

# MONITORAMENTO DA COMUNIDADE MICROBIANA RIZOSFÉRICA ASSOCIADAS A GENÓTIPOS DE MILHOS TRANSGÊNICOS *Bt* COMERCIALIZADOS NO BRASIL

Amanda Nayê Guimarães TAVARES\*

Eliane Aparecida GOMES\*\*

Ubiraci de Paula LANA\*\*\*

Bárbara França NEGRI\*\*\*\*

## RESUMO

Eventos de milho geneticamente modificado (GM) expressando proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) têm sido cultivados comercialmente no Brasil desde a safra 2008/2009. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto de sete eventos comerciais de milho *Bt* sobre a comunidade microbiana do solo. Amostras de solo não rizosférico e solo rizosférico dos eventos de milho de sete linhagens transgênicas diferentes, seus respectivos isogênicos tratados e não tratados com inseticida químico foram avaliados utilizando técnicas de *Biolog* e restrição de fragmentos de polimorfismos terminais (T-RFLP). As amostras foram coletadas aos 30 e 60 dias após a germinação em Janaúba – MG, safra 2015/2016, sob condições de campo. Após 72 horas de incubação das placas de *Biolog* foram observados valores elevados da atividade e diversidade metabólica (Índice de Shannon) no solo rizosférico em comparação com o solo não rizosférico. Entretanto, não foram detectadas diferenças significativas entre os eventos transgênicos e os tratamentos convencionais. Além disso, também não foi observada diferença significativa na diversidade genética, avaliada por T-RFLP das comunidades de bactérias e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) entre genótipos convencionais e eventos GM. Foi verificada uma tendência de agrupamento baseada no período de coleta, mostrando a importância do estágio de desenvolvimento da planta na modulação da comunidade de FMA. De maneira geral, os eventos de milho *Bt* comercializados no Brasil avaliados neste trabalho não apresentaram impacto significativo sobre a estrutura das comunidades bacterianas e de FMA do solo, com base nos parâmetros estudados.

**Palavras-chave:** Monitoramento. Milho transgênico *Bt*. Micro-organismos do Solo. T-RFLP.

## ABSTRACT

Maize events genetically modified (GM) expressing insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) have been commercially grown in Brazil since the 2008/2009 season. The aim of this study was to evaluate the impact of seven commercial events of *Bt* maize on soil microbial community. Soil samples non-rhizosphere and rhizosphere of maize event of seven different transgenic lines, their treated isogenic and not treated with chemical insecticide were assessed using *Biolog* techniques and terminal restriction fragments polymorphism (T-RFLP). The samples were collected at 30 and 60 days after germination in Janaúba - MG, 2015/2016 crop, under field conditions. After 72 hours of incubation the *Biolog* plates were observed high values of the activity and metabolic diversity (*Shannon* index) in the rhizosphere compared with the non-rhizosphere soil. However, there

---

\* Graduanda de Biotecnologia da Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas – MG, amanda\_naye@hotmail.com

\*\* Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas – MG, eliane.a.gomes@embrapa.br

\*\*\* Analista da Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas – MG, ubiraci.lana@embrapa.br

\*\*\*\* Bióloga, Mestre em Bioengenharia, Docente da Faculdade Ciências da vida, Sete Lagoas – MG, barbarafnegri@gmail.com

weren't significant differences between the transgenic event and the conventional treatments. Moreover, it also wasn't observed significant difference in genetic diversity, evaluated by T-RFLP of bacteria and mycorrhizal fungi (AMF) communities between conventional and GM genotypes events. A grouping trend based the collection period was observed, showing the importance of plant development stage in the FMA community modulation. Overall, maize events *Bt* sold in Brazil in this work showed no significant impact on the bacterial communities and AMF soil structure, based on the parameters studied.

**Keywords:** Monitoring. *Bt* transgenic maize. Soil microorganisms. T-RFLP.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é um país que exerce papel de liderança na produção mundial de milho, ocupando o terceiro lugar entre os maiores produtores do grão (USDA, 2016). O principal motivo dos grandes investimentos na produção de milho é sua ampla gama de aplicação, pois é utilizado massivamente tanto na alimentação humana quanto na alimentação animal. Como agronegócio possui uma posição prestigiada na economia brasileira, a produção deste cereal torna-se indispensável ao crescimento da economia nacional. No entanto, o país ainda esbarra em algumas dificuldades para alcançar patamares de produtividade maiores, como por exemplo, os ataques por pragas (ABREU, 2014; SANTOS, 2015; SILVA, 2015).

Dentre as táticas utilizadas para o controle de insetos pragas na cultura do milho, o emprego das plantas transgênicas que expressam proteínas do *Bt* é bastante utilizado, devido sua elevada eficiência, especificidade e por não poluir o meio ambiente. No Brasil estas plantas já estão sendo cultivadas desde a safra de 2008, direcionadas principalmente a insetos da ordem *Lepidoptera* (PINHEIRO, 2013).

Os micro-organismos presentes no solo possuem funções muito significantes, que os tornam fundamentais para o equilíbrio dos ecossistemas, como a ciclagem de nutrientes, transformação da matéria orgânica entre outros (VILELA *et al.*, 2012). A crescente utilização de cultivares transgênicas torna fundamental o acompanhamento das comunidades rizosféricas de milhos transgênicos *Bt* visando detectar possíveis alterações na comunidade microbiana do solo advindas do seu cultivo, pois sabe-se que toxinas *Cry* são liberadas nos exudados do sistema radicular dessas plantas (GARCIA, 2012).

Esta avaliação, de grande importância, ajudará na comprovação da hipótese de que utilização das culturas transgênicas de milho *Bt* comercializadas no Brasil não ocasiona efeitos sobre a estrutura das comunidades de micro-organismos do solo. Sendo assim, questiona-se: quais são os possíveis impactos na estrutura e organização das comunidades

microbianas do solo que são organismos não alvos do cultivo do milho *Bt*? Tendo em vista os aspectos abordados, o presente trabalho foi realizado com objetivo de caracterizar a comunidade microbiana rizosférica associada a genótipos de milho geneticamente modificados que expressam proteínas *Bt*, baseando-se nas técnicas de T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* – Restrição de Fragmentos Polimórficos Terminais) e *Biolog*.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L) é um cereal pertencente à família *Poaceae*, originado no México e Guatemala, cuja domesticação aconteceu a partir do Teocinte, uma gramínea ancestral selvagem. Os primeiros relatos de seu cultivo datam de 10 a 8 mil anos atrás, o que indica que o milho foi fonte de alimento para várias civilizações remotas. Atualmente o milho está distribuído em quase todos os continentes, sua área de cultivo perde apenas para as culturas de trigo e arroz (BATISTA, 2012).

O elevado interesse econômico pela produção de milho pode ser explicado por seu alto valor nutricional e sua ampla gama de aplicabilidade, pois este cereal é utilizado para a alimentação humana seja *in natura* ou na forma de subprodutos como o óleo e a farinha, na alimentação animal é altamente empregado como matéria prima para fabricação de rações e silagem, podendo também ser utilizado na produção de bebidas como a cerveja, por exemplo, além de sua utilização nas indústrias de cosméticos e biocombustíveis (BATISTA, 2012; FACTORI, 2014 REPKE, 2013; VIROLI, 2014).

De acordo com a USDA (2016) o Brasil é o terceiro maior produtor de milho no mundo (85,0 milhões de toneladas na safra 2014/2015), perdendo apenas para os Estados Unidos (361,1 milhões de toneladas) e China (215,6 milhões de toneladas). A estimativa de produção para a safra 2015/2016 no Brasil é de aproximadamente 84 milhões de toneladas. Os principais estados brasileiros produtores de milho são Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás respectivamente, que somados detêm mais da metade da produção nacional (CONAB, 2016).

