivar ações de pesquisa, de ensino e de extensão junto a comunidades de agricultores familiares, na linha temática da conservação, do manejo e do uso da agrobiodiversidade. A partir de ações participativas, o grupo propõe promover a soberania alimentar e o desenvolvimento socioeconômico de comunidades locais

com base em quatro princípios: (i) valorização do conhecimento tradicional e científico, dentro de um contexto integrado de participação; (ii) utilização de estratégias de produção baseadas na sustentabilidade dos sistemas agrícolas de produção familiar; (iii) utilização de métodos participativos e integrados de pesquisa, de ensino e de extensão; (iv) promoção do manejo e uso do germoplasma local como estratégia de conservação da agrobiodiversidade.

Com esta finalidade, desde 2002, o NEABio vem trabalhando em parceria com comunidades de pequenos agricultores do Oeste de Santa Catarina o que tem permitido o desenvolvimento de ações de pesquisa, ensino e extensão em favor da conservação, manejo e uso de variedades locais de várias espécies, em sistemas de produção de base agroecológicos.

Esse grupo mantém parceria com associações de agricultores (ASSO, ASCOOPER, Associação Central das Microbacias Hidrográficas de Guaraciaba, UNITAGRI) e sindicatos locais (SINTRAF de Anchieta), ONGS (Instituto Porerekan), prefeituras, secretarias da educação e movimentos sociais (Movimento dos Pequenos Agricultores e Movimento de Mulheres Camponesas), além das interações estabelecidas com pesquisadores e extensionistas da EPAGRI e professores de outras universidades parceiras do NEABio da UFSC (OGLIARI & ALVES, 2007).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar a estrutura da comunidade de fungos endofíticos e a resistência genética a *Exserohilum turcicum* de um híbrido não geneticamente modificado (NGM), em comparação a suas duas versões isogênicas geneticamente modificadas, portadoras do evento TC1507 isolado e dos eventos TC1507+NK603 combinados.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Comparar a comunidade de microrganismos endofíticos pela técnica de PCR-DGGE nos diferentes híbridos isogênicos (convencional e transgênicos);

- Verificar a resistência a requeima foliar dos híbridos isogênicos, com auxílio de escala diagramática para avaliação da severidade de *E. turcicum* no milho.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

##### **4.1. Área de cultivo e material vegetal**

O estudo foi realizado com as cultivares isogênicas Biogene BG7060 da Pioneer, recomendadas para a produção de grãos e silagem na região Sul do Brasil. A versão convencional BG7060 e os dois isogênicos geneticamente modificados (BG7060H e BG7060HR) são híbridos triplos de ciclo precoce, doados pela Cooperativa Oestebio de São Miguel do Oeste. O transgênico BG7060H contém a tecnologia Herculex I (evento TC1507), enquanto o transgênico BG7060 HR contém além da tecnologia Herculex I também a Roundup Ready 2 (eventos TC1507 e NK603).

As plantas foram cultivadas em um solo constituído com predominância de areia (Anexo 1), classificado como Neossolo Quartzarênico Hidromórfico Típico de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos, na Fazenda Experimental da Ressacada da UFSC, Florianópolis-SC, Brasil, em 23 de março de 2013. O experimento foi conduzido em parcelas contendo 4 fileiras de 5 m lineares de comprimento, espaçadas 1 m entre si. O estande final foi de 6 plantas por metro linear, estabelecendo, assim, uma densidade de 60.000 plantas ha<sup>-1</sup>. O delineamento experimental foi de blocos completos casualizados, com três repetições.

Os tratos culturais, adubação e capina manual, foram homogêneos para toda a área. Não foi aplicado qualquer tipo de herbicida ou inseticida na área. Foi feita análise química de solo e a adubação foi corrigida com nitrogênio, fósforo e potássio de acordo com a recomendação da COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC (2004) para a cultura do milho.

As temperaturas médias registradas das mínimas e das máximas durante os meses de implantação e avaliação apresentaram variações entre 10 °C e 26 °C,

sendo que as médias de cada mês podem ser observadas no Anexo 2 (ACCUWEATHER, 2013).

## **4.2. Caracterização da comunidade de endofíticos**

Para a caracterização da comunidade de microrganismos endofíticos, foram coletadas amostras de folhas jovens (região mediana transversal, incluindo nervura), no estágio fenológico vegetativo (V5) e início do estágio reprodutivo, aos 74 dias, após a semeadura. Foram coletadas folhas de cada parcela, sendo uma folha por planta de dez plantas da segunda fileira. Estas foram acondicionadas a 4 °C, levadas ao laboratório e armazenadas a -80 °C.

### **4.2.1. Extração de DNA**

A extração de DNA de microrganismos endofíticos requer alguns cuidados antes da maceração das amostras, pois existe na superfície das folhas uma ampla comunidade de microrganismos, chamados epifíticos, que podem afetar as análises subsequentes. Para tanto, foi realizado a esterilização superficial da folha, mediante imersão por 2 min em álcool 70 %, 5 min em hipoclorito de sódio (2,5 % de cloro ativo) (v/v), novamente por 30 s em álcool 70 %, e por fim, lavadas quatro vezes em água destilada esterilizada. A última água de lavagem dos tecidos foi usada nas reações de amplificação por PCR para a confirmação de que não restaram epifíticos nas folhas. Após a desinfecção superficial, as amostras de tecido foliar foram maceradas com auxílio de almofariz e pilão de porcelana, em nitrogênio líquido, até obter-se um pó bem fino. Amostras de 50 a 100 mg foram acondicionadas em tubos com capacidade de 1,5 mL, dentro das quais foram adicionados 650 µL da solução tampão de extração CTAB 2 % (2 % de brometo de cetiltrimetilamônio - CTAB; 1,4 M de NaCl; 100 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM de EDTA, pH 8,0; 0,2 % de betamercaptoetanol). Os tubos foram agitados manualmente e incubados em banho-maria a 65 °C por 50 min, agitando suavemente a cada 10 min. Foram adicionados 650 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v:v) e agitados manualmente até formar uma emulsão. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a

5.000 *g* para separação do sobrenadante. O sobrenadante foi transferido para um microtubo novo, onde foram adicionados 2,5 volumes de etanol gelado para precipitação do DNA. Os tubos foram centrifugados novamente por 20 min a 10.000 *g*. O sobrenadante foi descartado e o pélete lavado duas vezes com etanol 70 % por 5 min, e uma vez com etanol 100 % por 3 min. Os tubos com DNA foram invertidos em papel toalha por 5 min (para evaporar o etanol), ressolubilizados em 50 µL de água ultrapura (milli-Q autoclavada) e armazenados a -20 °C (DOYLE & DOYLE, 1990).