Como em outras culturas, no milho também existem alguns fatores limitantes para uma produtividade ótima, classificados como fatores abióticos e bióticos. Os fatores abióticos estão diretamente ligados à fertilidade do solo, disponibilidade de água e exposição à luz

(GUIMARÃES, 2013). Já os fatores bióticos estão relacionados com a interação de organismos com a planta, podendo interagir por simbiose, auxiliando no seu desenvolvimento como, por exemplo, os microrganismos solubilizadores de fósforo, que disponibilizam o fósforo presente no solo para as plantas, insetos polinizadores, entre outros. Por outro lado, existem também os fatores bióticos que podem ser prejudiciais ao desenvolvimento do milho, podendo também provocar doenças como infecções por microrganismos e nematoides, além dos ataques causados por insetos pragas (BATISTA, 2012).

## MILHO *Bt*

Os insetos mastigadores são considerados as maiores pragas do milho. Dentre eles, a Lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) é a responsável pela maior parte dos danos, seguida da lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*) e mais recentemente, da *Helicoverpa armigera*, nova espécie detectada no Brasil, bem parecida com a *Helicoverpa zea*, mas com adaptações evolutivas que a torna potencialmente capaz de causar elevados prejuízos às lavouras (CRUZ *et al.*, 2013). Para tentar minimizar os impactos e danos causados, a utilização da tecnologia de DNA recombinante permitiu a criação de plantas de milho transgênicas que expressam a proteínas boinseticidas provenientes do *B. thuringiensis*, conferindo resistência às pragas do milho, principalmente dos insetos da ordem *Lepidoptera* e *Coleoptera* (GARCIA, 2012; AGUIRRE *et al.*, 2015; SANTOS, 2015).

A área plantada com culturas *Bt* foi de aproximadamente 13,4 milhões de hectares no Brasil na safra 2015/16, apresentando um aumento de 6,3% em relação a safra 2014/15 (CÉLERES, 2016). Os benefícios destas culturas incluem especificidade e efetividade no combate aos insetos-pragas alvos, diminuição no uso de inseticidas sintéticos, e redução dos danos causados aos organismos que não são alvos destes inseticidas (BERNARDI *et al.*, 2015).

O micro-organismo do solo *B. thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva de distribuição cosmopolita. Como todas as bactérias do gênero *Bacillus*, *B. thuringiensis* também possui uma fase de esporulação no seu desenvolvimento, onde o esporo bacteriano e uma  $\delta$ -endotoxina são formados simultaneamente (GARCIA, 2012; SANTOS, 2015). Essa endotoxina formada durante a esporulação possui característica inseticida para determinadas ordens de insetos e se apresenta em forma de cristais, daí então sua nomenclatura Cry, que vem do inglês *crystal* (PINHEIRO, 2013).

De acordo com Garcia (2012), as toxinas Cry são discriminadas de acordo com seus genes codificadores, sua estrutura entre outros fatores. Para melhor identificação são classificadas em cinco famílias (I-V), quatro classes (A-D) e três subclasses (a-c). Dentre as aproximadamente 60 proteínas Cry identificadas, pode-se citar como exemplo Cry1 e Cry2b que são específicas para lepidópteros. As proteínas do grupo Cry2A são direcionadas à lepidópteros e dípteros e, por fim o grupo Cry3 com especificidade para coleópteros. As toxinas *Bt* não se resumem apenas às proteínas codificadas pelo gene Cry, existe também o gene *Vip* (*Vegetative Insecticidal Protein* – Proteínas Inseticidas Vegetativas), que são específicos contra insetos da ordem *Coleoptera* em estágios larvais. As proteínas *Vip*, ao contrário das proteínas Cry, são expressas na fase vegetativa da bactéria e não durante sua esporulação (SANTOS, 2015).

De início, as toxinas *Bt* não possuem atividade tóxica, são ativadas posteriormente à liberação do seu núcleo ativo que ocorre durante sua lise na ingestão da mesma pelo inseto e submissão a condições alcalinas presentes no tubo digestivo do inseto (NAIS, 2012). Na parede intestinal do inseto existem receptores específicos para as toxinas *Bts*, sejam elas Cry ou *Vip*. Ao se ligar nos receptores inicia-se a inibição da ingestão e respectiva absorção dos nutrientes, posterior ruptura do tubo digestivo acarretando então a morte do inseto (PINHEIRO, 2013).

Em meados da década de 1980 foi clonado o primeiro gene da toxina *Bt*, a partir de então, o desenvolvimento das primeiras plantas transgênicas foi rápido. A inserção do gene exógeno no genoma da planta pode ser realizada de forma direta como, por exemplo, eletroporação e bombardeamento de micropartículas, ou de forma indireta, via vetores biológicos, especificamente bactérias do solo do gênero *Agrobacterium*, que são conhecidas por conseguirem introduzir parte de seu material genético no genoma de determinadas plantas de forma natural (NAIS, 2012).

## SOLO RIZOSFÉRICO

O solo aderido às raízes das plantas é denominado solo rizosférico, sendo característico por estar sob constante influência dos exsudatos das raízes. Devido sua localização, a rizosfera está sempre recebendo substâncias com valor energético agregado, advindas do metabolismo vegetal, isto explica o porquê desta região apresentar uma elevada comunidade microbiana quando comparada ao solo não rizosférico. Assim como o tipo de solo e o clima podem influenciar a diversidade microbiana do solo, a composição e a

quantidade do exsudato gerado pelo sistema radicular vegetal também pode modular a dinâmica da microbiota (SILVA, 2008; SOUZA, E., 2012; ANDRADE, 2013).

Vários benefícios são gerados pela influência mútua solo-planta-micro-organismo. As plantas liberam uma miscelânea complexa de carboidratos, hormônios, células, proteínas, entre outros compostos que são rapidamente aproveitados pelos micro-organismos (CORDEIRO; CORÁ; NAHAS, 2012). Em contrapartida grande parte dos micro-organismos rizosféricos também contribuem, beneficiando o desenvolvimento da planta, podendo ser de forma direta, aumentando a disponibilidade nutrientes e produzindo substâncias reguladoras do crescimento, ou de forma indireta suprimindo o desenvolvimento de patógenos e até mesmo induzindo a resistência da planta (BATISTA, 2012; ANDRADE, 2013).

Buscando entender a contribuição da microbiota do solo no desenvolvimento vegetal, Vilela e colaboradores (2012) compararam o crescimento de plantas de milho crioulo em solo de Cerrado esterilizado e não esterilizado. Estes autores observaram melhor desenvolvimento da planta no solo não esterilizado em todos os aspectos avaliados, onde obtiveram um aumento expressivo no diâmetro do colmo, produção de matéria seca da parte aérea e das raízes.

Apesar de vários fatores influenciarem a comunidade microbiana rizosférica, alguns micro-organismos mostram-se predominantes nas amostras deste solo. Dentre as rizobactérias, as pertencentes ao filo *Proteobacteria* são encontradas em maior quantidade, seguidas pelos filos *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Verrumicrobia* e *Acidobacteria*. Já entre a comunidade fúngica da rizosfera, os principais filos presentes são *Ascomycota* e *Glomeromycota*, neste último estão presentes os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (FLORES, 2015).

Fungos micorrízicos arbusculares são organismos biotróficos obrigatórios, ou seja, não se multiplicam se não houver a presença de uma planta para fornecer nutrientes necessários ao seu desenvolvimento. Eles interagem com as plantas especificamente no sistema radicular, agindo como extensores das raízes. Auxiliam no desenvolvimento na planta devido ao aumento da superfície de contato das raízes com solo, favorecendo a absorção de água e nutrientes (FARIA, 2009; GUMIERE, 2012; ANDRADE, 2013). Campos e colaboradores (2010) em estudo realizado a fim de verificar a eficiência de solos de pastagens degradados, como inoculante potencial de FMA, observaram que a inoculação incrementou a produção de matéria seca do sistema radicular em todos os genótipos estudados e aumentou a produção de matéria da parte aérea de quatro dos nove genótipos.

## CARACTERIZAÇÃO DE COMUNIDADES MICROBIANAS NO SOLO

O solo é um ambiente extremamente rico em termos de biodiversidade, entretanto pouco conhecido. A estimativa é que um grama de solo contenha aproximadamente  $10^9$  células distribuídas em até trinta mil espécies diferentes. Apesar desses números exorbitantes, somente cerca de 1% desses microrganismos são cultiváveis, conseqüentemente, menos 5% são caracterizados adequadamente. O interesse em caracterizar comunidades microbianas cresce consideravelmente, devido às inúmeras possibilidades de aplicação biotecnológica desses micro-organismos (BATISTA, 2012, ANDRADE, 2013).

As técnicas dependentes de cultivo, como crescimento em meios nutritivos, aliadas às técnicas baseadas em sequências de ácidos nucleicos têm se mostrado bastante eficiente, para a caracterização de estrutura e modificações em comunidades microbianas. Além disso, a facilidade e rapidez de suas metodologias contribuem para elas ainda serem muito empregadas. Um exemplo disso é o Sistema *Biolog*, que avalia o perfil metabólico da comunidade microbiana cultivável através da utilização de diferentes fontes de carbono (SOUSA, 2005).

Cada *Ecoplate* (Biolog, Inc. HAYWARD; A; USA) possui 96 poços, comportando 3 amostras, que normalmente são suspensão de solo em solução salina. Essas amostras são submetidas a 31 fontes de carbono distintas e um controle negativo (Figura 1) e são incubadas no escuro. Ao serem oxidados durante a respiração dos micro-organismos, os substratos desenvolvem uma coloração que é medida em espectrofotômetros a 405 ou 590 nm, a cada 24 horas. A partir das leituras de absorbância são realizados os cálculos das medidas de diversidade metabólica como o Índice de Shannon (H) que abrange a riqueza do substrato e a intensidade de sua utilização, a atividade total, média de desenvolvimento de cor (AWCD) e equidade (E) que mostra o grau da utilização de um substrato em relação ao número de substratos consumidos pela comunidade (ZAK, 1994; SOUSA, 2005; VIANA, 2013).

Dando suporte aos métodos baseados em cultivo e aumentando a eficácia das análises de estrutura e dinâmica das comunidades microbianas, os estudos baseados em sequências de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) vêm sendo cada vez mais aplicados à ecologia microbiana. Os genes ribossomais são os mais utilizados para essas análises, pois além de ser muito antigos, eles possuem alto grau de conservação, devido importância de sua função na síntese de proteínas, e possui também regiões variáveis entre espécies (SOUZA, R., 2012).

A1 Water	A2 β-Methyl- D- Glucoside	A3 D- Galactonic Acid γ- Lactone	A4 L- Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl- D- Glucoside	A3 D- Galactonic Acid γ- Lactone	A4 L- Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl- D- Glucoside	A3 D- Galactonic Acid γ- Lactone	A4 L- Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L- Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L- Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L- Asparagine
C1 Tween 40	C2 i- Erythritol	C3 2- Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i- Erythritol	C3 2- Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i- Erythritol	C3 2- Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D- Mannitol	D3 4- Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D- Mannitol	D3 4- Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D- Mannitol	D3 4- Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl- D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L- Threonine	E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl- D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L- Threonine	E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl- D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L- Threonine
F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid
G1 D- Cellobiose	G2 Glucose- 1- Phosphate	G3 α- Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D- Cellobiose	G2 Glucose- 1- Phosphate	G3 α- Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D- Cellobiose	G2 Glucose- 1- Phosphate	G3 α- Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine
H1 α-D- Lactose	H2 D,L-α- Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D- Lactose	H2 D,L-α- Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D- Lactose	H2 D,L-α- Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

**Figura 1. Esquema da distribuição de fontes de carbono na *Ecoplate***

Fonte: <http://www.biolog.com> (2016).

Segundo Santana (2013) para o estudo de procariontos, o gene mais utilizado é o rRNA 16S, que compõe a subunidade pequena ribossômica bacteriana 30S. Este gene possui aproximadamente 1650 pares de bases, o que permite utilizá-lo com sucesso na diferenciação dos procariontes a nível de gênero, e em determinados casos a nível de espécie. Já para o estudo da diversidade de eucariotos, especificamente de fungos, as regiões do DNA mais utilizadas são os genes rRNA 18S e 28S as regiões espaçadoras ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e IGS (*Intergenic Spacer*). Enquanto os genes são altamente conservados, permitindo apenas a caracterização a níveis de gênero e às vezes espécies, as regiões espaçadoras apresentam elevada variabilidade, facilitando assim a diferenciação entre espécies e linhagens (PASSARINI, 2012).

Atualmente existem várias ferramentas de caracterização molecular de comunidades microbianas, muitas delas são baseadas em PCR (Reação em cadeia da Polimerase), como por exemplo, DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante), SSPC (Conformação de Polimorfismo em Fita Simples), ARDRA (Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado) e TRFLP (Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição Terminal) (ROSA, 2006).



O T-RFLP é uma técnica que está sendo amplamente empregada em estudos de ecologia microbiana, isto porque além de ser uma metodologia independente de cultivo, é de fácil manipulação, rápida avaliação podendo ser utilizada em grandes quantidades de amostras. Esta metodologia é baseada na restrição de genes ribossomais amplificados de amostras ambientais. Basicamente a técnica consiste na amplificação do gene alvo, utilizando *primers* marcados com fluorescência ao menos em uma das extremidades, em seguida esses *amplicons* marcados, são digeridos com enzimas de restrição onde irar gerar os fragmentos terminais de restrição (T-RFs). O produto da restrição é injetado em um sequenciador automático, onde passará por uma eletroforese capilar, e a fluorescência é detectada. As diferenças entre os tamanhos dos T-RFs são associadas aos polimorfismos das sequências ribossomais da população estudada (MACEDO, 2012; PRAKASH,2014).

Gschwendtner e colaboradores (2015) obtiveram sucesso ao utilizar o T-RFLP para estudar o impacto causado pela elevação do CO<sub>2</sub> atmosférico nas comunidades microbianas rizosféricas associadas a árvores jovens de Faia - Européia (*Fagus sylvatica L.*) cultivadas em dois ambientes de clima contrastante. Resultados mostraram que a elevada concentração de CO<sub>2</sub> afetou negativamente a comunidade microbiana, diminuindo significativamente a diversidade dos micro-organismos presentes naquele microbioma.