A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose a 1 % (Anexo 3) em eletroforese horizontal e corado com Sybr green (Life Technologies, São Paulo, Brasil), utilizando-se o tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), por uma hora a 60 V. A concentração das amostras foi determinada em espectrofotômetro (Nanovue Plus, GE, Wisconsin, USA).

#### 4.4.2. PCR-DGGE

A comunidade de fungos foi avaliada a partir da amplificação parcial da SSU (18S rRNA) com os iniciadores FR1GC (CCC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GCC G AIC CAT TCA ATC GGT AIT) e FF390f (CGA TAA CGA ACG AGA CCT) (VAINIO & HANTULA, 2000). A amplificação foi feita em solução tampão para DNA polimerase Taq, contendo 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U DNA polimerase Taq (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 15 mM dos primers e 100 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação da PCR foram 8 min a 95 °C; 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 45 s a 50 °C e 2 min a 72 °C e extensão final por 10 min a 72 °C.

Para confirmar a amplificação, os produtos da PCR foram aplicados em gel com 1% de agarose corado com Sybr green (Life Technologies, São Paulo, Brasil), e submetidos a eletroforese horizontal com tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), por uma hora a 60 V (Anexo 4).

Quantidades iguais de *amplicons* foram analisadas por meio de eletroforese em gel com 8 % (m/v) de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1, m:m), contendo um

gradiente de 25 a 65 % de formamida e uréia (ØVREÅS et al., 1997). A eletroforese foi realizada a 200 V e 60 °C constantes, por 4h e 30 min, utilizando-se um sistema “DCode” (BioRad, Hercules, CA, USA), e tampão TAE 1X. O DNA foi corado com Sybr Safe (Life Technologies, São Paulo, Brasil) e a aquisição das imagens dos géis foi feita em foto documentador ChemiDoc™ MP Bio-Rad (Bio-Rad™, Hercules, CA, USA) (Anexo 5). Os perfis de *amplicons* foram analisados com o programa Gel Compar II versão 6.5 (BioSystematica, Wales, UK).

#### 4.2.3. Análises estatísticas

A estrutura das comunidades fúngicas foi analisada por meio do software GelCompar II versão 6.5 (BioSystematica, Wales, UK), a partir da análise de agrupamento hierárquico, utilizando coeficiente de similaridade de *Jaccard*, o qual é calculado com base na seguinte fórmula:  $S_j = a/(a + b + c)$ , supondo a comparação entre duas amostras A e B, onde ‘a’ corresponde a presença da banda em A e B; ‘b’ corresponde a presença em B e ausência da banda em A e; ‘c’ corresponde a presença em A e ausência da banda em B. O modelo de agrupamento para a construção do dendograma foi efetuado pelo método UPGMA (unweighted pair group average), que agrupa pela distância média entre o objeto que se quer incluir num grupo e cada objeto já pertencente a este grupo.

#### 4.3. Avaliação da severidade de *Exserohilum turcicum*

Foram realizadas cinco avaliações para quantificar a severidade da queima de *Turcicum*, aos 105, 111, 123 dias, 137 e 146 dias, após a semeadura, em condições de infecção natural. Todas as plantas foram marcadas com barbante para que as mesmas fossem avaliadas nos consequentes dias.

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 *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard, exhibe percentuais de lesão de 0, 1, 3, 6,

10, 25, 50, 75 e 100\_% (Anexo 6). A partir da análise de cada folha da planta contendo lesões, foi estimada a severidade média da doença para a planta inteira.

A classificação das cultivares isogênicas de milho quanto à resistência a *Exserohilum turcicum*, foi feita segundo a escala diagramática elaborada por AGROCERES (Anexo 7), baseada na severidade da doença na planta inteira, cerca de 30 dias após a floração, bem como na classificação de severidade adotada por AGROCERES (1996), conforme destacado no Quadro 1.

**Quadro 1** – Classificação das reações de variedades de milho, com base na percentagem de tecido lesionado na planta inteira (AGROCERES, 1996).

Severidade (%) planta	Classificação (*)
0	AR
1-7	R
8-14	MR
15-24	MS
25-34	MS/S
35-50	S
>50	AS

(\*) Onde: AR = alta resistência; R = resistente; MR = mediana resistência; RD = resistência mediana; MS = mediana suscetibilidade; S = suscetível; AS = alta suscetibilidade.

A porcentagem de folhas infectadas por planta também foi avaliada, adaptando-se o mesmo modelo de amostragem usado para a severidade da doença. Para cada planta foi avaliado o número total de folhas e o número total de folhas infectadas por *E. turcicum*. Com estes dados foi calculada a porcentagem de folhas infectadas por planta por patógeno.

A evolução da doença foi estimada através da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), com base nos dados de severidade, obtidos em cada avaliação, segundo aplicação por 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  $i+1$

$n$  = número total de observações

#### 4.3.1. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada segundo o software STATISTICA 6.0 for Windows para a severidade média em folhas de milho aos 105, 111, 123, 137 e 146 dias após a implantação do experimento e também para AACPD. As variáveis que apresentaram significância pelo teste F ( $p < 0,06$ ) foram submetidas ao teste de separação de médias de SNK para a mesma magnitude de significância.