## **METODOLOGIA**

### **COLETA DE DADOS**

#### **Coleta e Processamento das Amostras**

A unidade de análise foi o campo experimental da Embrapa Milho e Sorgo, localizado no município de Janaúba – MG (15°47’S 43°18’W) com o solo classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo, epieutrófico, de textura franco-argilo-arenoso, onde foram coletadas as amostras. Todos os tratamentos de milho utilizados neste estudo foram cultivados em delineamento em blocos casualizados com três repetições, baseado na técnica desenvolvida por Federer (1956). Os 21 tratamentos, que são a unidade de observação, apresentaram-se da seguinte maneira: sete eventos de milho transgênico (possuem o gene *Cry/VIP* de *Bacillus thuringiensis* que confere resistência à lagarta do cartucho) e seus respectivos genótipos isogênicos (possuem exatamente os mesmos genes do milho transgênico, exceto os genes exógenos inseridos para obtenção da resistência), tratados e não

tratados com inseticidas químicos, totalizando 63 amostras que estão representadas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Identificação dos genótipos de milho convencional e milho *Bt*

<b>Evento</b>	<b>Transgênicos</b>	<b>Isogênicos</b>	<b>Isogênicos + Inseticidas</b>
<b>DKB390 YG</b>	101, 201 e 301	109, 209 e 309	105, 205 e 305
<b>FÓRMULA TL</b>	102, 202 e 302	110, 210 e 110	106, 206 e 306
<b>MORGAN 20A78 HX</b>	103, 203 e 303	111, 211 e 311	107, 207 e 307
<b>DKB390 PRO X</b>	104, 204 e 304	109, 209 e 309	105, 205 e 305
<b>2B587 POWER CORE</b>	108, 208 e 308	114, 214 e 314	112, 212 e 312
<b>DKB390 PRO2 5</b>	113, 213 e 313	115, 215 e 315	105, 205 e 305
<b>IMPACTO VIPTERA</b>	116, 216 e 316	118, 218 e 318	217, 217 e 317

Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

Foram coletadas raízes de cinco plantas de cada repetição com solo aderido após 30 e 60 dias de plantio (período de desenvolvimento foliar e florescimento, respectivamente) cultivados no ano de 2015. As raízes foram separadas em sacos plásticos, mantidas em caixas de isopor com gelo e encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas - MG.

As raízes foram agitadas de modo a separar o solo fracamente aderido e posteriormente pesadas 5 gramas de raízes com solo rizosférico aderido a elas. Após a pesagem as raízes foram colocadas em tubo Falcon de 50 mL contendo solução de pirofosfato de sódio 0,1% e agitadas por 30 minutos em homogeneizador horizontal à velocidade 130rpm. Após a homogeneização, uma parte da solução foi utilizada para análise de diversidade e atividade metabólica das comunidades microbianas do solo. As raízes foram removidas e o sobrenadante transferido para novo tubo e centrifugado por 30 minutos a 10.000rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* (solo) foi ressuscitado em 1,8mL de água ultrapura autoclavada e centrifugado novamente a 14.000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* congelado em nitrogênio líquido e armazenado em *freezer* -80 °C até a extração do DNA.

## Determinação da Diversidade e Atividade Metabólica

Para determinar a diversidade e atividade metabólica foram utilizadas placas *Ecoplate* (*Biolog, Inc., Hayward, CA, USA*). Uma alíquota de 5 mL da solução de pirofosfato de sódio 0,1% contendo solo foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi diluído 50 vezes. Foi inoculado uma alíquota de 120 µL da solução diluída em cada poço da placa de *Biolog*, que posteriormente foi incubada no escuro durante 4 dias a 28 °C. As leituras das placas foram realizadas em espectrofotômetro (*Labstems, MultSkán, MS, USA*) com comprimento de onda ajustado para 590 nm, nos intervalos de 48 horas, 72 horas e 96 horas de incubação. A leitura de 72 horas foi utilizada para calcular os componentes de diversidade metabólica (VIANA, 2013; SILVA, 2015). Essas informações foram utilizadas para a estimativa dos valores do índice de diversidade de *Shannon* (H) e da atividade *Average Well Colour Development* (AWCD) conforme Zak *et al.* (1994).

## Extração de DNA Total de Solo Rizosférico

A extração de DNA total de solo rizosférico foi realizada com o *Kit PowerSoil® DNA Isolation* seguindo as recomendações do fabricante (*MoBio Laboratories, Inc. EUA*). Em seguida, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop® (*Thermo Fisher Scientific, USA*) no comprimento de onda 260nm. A concentração do DNA genômico foi padronizada e ajustada para 1,0 ng/µL, utilizando-se água ultra-pura esterilizada como diluente.

## Amplificação Por PCR

Fragmentsos do gene 16S rRNA foram amplificados utilizando o *primer* 8F-FAM 5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' (LA MONTAGNE *et al.*, 2002) marcado com fluorescência na posição 5' e 1492R, 5'-TACGGTACCTTGTTACGACTT-3' (MARTIN-LAURENT *et al.*, 2001). A PCR constituiu de 2,5 µL de DNA, 2,5µL de cada *primer* a 10 mM, 6,25 µL de tampão de reação 10X, 3,12 µL de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µL dos dNTPs, 2,5 µL de Taq DNA polimerase (*Invitrogen™ Paisley, UK*) em volume final de 50 µL, ajustado com água ultra-pura esterilizada. A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 94°C durante

3 minutos, seguida de 25 ciclos a 94 °C por 45 segundos, anelamento dos *primers* a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para a amplificação do gene 28S rRNA de fungos micorrizicos arbusculares foi utilizado *nested*-PCR a partir de reação com *primers* LR1 (5'- GCA TAT CAA TAA GCG GAG GA-3') e FLR2 (5'-GTC GTT TAA AGC CAT TAC GTC-3') (VAN TUINEN *et al.*, 1998; TROUVELOT *et al.*, 1999). A reação inicial constituiu de 2,5 µL de DNA, 2,0 µL de cada *primer* a 10 mM, 6,25 µL de tampão de reação 10X, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2,5µL dos dNTPs, 0,5 µL de Taq DNA polimerase (*Invitrogen™ Paisley, UK*), 10 µL de solução de betaína e água ultra-pura para perfazer uma mistura de reação de 50 µL.

Para a segunda PCR, foram utilizados 2,5 µL do produto da primeira reação, 2,0 µL dos *primers* FLR3-FAM (5'-TTG AAA GGG AAA CGA TTG AAG T-3') e FLR4 (5'-TAC GTC AAC ATC CTT AAC GAA-3') (GOLLOTTE, 2004) a 10 mM, 6,25 µL de tampão de reação 10X, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2,5µL dos dNTPs, 0,5 µL de Taq DNA polimerase (*Invitrogen™ Paisley, UK*) e água ultra-pura para perfazer uma mistura de reação de 50 µL. As amplificações para FMA foram realizadas com desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto, anelamento dos *primers* a 60 °C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Uma alíquota de 10µL dos produtos de PCR foi corada com *Gel Red™ (Biotium, Hayward, Califórnia, USA)* e submetida a eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando-se como marcador de peso molecular 1Kb *Plus DNA Ladder (Life Technologies, USA)*. A visualização do DNA amplificado foi realizada em transiluminador sob luz ultravioleta e fotografada no equipamento L-PIX *Image EX (Loccus Biotecnologia - Loccus do Brasil, Cotia, SP, Brasil)*.

### Genotipagem por T-RFLP

Os fragmentos amplificados das regiões 16S rRNA e 28S rRNA, foram digeridos com as enzimas restrição *AluI* (TIPAYNOA *et al.*, 2012) e *TaqI* (VERBRUGGEN *et al.*, 2012), respectivamente. Para a digestão com *AluI* foram utilizados 10 µL do produto de PCR, 2 µL do tampão da enzima, 1,0 µL da enzima e 7,0 µL de água. A mistura permaneceu 4 horas a 37°C. Para a digestão com a enzima *TaqI* foram utilizados 10 µL do produto de PCR, 2,0 µL do tampão da enzima, 0,2µL de BSA a 10ng/µL, 0,5 µL da enzima e 7,3 µL de água. A mistura permaneceu por 4 horas a 65°C.

Para avaliar os fragmentos de DNA gerados, 2 µL da digestão foram misturados a 9,8 µL de formamida deionizada (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) e 0,2 µL de padrão ROX 500 (*Applied Biosystems*). A análise foi realizada no equipamento Genetic Analyzer 3500XL (*Applied Biosystems*) com o software *GeneMapper 5.0* (*Applied Biosystems*), que gerou os cromatogramas.

## ANÁLISE DE DADOS

Para determinar a diversidade e atividade metabólica os valores da atividade total foram convertidos utilizando a fórmula  $AWCD = \sum \frac{(OD_{substrato} - OD_{controle})}{31}$  (GARLAND; MILLS, 1991). Os valores acima de zero foram avaliados como reação positiva, indicando a utilização de substratos, enquanto que os valores negativos demonstraram que os substratos não foram utilizados. Os resultados em AWCD e índice de Shannon representado pela fórmula  $H = -\sum p_i (\ln p_i)$ , onde  $p_i$  é a razão entre a atividade de utilização de determinado substrato e a atividade de utilização de todos os substratos, foram submetidos ao teste de médias de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

Na avaliação da diversidade microbiana por T-RFLP os dados gerados no software *GeneMapper 5.0* foram exportados e carregados na plataforma de processamento online T-REX (CULMAN *et al.*, 2009), possibilitando filtragem dos ruídos e alinhamento automático referente ao tamanho dos fragmentos gerados pela digestão enzimática. Após filtragem e alinhamento, os dados foram exportados em planilha binária para o software estatístico PAST (HAMMER, 2001). Para análise estatística, foi adotado o método de ordenação baseado no padrão de discriminação determinado por escalonamento multidimensional não-métrico (NDMS) e utilizada a medida de distância de *Jaccard* entre três repetições biológicas para análise dos dados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ATIVIDADE E DIVERSIDADE METABÓLICA

Após as 72 horas de incubação nas diferentes fontes de carbono da *Ecoplate* (*Biolog, Inc., Hayward, CA, USA*), pôde-se observar de uma forma geral, que as comunidades bacterianas não apresentaram diferenças significativas na utilização de carbono em função das

fases de desenvolvimento da planta no campo (coleta) e do material genético (Tabela 2). Valores elevados de AWCD (2,2 – 2,6) e H (3,3 – 3,4) foram observados no solo rizosférico em comparação com solo não rizosférico (AWCD = 0,1; H = 1,9 – 2,5), diferindo-os significativamente.

Silva (2015) avaliando o impacto do milho transgênico super-expressando o gene de tolerância ao alumínio (Al) *SbMate* sobre a comunidade microbiana rizosférica, observou que aos 60 dias de desenvolvimento da cultura o perfil metabólico da comunidade não sofreu alteração, diferenciando apenas do solo não rizosférico e aos 90 dias houve alteração na comunidade rizosférica associada aos genótipos híbridos independentes de ser transgênicos ou não, mostrando que os genótipos foram determinantes na modulação da comunidade e não o transgene.

De acordo com Gomes *et al.*, (2014) alguns fatores ambientais, como as características físico-químicas e biológicas do solo utilizado para o cultivo a disponibilidade dos macros e micronutrientes às plantas e o estágio de desenvolvimento da mesma, influenciam expressivamente a organização e a estruturação das comunidades bacterianas associadas à sua rizosfera. Estes fatores segundo os mesmos autores, apresentam efeitos mais expressivos sobre essas comunidades do que a associação a plantas de milho transgênico *Bt*.

Apesar de apresentar resultados relevantes, os métodos dependentes de cultivo *in vitro* de micro-organismos, como o *Biolog*, apresentam limitações, uma vez que algumas bactérias não podem ser cultivadas, incorrendo em uma seletividade para determinados grupos de bactérias (ZAK *et al.*, 1994). Portanto, para complementar as análises, a diversidade genética foi avaliada por T-RFLP, uma técnica que avalia o DNA presente no solo e não depende do cultivo dos micro-organismos.

## DIVERSIDADE GENÉTICA POR T-RFLP

Os protocolos realizados para a extração de DNA e amplificação dos fragmentos 16S rRNA (bactérias) e 28S rRNA (FMA), possibilitaram a recuperação dos *amplicons* provenientes do DNA extraído do solo rizosférico dos milhos transgênicos e convencionais. As amostras foram avaliadas em triplicatas para cada genótipo e estágio de crescimento das plantas, obtendo-se padrões de restrição dos fragmentos citados a cima, bastante similares entre as repetições em todos os tratamentos avaliados. Os dados genotípicos gerados foram agrupados por meio da análise de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) utilizando a medida de distância de *Jaccard*.

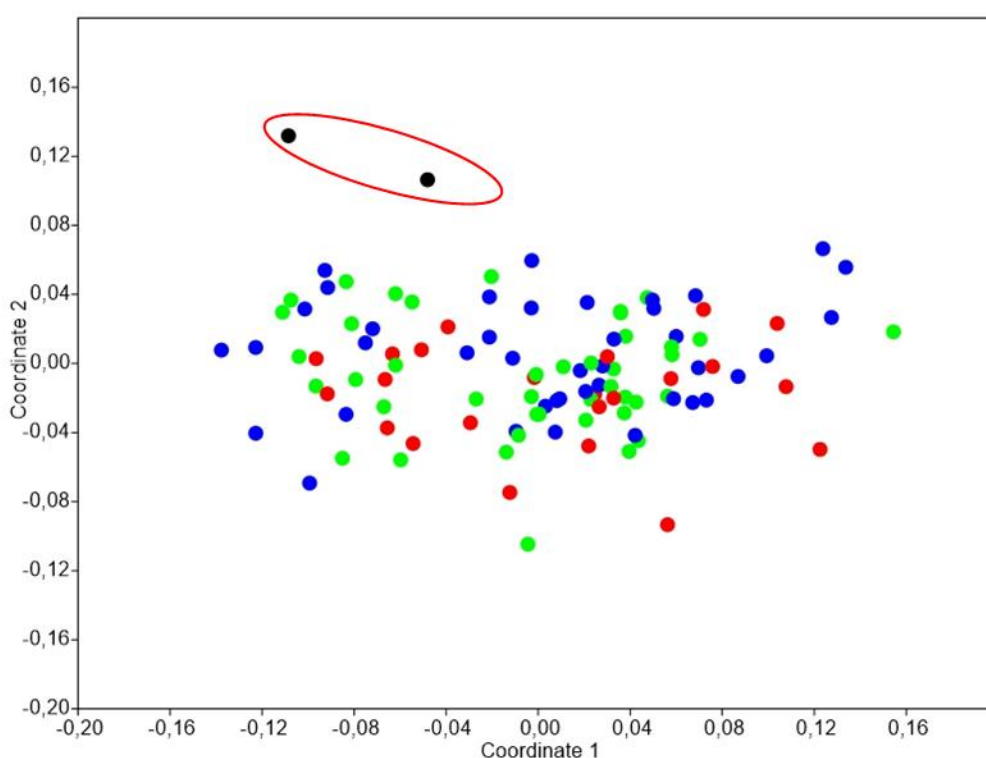
**Tabela 2** – Atividade (AWCD) e diversidade metabólica (Índice de Shannon - H). *Biolog* da população bacteriana de amostras de solo não rizosférico e solo rizosférico dos genótipos comerciais de milho transgênico Bt e respectivos isogênicos, tratados (ISO + I) ou não (ISO) com inseticida.