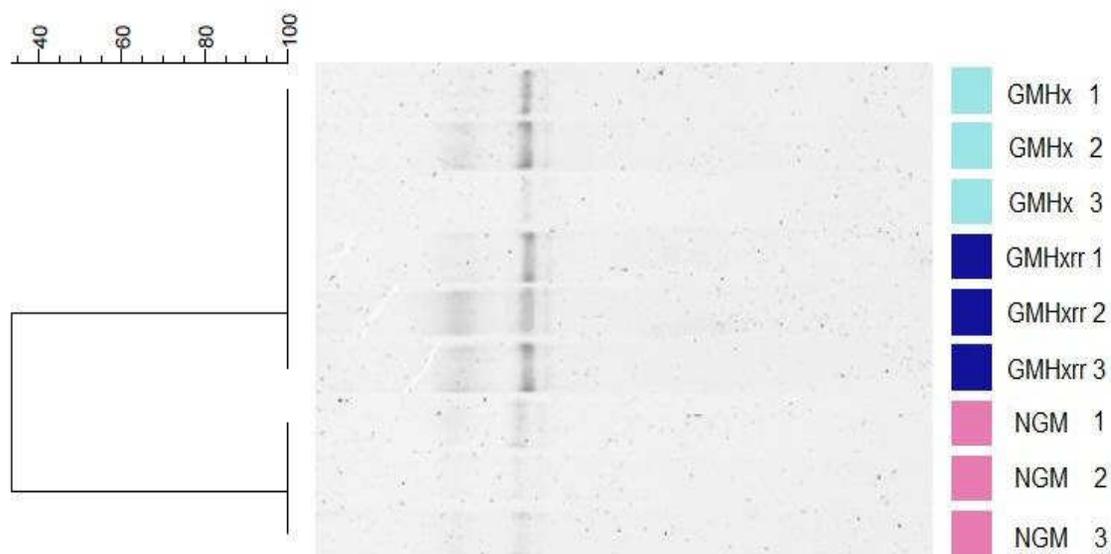
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Fungos endofíticos

As comunidades de fungos endofíticos presentes nas cultivares de milho transgênico GMHx e GMHxr mostraram elevados níveis de similaridade entre si e

foram diferentes da cultivar NGM (Figura 5). Além disso, pode-se observar que a inserção do evento NK603, não afeta a estrutura da comunidade de fungos endofíticos, já que as cultivares transgênicas apresentaram as mesmas bandas no DGGE.

**Figura 5.** Estrutura de comunidade de fungos endofíticos. As cores representam as diferentes cultivares com três repetições. Cluster gerado no software GelCompar II, índice de similaridade: *Jaccard*, agrupamento por UPGMA.



Gomes et al (2003) avaliou a comunidade de fungos da rizosfera de milho, por meio da técnica de PCR-DGGE. Estes autores observaram que o perfil das bandas apresentou diferenças entre os estágios analisados, mas não entre cultivares estudadas.

Em outro trabalho, realizado por Stuart (2006), foi avaliado o efeito da cana-de-açúcar transgênica, em relação a sua cultivar isogênica convencional sobre a comunidade endofítica de fungos da rizosfera. O autor observou variações entre a cultivar transgênica e a sua isogênica convencional. Nesse mesmo estudo, também foi observado que a aplicação do herbicida, para o qual o transgênico é resistente, induziu mudanças mais rápidas e transientes na comunidade de fungos; nas plantas

geneticamente modificadas, as mudanças foram mais lentas do que na sua versão isogênica convencional (STUART, 2006). Buscando avaliar a comunidade de fungos endofíticos e da rizosfera da cultura da cana-de-açúcar transgênica com sua cultivar isogênica convencional, por meio da técnica de PCR-DGGE, Mendes (2008) não encontrou mudanças entre as cultivares estudadas. O autor observou que o agrupamento hierárquico das comunidades fúngicas ocorreu associado às épocas de coleta.

Na avaliação da diversidade de fungos endofíticos entre o algodão transgênico e a sua isolinha convencional, foi observado que, embora a modificação de Bt não tenha apresentado nenhum efeito sobre os endófitos, os diferentes tecidos de algodão e os estágios de desenvolvimento da planta influenciaram significativamente na diversidade e composição da comunidade fúngica (VIEIRA et al., 2011).

Técnicas independentes de cultivo, como a técnica de PCR-DGGE, são importantes, pois através destas também é possível o acesso à fungos que não são cultivados até o momento. Em diversos trabalhos, a PCR-DGGE mostrou-se eficiente para analisar a comunidade de microrganismos.

Em próximos trabalhos, seria interessante também avaliar os efeitos da aplicação do herbicida sobre as comunidades de fungos endofíticos, já que os trabalhos citados acima encontraram mudanças com este tratamento. Além disso, também seria interessante avaliar se ocorrem mudanças nos microrganismos do solo entre as cultivares, comparar com as mudanças dos microrganismos das plantas e observar se estão correlacionados. O estudo em relação às diferenças observadas entre as épocas de cultivo, na comunidade de microrganismos endofíticos, faz parte dos trabalhos futuros conduzidos pelo NEABio.

## **5.2. Severidade da doença causada por *Exserohilum turcicum***

Os tratamentos apresentaram diferenças significativas pelo teste de Fisher ( $p < 0.06$ ), nas avaliações realizadas aos 111, 137 e 146 dias, após a semeadura. Também foi observada diferença significativa, ao mesmo nível de probabilidade,

para o AACPD. A cultivar convencional separou-se das cultivares transgênicas pelo teste SNK ao mesmo nível de significância (Tabela 1). Os coeficientes de variação foram relativamente baixos, principalmente quando comparados com trabalhos semelhantes realizados por Sasse (2008) e Fantin et al.(1991).

Pode-se observar também que a partir primeiro dia de avaliação até o último dia, houve um aumento da severidade de 84,9 %, 109,2 % e 112,9 % na cultivar NGM, GMHx e GMHxrr, respectivamente.

**Tabela 1.** Médias de severidade causada por *E. turcicum* em híbridos isogênicos de milho geneticamente modificado nas avaliações aos 105, 111, 123, 137 e 146 dias após a semeadura.

Híbridos	105 dias (ns)	111 dias	123 dias (ns)	137 dias	146 dias	Média	AACPD (ns)
NGM	23,8%	22,5% b	29,0%	39,30% a	43,81% b	31,68%	991,10 b
GMHx	28,0%	30,9% a	35,2%	47,86% a	58,57% a	40,10%	1237,14 ab
GMHxrr	27,8%	32,6% a	35,1%	48,12% b	59,20% a	40,56%	1455,59 a
CV (%)	13,4	10,6	16,6	6,50	5,04	-	13,10
<i>p</i>	0,35	0,02	0,37	0,034	0,004	-	0,058

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem pelo teste de SNK ( $p < 0,06$ ) e seguidas de ns não possuem diferenças significativas pelo mesmo teste.

Em um estudo realizado por Julliat et al., (2005), em diferentes híbridos de milho, não foram observadas diferenças significativas para a variável AACPD, calculada com base na severidade de *E. turcicum*. Apenas o fator época mostrou diferenças significativas para AACPD, interferindo na produtividade dos diferentes genótipos avaliados.