Genótipo	Transgene <i>Bt</i>	Atividade (AWCD)		Diversidade metabólica	
		Coleta 1 30 dias	Coleta 2 60 dias	Coleta 1 30 dias	Coleta 2 60 dias
Solo não rizosférico	–	0,110 a*	0,049 a	1,898 a	2,525 a
DKB 390 YG	<i>CryIAb</i>	2,523 b	2,407 b	3,389 b	3,348 b
ISO DKB 390	–	2,473 b	2,217 b	3,405 b	3,324 b
ISO DKB 390 + I	–	2,468 b	2,452 b	3,388 b	3,370 b
FÓRMLA TL	<i>CryIAb</i>	2,415 b	2,460 b	3,409 b	3,351 b
ISO FÓRMLA TL	–	2,638 b	2,489 b	3,406 b	3,372 b
ISO FÓRMLA TL + I	–	2,630 b	2,563 b	3,390 b	3,388 b
MORGAN 20A78 HX	<i>CryIF</i>	2,428 b	2,444 b	3,398 b	3,357 b
ISO MORGAN	–	2,467 b	2,377 b	3,355 b	3,353 b
ISO MORGAN + I	–	2,555 b	2,478 b	3,398 b	3,347 b
DKB 390 PRO X	<i>CryIA.105 + Cry2Ab2</i>	2,570 b	2,578 b	3,391 b	3,373 b
ISO DKB 390	–	2,473 b	2,217 b	3,405 b	3,324 b
ISO DKB 390 + I	–	2,468 b	2,452 b	3,388 b	3,370 b
2B587 POWER CORE	<i>CryIA.105 + Cry2Ab2 + CryIF</i>	2,453 b	2,399 b	3,369 b	3,319 b
ISO 2B587	–	2,415 b	2,341 b	3,398 b	3,380 b
ISO 2B588 + I	–	2,543 b	2,393 b	3,383 b	3,373 b
DKB 390 PRO 2	<i>CryIA.105 + Cry2Ab2</i>	2,532 b	2,345 b	3,412 b	3,345 b
ISO DKB 390	–	2,528 b	2,603 b	3,411 b	3,402 b
ISO DKB 390 + I	–	2,468 b	2,452 b	3,388 b	3,370 b
IMPACTO VIPTERA	<i>Vip3Aa20</i>	2,545 b	2,585 b	3,383 b	3,415 b
ISO IMPACTO	–	2,495 b	2,343 b	3,412 b	3,365 b
ISO IMPACTO + I	–	2,437 b	2,535 b	3,406 b	3,390 b

\* Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

No estudo da diversidade de bactérias, as amostras de solo rizosférico distanciaram-se das amostras de solo não rizosférico (Figura 2) e foram homogêneas entre si na projeção bidimensional das comunidades bacterianas, indicando diferenças nítidas na estruturação das comunidades microbianas. A distância entre as amostras de solo rizosférico e não rizosférico era esperada, visto que a comunidade bacteriana do solo não rizosférico não esteve em contato com os exsudatos das plantas de milho, diferenciando assim o ambiente e os respectivos nutrientes disponíveis aos micro-organismos (BATISTA, 2012).



**Figura 2. Análise de NMDS da diversidade genética de rizobactérias da 1ª e 2ª coletas determinadas por T-RFLP.** Os pontos verdes no gráfico referem-se aos tratamentos transgênicos, os azuis representam os isogênicos, os vermelhos representam os isogênicos tratados com inseticidas e os pontos pretos circunscritos de vermelhos referem-se às amostras de solo não rizosférico (controle).

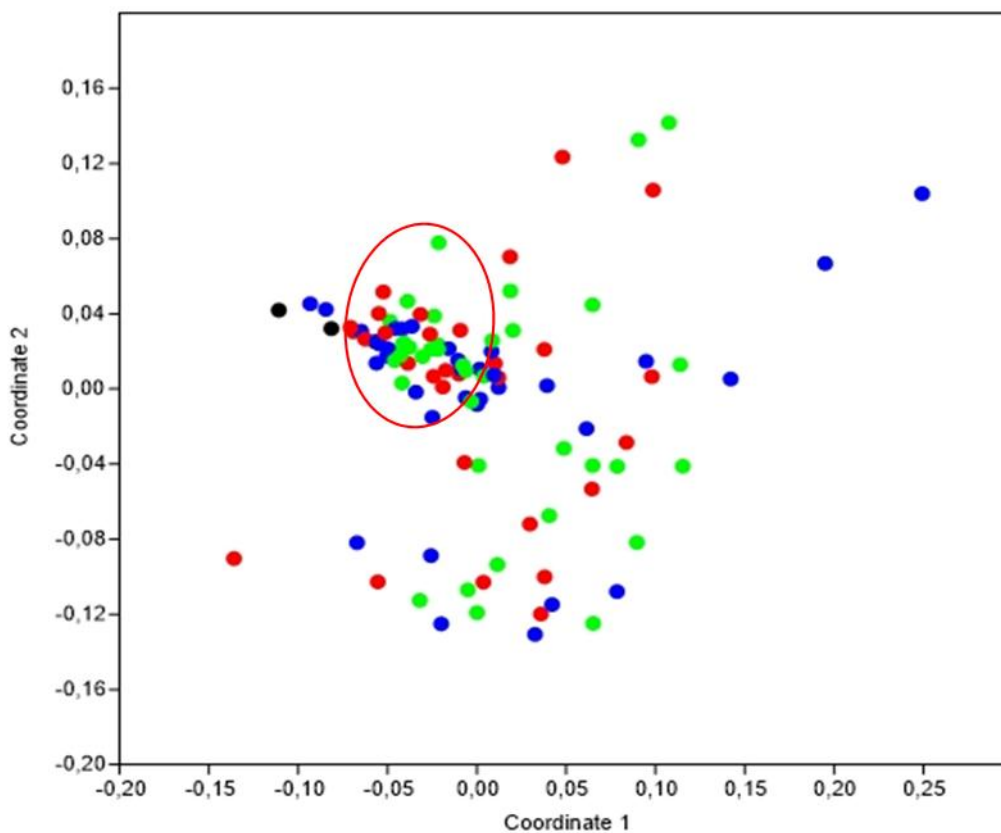
Fonte: Dados da pesquisa

Os pontos de ordenação não mostraram uma tendência no agrupamento das comunidades bacterianas, de acordo com os genótipos e períodos de coleta. Santos (2015), ao caracterizar através da técnica *DGGE*, a comunidade de rizobactérias associadas a eventos de milho transgênico *Bt*, *MON 810*, *Bt11*, *HERCULEX*, *MON 89034*, *MON 5* e *IMPACTO VIPTERA* cultivados em latossolo vermelho distrófico, tratados e não tratados com inseticidas químicos, não encontrou diferenças estruturais nas comunidades associadas aos eventos



transgênicos *Bt* independente dos genótipos. Entretanto neste mesmo estudo, Santos (2015) concluiu que o estágio de desenvolvimento da planta foi o fator mais expressivo na modulação dessas comunidades, pois os perfis de DGGE distinguiram-se entre a primeira (30 dias de cultivo) e a segunda (60 dias após o cultivo) coleta.

Para a comunidade de FMA foi verificada uma tendência de agrupamento baseada no período da coleta (Figura 3), mostrando a importância do estágio de desenvolvimento da planta na modulação da estrutura da comunidade de FMA. Estes resultados também foram encontrados por Garcia (2012), que mostrou que a colonização micorrízica não sofreu alteração pela cultura de milho *Bt YieldGard VTPRO 2*, quando comparado ao seu isogênico, a única alteração ocorrida foi relacionada ao período de coleta, que foi após 45 dias da germinação. Ambos os resultados podem ser explicados pelo fato da colonização micorrízica ser estabelecida normalmente aos 45 dias após a germinação do milho, logo 60 dias após a germinação (2ª coleta) a colonização já chegou ao seu ápice, diferenciando-a da 1ª coleta onde essa interação ainda não estava estabelecida (GARCIA, 2012; ANDRADE, 2013).



**Figura 3. Análise de NMSD da diversidade genética de FMA da 1ª e 2ª coletas determinadas por T-RFLP.** Os pontos verdes no gráfico referem-se aos tratamentos transgênicos, os azuis representam os isogênicos, os vermelhos representam os isogênicos tratados com inseticidas, os pontos circulados de vermelhos referem-se às amostras da primeira coleta e os pontos pretos representam amostras de solo não rizosférico (controle).  
Fonte: Dados da pesquisa

Já entre os eventos transgênicos e seus respectivos isogênicos tratados e não tratados com inseticidas, neste trabalho não foi observada tendência de agrupamento, corroborando os resultados de Zeng *et al.*, (2014), que realizou estudo a fim de verificar se as proteínas Cry1Ab teriam capacidade de impactar a diversidade de FMA associadas a raízes de milho *Bt* a longo prazo. Para isso ele utilizou a técnica de T-RFLP analisando o gene 28S rRNA da comunidade rizosférica associadas aos eventos transgênicos e seus isogênicos durante cinco safras de cultivo consecutivas. No estudo de Zeng *et al.*, (2014) também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para a diversidade de FMA.