De acordo com a escala diagramática de AGROCERES (1996), a média da severidade, em porcentagem, cerca de 30 dias após o florescimento, indica o tipo de reação das diferentes cultivares híbridas quanto à resistência a *E. turcicum*. Desta forma, a cultivar convencional NGM apresentou mediana susceptibilidade ao fungo, enquanto as cultivares transgênicas apresentaram elevada suscetibilidade, na avaliação efetuada cerca de 30 dias após o florescimento, ou seja, aos 105 dias após a semeadura (Quadro 2). Essa maior susceptibilidade para a severidade de *E. turcicum*, nas cultivares transgênicas explica a diferença estatística encontrada entre dois dias de avaliação.

**Quadro 2.** Classificação das variedades de milho quanto à resistência a *E. turcicum*, segundo a escala diagramática elaborada por AGROCERES (1996), baseada na severidade da doença na planta inteira.

Cultivares	Resistência
NGM	Mediana susceptibilidade
GMHx	Suscetível
GMHxrr	Suscetível

Avaliação efetuada cerca de 30 dias após o florescimento

Em relação à porcentagem de folhas com sintomas da doença causada por *E. turcicum*, foi possível realizar apenas a análise estatística até a terceira avaliação, visto que a partir da quarta avaliação todas as folhas das plantas já apresentavam sintomas. Os tratamentos não apresentaram diferenças significativas para essa variável, em nenhuma das avaliações (Tabela 2).

**Tabela 2.** Percentagem médias de folhas com sintomas da doença causada por *E. turcicum*, nas avaliações realizadas aos 105, 111, 123 dias, após a semeadura.

Híbridos	105 dias (ns)	111 dias (ns)	123 dias (ns)
NGM	89%	89%	93%
GMHx	85%	87%	91%
GMHxrr	91%	85%	95%
CV (%)	5,38	10,6	2,40

As temperaturas médias registradas durante os primeiros meses do experimento não foram muito propícias para a ocorrência da infecção por *E. turcicum*, já que a temperatura ideal está entre 18 e 25° e as temperaturas registradas variaram de 9 a 25°C. Entretanto, Levy & Cohen (1983), estudando o efeito da temperatura na infecção por *Exserohilum turcicum*, verificaram que a infecção ocorria entre 15 e 30°C, ressaltando, porém, que o efeito da temperatura neste caso, depende também da concentração do inóculo. Desta forma, a elevada severidade da doença apresentada neste trabalho pode ser devida à elevada concentração do inóculo no local de realização do experimento.

A capacidade de biocontrole dos endofíticos pode advir de vários mecanismos, tais como a produção de substâncias deletérias aos fitopatógenos (M'PIGA et al., 1997) ou a competição por espaço e nutrientes. Indiretamente, pela produção de substâncias promotoras de crescimento (VARMA et al., 1999) ou pela indução de resistência sistêmica no hospedeiro (VAN LOON et al., 1998). Em vários desses casos, foi verificado que o modo de atuação de certos fungos endofíticos

para o controle de pragas, baseia-se em tornar a planta menos palatável a vários tipos de pragas, como afídeos, grilos, besouros, entre outros. Atualmente, é conhecido o fato de que várias toxinas são produzidas por fungos endofíticos e são elas que protegem a planta contra animais ou doenças causadas por fungos e bactérias (BIZZI, 2001). Desta forma, os fungos endofíticos podem estar relacionados com menor ou maior incidência da doença causada por *E. turcicum*. O fato da estrutura das comunidades fúngicas mudarem da cultivar convencional para as isogênicas transgênicas, assim como a resistência à requeima foliar destas cultivares, é um indício de que estes fatores podem estar correlacionados. Portanto, há a necessidade de maiores estudos nesta área para elucidar essas possíveis relações.

A comunidade de fungos endofíticos pode estar relacionada à resposta da planta a estresses como as doenças. Porém, seriam necessários mais estudos para afirmar se a mudança verificada na comunidade de fungos é essencial para a resposta observada no milho em relação à doença, ou se foram eventos independentes. Se estiverem correlacionadas, então as mudanças na composição dos endófitos podem estar afetando a reação das cultivares isogênicas de milho, em consequência da presença de transgenes.

## **6. CONCLUSÃO**

A comunidade de fungos endofíticos associada aos cultivares de milho transgênico é diferente daquela associada à cultivar isogênica não transgênica, sugerindo que os transgenes (evento TC1507 isolado e eventos TC1507+NK603 combinados) podem estar influenciando na sua composição.

A resistência a queima de Turcicum associada aos cultivares de milho transgênico é menor do que aquela manifestada pela cultivar isogênica não transgênica, sugerindo que os transgenes (evento TC1507 isolado e eventos TC1507+NK603 combinados) podem estar afetando direta ou indiretamente a resposta de defesa do milho ao *E. turcicum*.

## 7. REFERÊNCIAS

ACCUWEATHER. **Temperaturas médias em Florianópolis no ano de 2013.** Disponível em: <http://www.accuweather.com/pt/br/florianopolis/35952/april-weather/35952?monyr=4/1/2013&view=table> Acesso em: 12/11/2013.

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

ANDERSON, I. C.; CAMPBELL, C. D.; PROSSER, J. I. (2003). Diversity of soil fungi across a moorland-Scots pine (*Pinus sylvestris*) environmental gradient. **Environmental Microbiology** 5, 1121-1132, 2003.

ANKLAM, E.; GADANI, F.; HEINZE, P.; PIJNENBURG, H.; EEDE, G.V.D. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops plant-derived food products. **European Food Research and Technology**, n.214, p.3-26, 2002.

AMOS, B; WALTERS, D.T. Maize root biomass and net rhizodeposited carbon: an analysis of the literature. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 70, p. 1489–1503, 2006.

ARAÚJO, W.L.; LACAVAL, P.T.; MARCON, J.; LIMA, A.O.S.; SOBRAL, J.K.; PIZZIRANI-KLEINER, A.; AZEVEDO, J.L **Guia prático:** isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. Piracicaba: ESALQ/USP, 2010. 167 p.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, Jr., W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2000. [online]. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/full/4/reprint.html>>. Acesso em 07 nov. 2013.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Ganguli, B. N.; Deshmukh, S. K., 9eds). **Fungi:**

**multifaceted microbes**. Anamaya Publishers, New Delhi, India and CRC Press, Boca Raton, USA. pp. 189-207, 2007.

BALSAMO, G. M. **Análise proteômica de quatro variedades de milho geneticamente modificado mon810 e suas isolinhas**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 2011.