De forma geral os pontos de ordenação não mostraram uma tendência no agrupamento entre as comunidades bacterianas e de FMA dos genótipos de milho transgênico e convencional em consonância com outros estudos (BECKER *et al.*, 2014; ZENG *et al.*, 2014; CHEEKE *et al.*, 2015), o que é bastante positivo visto que, do ponto de vista da biossegurança, os eventos transgênicos não podem diferir de seus isogênicos na modulação da comunidade microbiana.

## **CONCLUSÃO**

Com o estudo realizado pode-se verificar que para a comunidade de rizobactérias só houve diferença significativa de agrupamento em relação ao solo rizosférico em comparação com o solo não-rizosférico e que utilização de uma técnica dependente de cultivo associada a uma independente de cultivo foi de grande relevância, pois uma corroborou a outra. Em contrapartida, pôde-se também inferir que o estágio de desenvolvimento das plantas foi o fator de maior influência na estruturação e organização das comunidades de fungos micorrízicos arbusculares presentes em genótipos de milho convencional e transgênico. Para resultados mais consistentes, o ideal é que este estudo seja mantido por mais safras, a fim de observar se a longo prazo o milho *Bt* pode impactar essas comunidades microbianas associadas à rizosfera.

## **REFERÊNCIAS**

ABREU, C. S. *Seleção e caracterização de bactérias endofíticas isoladas de plantas de milho com potencial para a bissolubilização de rochas fosfáticas*. 2014. f.47. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias área de Microbiologia e Bioquímica do Solo) - Curso de pós-graduação em Ciências Agrárias. UFSJ. Universidade Federal de São João del Rei. Sete Lagoas.

AGUIRRE, L. A.; HERNANDEZ, A.; FLORES, M.; FRIAS, G. A.; CERNA, E.; LANDEROS, J. Genetically modified maize resistant to corn earworm (*Lepidoptera: Noctuidae*) in Sinaloa, Mexico. *Florida Entomologist*. v. 98, n. 3, p.821-827, 2015.

ANDRADE, P. A. M. *A composição de comunidade bacteriana do solo como fator determinante na micorrização de cana-de-açúcar do Glomus clarum*. 2013. f.73. Dissertação (Mestrado em Ciências – área de Solos e Nutrição de Plantas) – Curso de pós-graduação em Ciências. USP. Universidade de São Paulo. Piracicaba.

BATISTA, B. D. *Promoção de crescimento em milho (Zea mays L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (Paullinia cupana var. sorbilis)*. 2012. f.129. Dissertação (Mestrado em Ciências – área de Genética e Melhoramento de Plantas) - Curso de pós-graduação em Ciências. USP. Universidade de São Paulo. Piracicaba.

BECKER, R.; BUBNER, B.; REMUS, R.; WIRTH, S.; ULRICH, A. Impact of multi-resistant transgenic Bt maize on straw decomposition and the involved microbial communities. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v.73, p.9-18, 2014.

BERNARDI, D.; SALMERON, E.; HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, O.; DOURADO, P. M.; CARVALHO, R. A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P.; OMOTO, C. Cross-resistance between cry1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided Bt maize hybrids in Brazil. *Plos One*. Tennessee, v.10, p. 1-15, 2016.

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

CÉLERES. *Informativo Biotecnologia*. Céleres. Uberlândia. IB16.01, 2016.

CHEEKE, T. E.; SCHUTTE, U. M.; HEMMERICH, C. M.; CRUZAN, M. B.; ROSENSTIEL, T. N.; BEVER, J. D. Spatial soil heterogeneity has a greater effect on symbiotic arbuscular mycorrhizal fungal communities and plant growth than genetic modification with *Bacillus thuringiensis* toxin genes. *Molecular Ecology*, Oxford, v.24, p.2580-2593, 2015.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. *Acompanhamento da safra brasileira: Grãos*. Conab. Brasília, v.3, n.7, p.1-158, 2016

CORDEIRO, M. A. S.; CORÁ, J. E.; NAHAS, E. Atributos bioquímicos e químicos do solo rizosférico e não rizosférico de culturas em rotação no sistema de semeadura direta. *R. Bras. Ci. Solo*, v.36, p. 1794-1803, 2012.

CRUZ, I.; VALICENTE, F. H.; VIANA, P. A.; MENDES, S. M. *Risco potencial das pragas de milho e de sorgo no Brasil*. Documentos: Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas, n.150, 2013.

CULMAN, S. W.; BUKOWSKI, R.; GAUCH, H. G.; CADILLO-QUIROZ, H.; BUCKLEY, D. H. T-REX: Software for the processing and analysis of T-RFLP data. *BMC Bioinformatics*, v.10, p.171-180, 2009.

FACTORI, M. A.; COSTA, C.; MEIRELLES, P. R. L.; SILVA, P. R. A.; SEKI, A. S.; SILVA, M. G. B. Demanda energética na colheita de híbridos de milho para silagem em função do estágio de maturidade e tamanho de partícula. *Bioscience Journal*. Uberlândia, v.30, n.2, p.363-371, 2014.

FARIA, T. M. *Efeitos alelopáticos do sorgo, milheto e soja, como cobertura vegetal, sobre a emergência, micorrização, atividade microbiana e crescimento inicial de milho, soja e feijão*. 2009. f.103. Dissertação (Mestrado em Agronomia – área de Sistema de Produção) Curso de pós-graduação em Agronomia. UNESP. Universidade Estadual Paulista. Ilha Solteira.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. *Ciências e Agrotecnologia*, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FLORES, S. W. S. *Composição e funcionalidade do microbioma da rizosfera de feijão selvagem e cultivado*. 2015. f.150. Dissertação (Mestrado em Ciências – área de Microbiologia Agrícola) – Curso de pós-graduação em Ciências. USP. Universidade de São Paulo. Piracicaba.

GARCIA, G. V. *Comunidade microbiana da rizosfera do milho Bt. YieldGard VTPRO 2*. 2012. f.34. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Curso de pós-graduação em Agronomia. UEL. Universidade Estadual de Londrina. Londrina.

GARLAND, J. L.; MILLS, A. L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level solo-carbon source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, p.2351-2359, 1991.

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

GOMES, E. A.; LANA, U. G. P.; SILVA, L. F.; OLIVEIRA, C. A.; SILVA, U. C.; MARRIEL, I. E. Análise da Diversidade de Comunidades Microbianas na Rizosfera de Genótipos de Sorgo Contrastantes quanto à Tolerância ao Alumínio. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, v.94, p.1-28, 2014.

GSCHWENDTNER, S.; LEBERECHE, M.; ENGEL, M.; KUBLIK, S.; DANNENMANN, M.; POLLE, A.; SCHLOTTER, M. Effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> on microbial community structure at the plant-soil interface of young beech trees (*Fagus sylvatica* L.) grown at two sites with contrasting climatic conditions. *Microb Ecol*, New York, v.69, p.867–878, 2015.

GUIMARÃES, A. A. *Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho para diferentes safras, espaçamentos e populações de plantas*. 2013. f.66. Dissertação (Mestrado em Agronomia – área de Sistemas de Produção) – Curso de pós-graduação em Agronomia. UNESP. Universidade Estadual Paulista. Ilha Solteira.