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.

BLEICHER, J.; BALMER, E. Efeitos da seleção recorrente fenotípica sobre a resistência a *Exserohilum turcicum* (pass.) Leonard & Suggs em milho. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília, v.28, n.11, p. 1291-1295, nov. 1993.

BORÉM, A. Variedades transgênicas e o meio ambiente. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. N. 34, 2005.

BRASIL. **Lei Nº 11.105**, de 24 de Março de 2005.

CAMPBELL, C.L. & MADDEN, L. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York. Wiley, 1990.

CASELA, R.C.; FERREIRA, A.S.; FERNANDES, F.T. PINTO, N.F.J.A. Cultivo do milho. **Embrapa Milho e Sorgo**. Sistemas de Produção, 1 ISSN 1679-012 Versão Eletrônica - 2ª Edição Dez./2006 2006. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho\\_2ed/doencasfoliares.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_2ed/doencasfoliares.htm) Acesso em: 05/11/2013.

CÉLERES – **Informativo biotecnologia**. IB13.01 - 5 de agosto de 2013. Disponível em: <http://celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2013/08/IB13011.pdf> Acesso em: 05/11/2013.

CELLINI, F.; CHESSON, A.; COLQUHOUN, I.; CONSTABLE, A.; DAVIES, H.V.; ENEGEL, K. H. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. **Food Chemistry Toxicology**. v 42:1089–1125, 2004.

CIB – Conselho de informações sobre biotecnologia. **Eventos aprovados**, 2013. Disponível em: <http://cib.org.br/biotecnologia/regulamentacao/ctnbio/eventos-aprovados/tc-1507-herculex/> Acesso em: 11/11/2013.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Núcleo Regional Sul, 2004. 400p.

CONAB – Companhia nacional de abastecimento abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira – Grãos safra 2012/2013. **Décimo segundo levantamento**. setembro de 2013. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_10\\_16\\_14\\_32\\_01\\_boletim\\_portugues\\_-\\_setembro\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_10_16_14_32_01_boletim_portugues_-_setembro_2013.pdf) Acesso em: 08/11/13.

CTNBio - Comissão técnica nacional de biossegurança. **Comunicado 206**. 20 de dezembro de 2002. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/385.html> Acesso em: 06/11/2013.

CTNBio - Comissão técnica nacional de biossegurança. **Parecer técnico Nº2041/2009**.

CTNBio - Comissão técnica nacional de biossegurança, 2010. **Pareceres técnicos sobre aprovação de eventos geneticamente modificados**. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12482.html>. Acesso em 10/11/2012. Acesso em: 13/11/2013.

DEMARCHI, M. **Análise da conjuntura agropecuária**: Milho, safra 2011/2012. Estado do paraná secretaria da agricultura e do abastecimento departamento de economia rural, 2011.

DOYLE, J.J.; DOYLLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

DUNFIELD, KE; GERMIDA, JJ. Impact of genetically modified crops on soil and plant associated microbial communities. **J Environ Quality**: 33:806-815, 2004.

FANTIN, G.M.; SAWAZAKI, E.; BARROS, B.C. Avaliação de genótipos de milho pipoca quanto a resistência a doenças e qualidade da pipoca. **Summa Phytopathologica**. v.17, p. 90-99, 1991.

FIGUEIREDO, M.V.B. **Microrganismos e agrobiodiversidade**: o novo desafio para a agricultura = microorganismos y agro biodiversidad : un nuevo desafio para la agricultura. Guaiba (RS): Agrolivros, 2008. 566p. ISBN 9788598934051

FRÖHLICH, J. & HYDE, K. D. (1999) **Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic?** **Biodiversity and Conservation**. London, v.8, p977-1004, 1999.

GAMBOA, M.A., LAUREANO, P. AND BAYMAN, P. **Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments**: Does size matter? **Mycopathologia** 156: 41-45, 2002.

GOGGI, A. S.; CARAGEA, P.; LOPEZ-SANCHEZ, H.; WESTGATE, M.; ARRITT, R.; CLARK, C. Statistical analysis of outcrossing between adjacent maize grain production fields. **Field Crops Research**, n. 99, p. 147–157, 2006.

GOMES, N.C.M.; FAGBOLA, O.; COSTA R.; RUMJANEK, N.G.; BUCHNER, A.; MENDONA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Dynamics of Fungal Communities in Bulk and Maize Rhizosphere Soil in the Tropics. **Applied and Environmental Microbiology**, , p. 3758–3766 Vol. 69, July 2003.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.

ISAAA – International service for de acquisition of agri-biotech applications - **GM Approval Database, 2013.** Disponível em: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/advsearch/default.asp?CropID=6&TraitTypeID=Any&DeveloperID=Any&CountryID=Any&ApprovalTypeID=Any> Acesso em 06/11/2013.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. **ISAAA**, International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications. No. 44.

JULIATTI F. C.; SOUZA, R. M. Efeito de épocas de plantio na severidade de doenças foliares e produtividade de híbridos de milho. **Bioscience Journal**. Uberlândia, V. 21, n. 1, p. 103-112, Jan./Abril 2005.

KIMATI, Hiroshi. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo (SP): Agronômica Ceres, 1997.

KOK, E.; KUIPER, A. Comparative Safety assessment for Biotech crops. **Trends in Biotechnology** v.21 (10): 439 – 444, 2008.

LACAVA, P. T.; ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L.; Metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos. In: **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, v. 01, p. 211-232, 2008.

LEVY, Y.; COHEN, Y. Biotic and environmental factors affecting interaction of sweet corn with *Exserohilum turcicum*. **Phytopathology**, v.73, n.5, 1983.

LI, X. et al. Simplex and Duplex Polymerase Chain Reaction Analysis of Herculex® RW(59122) Maize Based on One Reference Molecule Including Separated Fragments of 5\_ Integration Site and Endogenous Gene. **Journal of AOAC International**, v. 92, p. 1472-1483, 2009.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plantas geneticamente modificadas autorizadas para produção comercial no Brasil**, 2012. Disponível

em em:  
[http://www.agricultura.gov.br/portal/pls/portal/!PORTAL.wwpob\\_page.show? docname=1324452.PDF](http://www.agricultura.gov.br/portal/pls/portal/!PORTAL.wwpob_page.show? docname=1324452.PDF) Acesso em: 06/11/13.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Organismos geneticamente modificados**, 2013. Disponível em:  
<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/organismos-geneticamente-modificados> Acesso em: 06/11/2013.