GUMIERE, T. *Biogeografia de comunidades fúngicas em áreas cultivadas em cana-de-açúcar*. 2012. f.75. Dissertação (Mestrado em Ciências – área de Solos e Nutrição de Plantas) Curso de pós-graduação em Ciências. USP. Universidade de São Paulo. Piracicaba.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. *PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis*. Version. 1.37. Disponível em: <[http://palaeo-eletronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-eletronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)>. Acesso em: 28.03.2016.

LA MONTAGNE, M. G.; MICHEL, JR.; HOLDEN, P. A.; e REDDY, C. A. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v.49 p.255–264, 2002.

MACEDO, H. S. *Comunidades bacterianas em solos de mata nativa e cultivados com cana-de-açúcar*. 2012. f. 78. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias – área de Microbiologia Agropecuária) – Curso de pós-graduação em Ciências Agrárias e Veterinárias. UNESP. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal.

MARTIN-LAURENT, F.; PHILIPPOT, L.; HALLET, S.; CHAUSSOD, R.; GERMON, J. C.; SOULAS, G.; e CATROUX, G. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiology*. v.67 p.2354-2359, 2001.

NAIS, J. *Infestação de Spodoptera frugiperda e Helicoverpa zea (Lepidoptera: Noctuidae) em híbridos comerciais de milho (Zea mays L.)*. 2012. f. 70. Tese. (Doutorado em Agronomia – área de Entomologia Agrícola) – Curso de pós-graduação em Agronomia. UNESP. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal.

PASSARINI, M. R. Z. *Caracterização da diversidade de fungos filamentosos associados a esponjas marinhas e avaliação da produção de lacase*. 2012. f. 127. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular – área de Genética de Micro-organismos) – Curso de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular. UNICAMP. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

PINHEIRO, D. H. *Interação de proteínas CryIA com as vesículas da borda escovada da membrana apical (BBMVs) do intestino médio de Spodoptera frugiperda e Diatraea saccharalis e avaliação do tempo de cultivo sobre a produção de  $\beta$ -exotoxina em isolados de Bacillus thuringiensis*. 2013. f.134. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal - área de Biologia Molecular) - Curso de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal. UFLA. Universidade Federal de Lavras. Lavras.

PRAKASH, O.; PANDEY, P. K.; KULKARNI, G. J.; MAHALE, K. N.; SHOUCHE, Y. S. Technicalities and glitches of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP). *Indian J Microbiol*, v.54, p.255–261, 2014.

REPKE, R. A. *Eficiência da Azospirillum brasilense n fixação de nitrogênio em milho*. 2013. f.57. Dissertação (Mestrado em Agronomia – área de agricultura) – Curso de pós-graduação em Ciências Agrônômica. UNESP. Universidade Estadual Paulista. Botucatu.

ROSA, M. M. *Avaliação de diferentes metodologias para extração de DNA de solo sob cultivo de cana-de-açúcar*. 2006. f. 86. (Mestrado em Ciências Biológicas – área de Microbiologia Aplicada) –Curso de pós-graduação em Ciências Biológicas. UNESP. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro.

SANTANA, R. S. M. *Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de Baccharis dracunculifolia, com e sem galha causada por Baccharopelma dracuncufoliae*. 2013. f. 72. Dissertação (Mestrado em Genética) – Curso de pós-graduação em Genética. UFMG. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

SANTOS, F. A. G. *Caracterização das comunidades bacterianas associadas à rizosfera de milho geneticamente modificado expressando proteínas Bt*. 2015. f.49. Monografia (Bacharelado em Biotecnologia). FVC. Faculdade Ciências da Vida. Sete Lagoas.

SILVA, L. F. *Diversidade microbiana na Rizosfera de Genótipos de milho transgênico expressando o gene SbmMATE cultivados sob níveis contrastantes de saturação de alumínio*. 2015. f.45. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Curso de pós-graduação em Bioengenharia. UFSJ. Universidade Federal de São João Del-Rei. São João Del Rei.

SILVA, P. G. *Eficiência e diversidade molecular de fungos e bactérias mineralizadores de fitato isolados da rizosfera de linhagens de milho*. 2008. f.44. Dissertação (Mestrado em Agronomia – área de Biotecnologia Vegetal) – Curso de pós-graduação em Agronomia. UFLA. Universidade Federal de Lavras. Lavras.

SOUSA, M. K. U. *Comportamento diferencial de indicadores biológicos do solo após implantação de uma floresta mista de espécies nativas e eucalipto no semi-árido de Minas Gerais*. 2005. f. 50. Dissertação (Mestrado Biologia Vegetal – área de Fisiologia Vegetal e Ecologia) Curso de pós-graduação em Biologia Vegetal. UFMG. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

SOUZA, E. D. Desenvolvimento inicial de milho crioulo em um latossolo vermelho de cerrado submetido à esterilização. *Global Science and Technology*. Rio Verde, v.05, n.02, p.69-78, 2012.

SOUZA, R. A. *Impacto da soja transgênica imidazolinonas e do manejo em herbicidas na comunidade microbiana do solo*. 2012. f.79. Tese (Doutorado em Agronomia) – Curso de pós-graduação em Agronomia. UEL. Universidade Estadual de Londrina. Londrina.

TIPAYNOA, S.; KIMB, C.; TONGMIN, S. A. A. T-RFLP analysis of structural changes in soil bacterial communities in response to metal and metalloid contamination and initial phytoremediation. *Applied Soil Ecology*, v.6, p.1137-146, 2012.

TROUVELOT, S.; VAN TUINEN, D.; HIJRI, M.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence *in situ* hybridization. *Mycorrhiza*, Amsterdam, v.8 p.203-206, 1999.

USDA - United States Department of Agriculture. *World agricultural supply and demand estimates*. Wasde, n.559, 2016.

VAN TUINEN, D.; JACQUOT, E.ZHAO, B. GOLLOTTE, A. GIANINAZZIPEARSON, V. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology*, v.7, p.879-887, 1998.

VERBRUGGEN, E.; KURAMAE, E. E.; HILLEKENS, R.; HOLLANDER, M.; KIERS, E. T.; RÖLING, W F. M.; KOWALCHUK, G. A.; VAN DER HEIJDEN, M. G. A. Testing Potential Effects of Maize Expressing the *Bacillus thuringiensis* Endotoxin (Bt Maize) on Mycorrhizal Fungal Communities via DNACry1Ab and RNA-Based Pyrosequencing and Molecular Fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, v.78, p. 7384-7392, 2012.

VIANA, A. A. O. N. *Diversidade Funcional, genética e estrutural de micro-organismos do solo após 13 anos de aplicações anuais de lodo de esgoto sob cultura de milho*. 2013. f.88. Tese (Doutorado em Agronomia – área de Ciência do Solo) Curso de pós-graduação em Agronomia. UNESP. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal.

VILELA, L. A. F.; RIBEIRO, D. O.; SANTOS, F. L.; FERREIRA, D. A.; CARNEIRO, M. A. C.; ASSUNÇÃO, H. F.; PAULINO, H. B.; SOUZA, E. D. Desenvolvimento inicial de milho crioulo em um latossolo vermelho de cerrado submetido à esterilização. *Global Science And Technology*. Rio Verde, v. 05, n. 02, p. 69 – 78, 2012.

VIROLI, S. L. M.; VIEIRA, J. T. F.; SOUSA, L. M. C. Produção e análise de cerveja artesanal a base de milho. *Journal of Bioenergy and Food Science*. Macapá, v.1, n. 3, p.87-89, 2014

ZAK, J. C.; WILLIG, M.R.; MORRHEAD, D. L.; WILDMAN, H.G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.26, p.1101-1108,1994.

ZENG, H.; TAN, F.; ZHANG, Y.; FENG, Y.; SHU, Y.; WANG, J. Effects of cultivation and return of *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize or the diversity of the arbuscular mycorrhizal community in soils and roots of subsequently cultivated conventional maize. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.75, p. 254-263, 2014.