MARCELINO, F.C.; MARTINS, M.F.; PIMENTA, M.A.S.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Detecção de resíduos de transgênicos em grãos e produtos derivados. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.31, p.14-17, jul./dez., 2003.

MATTOSO, M.J.; GARCIA, L.C.; DUARTE, J.O.; CRUZ, J.C. Aspectos de produção e mercado do milho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 233, p.95-104, jul./ago. 2006).

MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. Valor Biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In Maia, L. C.; Malosso, E.; Yano-Melo, A.N., (orgs). **Micologia: avanços no conhecimento**. Sociedade Brasileira de Micologia, Recife. pp. 129-140, 2007.

MENDES, R. Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas endofíticas associadas à cana-de-açúcar. **Tese**. Genética e Melhoramento de Plantas, ESALQ-USP. 2008.

METZDORFF, S. B., KOK, E. J., KNUTHSEN, P., PEDERSEN, J. Evaluation of a Non-Targeted “Omic” Approach in the Safety Assessment of Genetically Modified Plants. **Plant Biology**, v.8, p.662–672, 2006.

MISAGHI, I.J.; DONNDE LINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopatology**, v.80, p.808-811, 1990.

M'PIGA, P.; BELANGER, R.R.; PAULITZ, T.C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 50, p. 301-320, 1997.

NASCIMENTO, VIVIAN ELIAS. **Fluxo gênico e métodos de detecção e quantificação de milho geneticamente modificado**. 117 p. Doutorado – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2011.

OGLIARI, J.B. **Identificação e localização de um gene de resistência de milho à *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs. através do uso de marcadores microsatélites**. Piracicaba, 1999. 115p. Tese (Doutorado) - ESALQ/USP, 1999.

OGLIARI, J.B.; BOSCARIOL, R.L.; CAMARGO, L.E.A. Optimization of PCR amplification of maize microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p. 395-398, 2000.

OGLIARI, J.B.; GUIMARÃES, M.A.; CAMARGO, L.E.A. New resistance genes in the *Zea mays* - *Exserohilum turcicum* Pathosystem. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, p.3, 2005.

OGLIARI, J.B. & ALVES, A.C. Manejo e uso de variedades de milho como estratégia de conservação em Anchieta. In: BOEF, W.S. de; THIJSEN, M.H.; OGLIARI, J.B.; STHAPIT, B.R. **Biodiversidade e agricultores: fortalecendo o manejo comunitário**. Porto Alegre, R.S.: L&PM, 2007. 271p.

ØVREÅS L.; FORNEY L.D.F., TORSVIK V. Distribution of Bacterioplankton in Meromictic Lake Salenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Appl Environ Microbiol** **63**:3367–3373. 1997.

PEREIRA, O.A.P. Análise da situação atual da doença de milho no Brasil e disponibilidade de germoplasma resistente. **Summa Phytopathologica**, v.21, p. 67-70, 1995.

PERKINS, J.M., PEDERSEN, W.L. Disease development and yield losses associated with northern leaf blight on corn. **Plant Disease**, St. Paul, MN, v.71, p. 940-943, 1987.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer Verlag, 1991. P. 179-197.

PRETTY, J.N. The rapid emergence of genetic modification in world agriculture: contested risks and benefits. **Environmental Conservation**. v. 28, n. 3, p. 248–62. 2001.

PRIESTLEY, R. H.; BAYLES, R. A. The contribution and value of resistant cultivars to disease control in cereals. In: CLIFFORD, B. C.; LESTER, E. (Eds.). **Control of Plant Diseases: Costs and Benefits**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p. 53-65, 1988.

QUIST, D.; CHAPELA, I.H. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. **Nature**, v.414, p.541- 543, 29 nov. 2001.

REDLIN, S.C.; CARRIS, L.M. **Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology and evolution**. St. Paul. American phytopathological society, 1996. 203 p.

REIS, E.M.; CASA, R.T.; BRESOLIN, R.A.C. Manual de diagnose e controle de doenças do milho. 2 ed. **rev. atual**. Lages : Graphel, 2004. 144p

SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **29**: 319:343, 1998.

SAIKKONEN K.; WÄLI P.; HELANDER M.; FAETH, S.H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends Plant Sci** 9: 275–280, 2004.

SASSE, S. **Caracterização de variedades locais de milho procedentes de anchieta – S.C. quanto à resistência a *Exserohilum turcicum***. Dissertação de mestrado. UFSC, 2008.

SELOSSE, M.A.; BAUDOIN, E.; VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Comptes Rendus Biologies**. v.327, n.7, p.639-648, 2004.

SCHULZ, B. AND C. BOYLE. The endophytic continuum. **Mycol. Res.**, 109: 661-686, 2005.

SILVA, A.C., PEREIRA, J. O., AZEVEDO, J.L. Obtenção de fungos endofíticos de milho (*Zea mays*) var, piranão. In: **Reunião Anual de Genética de Microrganismos** Resumos. São Paulo: SBG/USP, 1992, p.134.

STROBEL, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and infection**. Paris, v.5 p. 535-544, 2003.

STUART, R. M.; **Comunidade de fungos endofíticos associada à cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada**. Dissertação (Mestrado em agronomia). Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2006.

TAKABATAKE, R. Evaluation of Quantitative PCR Methods for Genetically Modified Maize (MON863, NK603, TC1507 and T25). **Food Sci. Technol. Res.**, 16 (5), 421 – 430, 2010.

THOMSON, J. Genetically modified food crops for improving agricultural practice and their effects on human health. **Trends in Food Science and Technology**, n.14, p. 210-228, 2003.

USDA. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. **Corn Area, Yield, and Production**. Date Created 09

fev. 2012. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/wap/current/default.asp>>. Acesso em: 22 fev. 2012.

VAINIO, E.J. & HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, v.104, p. 927-936, 2000.

VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. & PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. **Rev. Phytopathol.** 36:453-83, 1998.

VARMA, A.; VERMA, S.; SUDHA, S.N.; BUTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p. 2741-2744, 1999.

VIANA, P. A.; PRATES, H. T.; RIBEIRO, P. E. A. **Uso de Extrato Aquoso de Folhas de Nim para Controle de Spodoptera frugiperda na Cultura do Milho.** Sete Lagoas: EMBRAPA CNPMS, 2006. 3 p. (EMBRAPA CNPMS. Circular Técnica, 88).

VIEIRA, P.D.S.\*; Motta, C.M.S.; Lima, D.; Torres; J. B., et al. Endophytic fungi associated with transgenic and non-transgenic cotton. **Mycology** Vol. 2, No. 2, June 2011, 91–97. Disponível em: <http://www.ppgea.ufrpe.br/novosite/images/Publicacao/p24.pdf> Acesso em: 13/11/2013.

WAGNER, B. L.; LEWIS, L. C. Colonization of Corn, Zea mays, by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. **Appl. Environ. Microbiol.** 2000, 66(8):3468.

WAKELYNS, M.S. Population dynamics of plant pathogens and aspects of their importance in resistance to plant disease. In. **Resistência de plantas a doenças - palestras do xxx Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Poços de Caldas, 10 a 14 de agosto, 1997. p. 85-91.

WEBER, A. J. Controle **químico de moléstias foliares em milho (*Zea mays* L.)**. UNIJUÍ – Universidade regional do noroeste do estado do rio grande do sul. IJUÍ (RS) 2010.

WOLF, C.; SCHERZINGER, M.; WURZ, A.; PAULI, U.; HÜBNER, P.; LÜTHY, J. Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. **European Food Research Technology**, v.210, p.367–372, 2000.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1 – Análise física e química do solo

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

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

NUM.	Al <sub>troc.</sub> cmol <sub>e</sub> dm <sup>-3</sup>	Ca <sub>troc.</sub> cmol <sub>e</sub> dm <sup>-3</sup>	Mg <sub>troc.</sub> cmol <sub>e</sub> dm <sup>-3</sup>	Al+H cmol <sub>e</sub> dm <sup>-3</sup>	CTC cmol <sub>e</sub> dm <sup>-3</sup>	% SAT da CTC		RELAÇÕES		
						BASES	Al	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K
1	0,0	5,6	4,0	8,9	17,5	50	0,0	1,1	74,1	65,2
2	0,1	4,6	4,0	7,6	13,8	45	1,6	1,2	40,3	34,2
3	0,0	3,2	2,6	6,6	12,5	47	0,0	1,2	48,1	39,1

Ca, Mg, Al, Mn e Na trocáveis extraídos com KCl 1 mol L<sup>-1</sup>; S-SO<sub>4</sub> extraído com CaHPO<sub>4</sub> 500 mg L<sup>-1</sup> de P; Zn e Cu extraídos com HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>; B extraído com água quente.

Protocolo	Amostra	Argila	Silte	Areia	Tipo **
		%	%	%	
13/25	K1	8	11	81	ST
13/26	K2	8	11	81	ST
13/27	K3	8	10	82	ST

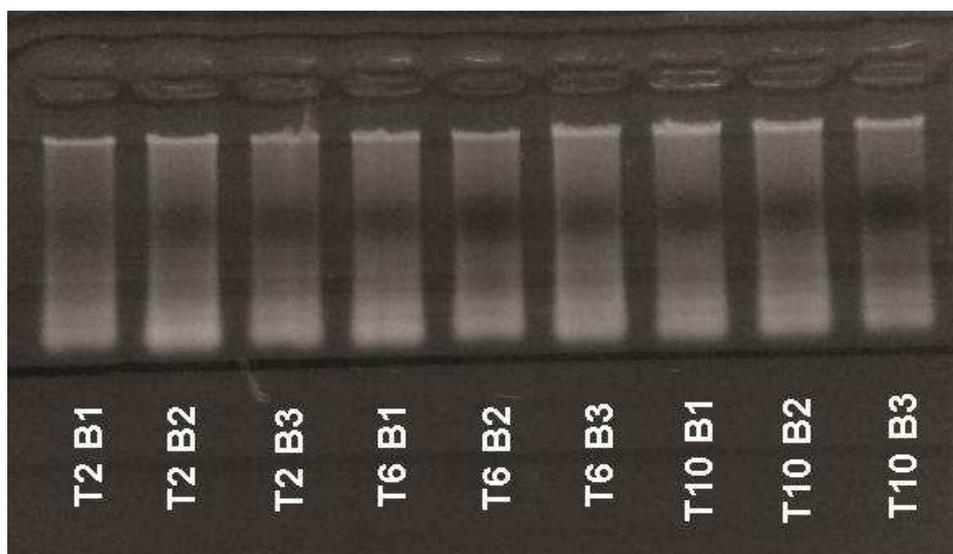
\* Análise efetuada em amostra recebida no laboratório, utilizando método da pipeta.

\*\* De acordo com Instrução Normativa SPA/MAPA Nº 2, de 09/10/2008.

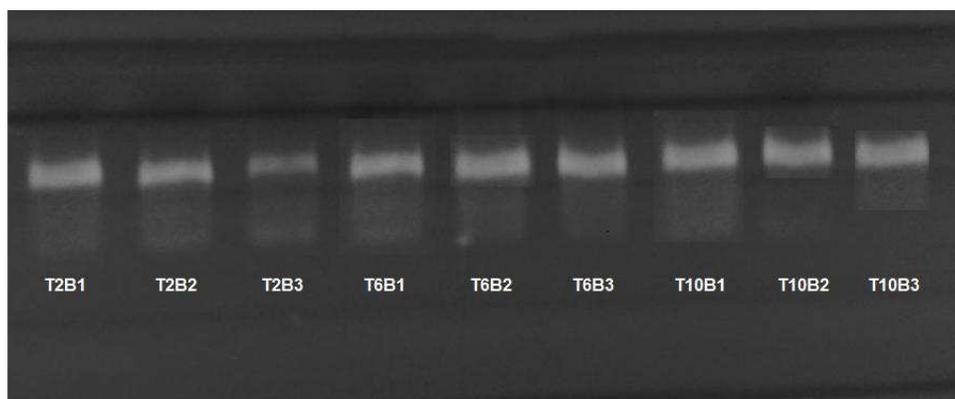
**Anexo 2.** Médias da temperatura nos meses de implantação do experimento ACCUWEATHER , 2013.

Mês	Médias	
	Máxima	Mínima
Abril	26	15
Maio	24	14
Junho	22	14
Julho	21	10
Agosto	22	10

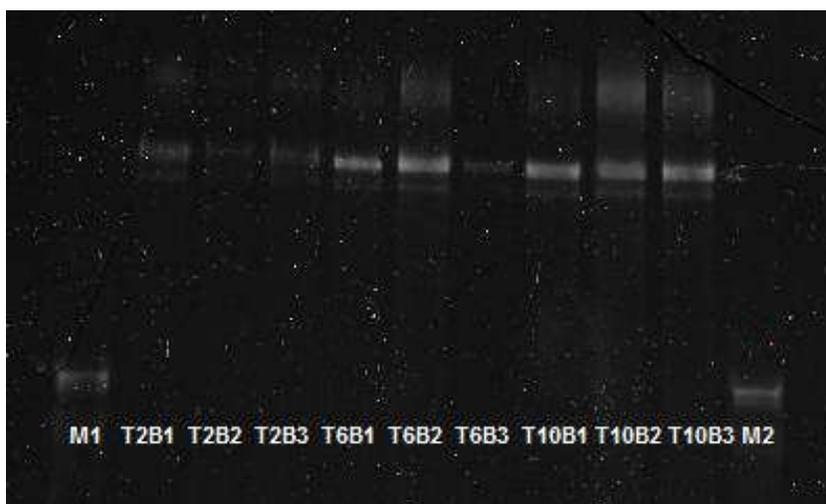
**Anexo 3 –** Foto do gel com o DNA dos diferentes tratamentos. T2 refere-se a cultivar convencional com três repetições; T6 refere-se ao cultivar transgênico com evento TC1507 com três repetições e T10 refere-se ao cultivar transgênico com os eventos TC1507 e NK603 com três repetições.



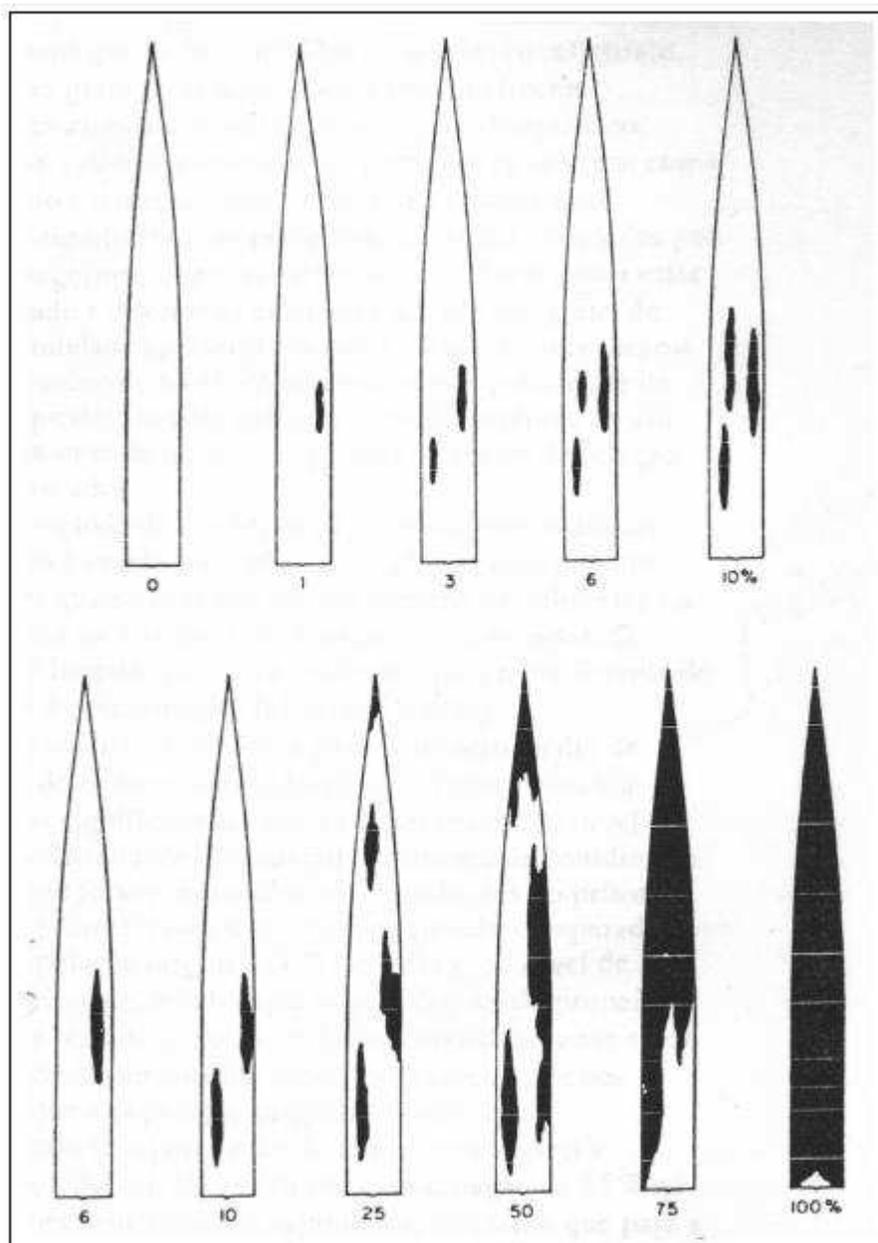
**Anexo 4** – Amplificações do DNA através da técnica de PCR. T2 refere-se a cultivar convencional com três repetições; T6 refere-se ao cultivar transgênico com evento TC1507 com três repetições e T10 refere-se ao cultivar transgênico com os eventos TC1507 e NK603 com três repetições.



**Anexo 5** – Foto do gel de DGGE. Amplificações do DNA através da técnica de PCR. T2 refere-se a cultivar convencional com três repetições; T6 refere-se ao cultivar transgênico com evento TC1507 com três repetições e T10 refere-se ao cultivar transgênico com os eventos TC1507 e NK603 com três repetições. M1 e M2 são os marcadores.



**Anexo 6** – Escala diagramática para avaliação da percentagem do tecido foliar infectado por *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard Suggs. elaborada por Bleicher (1988).



**Anexo 7** – Escala diagramática para avaliação da severidade de *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard Suggs. Elaborada por AGROCERES (1996).

