

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANATOMIA E MORFOLOGIA DE PLANTAS DE MILHO COM
DIFERENTES NÚMEROS DE ALELOS TRANSGÊNICOS**

Naiara Scarabeli Zancanari
Engenheira Agrônoma

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANATOMIA E MORFOLOGIA DE PLANTAS DE MILHO COM
DIFERENTES NÚMEROS DE ALELOS TRANSGÊNICOS**

Discente: Naiara Scarabeli Zancanari

Orientadora: Dra. Fabíola Vitti Môro

Coorientador: Dr. Gustavo Vitti Môro

Coorientador: Dr. Eduardo Custódio Gasparino

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)

2019

Z27a

Zancanari, Naiara Scarabeli

Anatomia e morfologia de plantas de milho com diferentes números de alelos transgênicos / Naiara Scarabeli Zancanari. -- Jaboticabal, 2019

64 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Fabiola Vitti Môro

Coorientador: Gustavo Vitti Môro

1. Efeitos não intencionais. 2. Transgenia em homozigose. 3. Transgenia em hemizigose. 4. Zea mays. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ANATOMIA E MORFOLOGIA DE PLANTAS DE MILHO COM DIFERENTES NÚMEROS DE ALELOS TRANSGÊNICOS

AUTORA: NAIARA SCARABELI ZANCANARI

ORIENTADORA: FABIOLA VITTI MÔRO

COORDENADOR: GUSTAVO VITTI MÔRO

COORDENADOR: EDUARDO CUSTODIO GASPARINO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. GUSTAVO VITTI MÔRO

Departamento de Produção Vegetal (Fitotecnia) / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. JOÃO ANTONIO DA COSTA ANDRADE

Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira


Pesquisadora Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO

IAC - Centro de Cana / Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 02 de agosto de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

NAIARA SCARABELI ZANCANARI – Nascida em 08 de janeiro de 1992 em Santa fé do Sul – São Paulo. É filha de Edson Carlos Zancanari e Ilaide Scarabeli Zancanari. Em 2012 entrou para o curso de Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual Paulista, Campus de Ilha Solteira - SP, onde teve o primeiro contato com a área melhoramento genético de plantas por meio do exemplo e ensinamentos do Prof. Dr. João Antonio da Costa Andrade no grupo de GMGM. Ainda durante a graduação participou do grupo “Estudo das relações entre a cobertura vegetal e as características edáficas e biológicas do solo”, sob responsabilidade da Prof. Dr^a. Ana Maria Rodrigues Cassiolato, que resultou no trabalho de conclusão de curso “Atributos químicos e biológicos de um subsolo exposto quatro anos após inoculação de microrganismos e adição de resíduos no Cerrado”. Durante o período de agosto a dezembro de 2016 foi estagiária na empresa Vilmorin do Brasil onde participou das atividades no programa de melhoramento de hortaliças. No ano seguinte concluiu a graduação e obteve o grau de Engenheira agrônoma e, em agosto ingressou no curso de mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento e Plantas) na Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal – SP , com auxílio financeiro da CAPES, sob orientação da Prof. Dr^a Fabíola Vitti Môro e co-orientação dos Prof. Dr. Gustavo Vitti Môro e Prof. Dr. Eduardo Custódio Gasparino.

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais essa existência, pela luz que me conduz, pela força com que me sustenta, pela sabedoria e discernimento.

Aos meus pais Edson Carlos Zancanari e Ilaide Scarabeli Zancanari pela dedicação, incentivo, paciência, amor e confiança.

À minha irmã Natalia Scarabeli Zancanari pelos conselhos, amizade e exemplo de força e perseverança.

Ao meu namorado Leonardo Miranda pelo companheirismo, paciência e amor em mais uma etapa da nossa história.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a. Fabiola Vitti Môro e coorientadores Gustavo Vitti Môro e Eduardo Custódio Gasparino pelos ensinamentos, pela convivência e pelo exemplo profissional.

Aos Professores do Programa de Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas pelo empenho e dedicação na transmissão do conhecimento e construção de profissionais.

Aos técnicos e funcionários da FCAV pela colaboração na execução das atividades, sem os quais não seria possível a conclusão das mesmas.

Aos membros da banca pela disposição, presença e contribuições neste trabalho.

Aos amigos que fiz em Jaboticabal, mas principalmente aos membros do grupo NEGEMM Camila, Élcio, Flávia, Kevyn, Kian, Lucas, Lucélia, Luís, Marcela, Marco e Sophia onde foi aprendido além do aspecto intelectual o significado de amizade.

A Elba, sem a qual as atividades seriam mais difíceis e menos divertidas.

Às empresas Corteva e Syngenta pela parceria, apoio e desenvolvimento deste trabalho.

Ao apoio para a realização deste trabalho pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Constituição anatômica	2
2.2 A cultura do milho	5
2.3 Milho transgênico	7
3. OBJETIVO GERAL	9
4. REFERÊNCIAS	9
CAPÍTULO 2 - Influência da zigosidade do evento TC1507 x MON89034 x NK603 na anatomia e morfologia de híbridos de milho	14
RESUMO	14
1. Introdução	15
2. Material e Métodos	16
2.1 Genótipos	16
2.2 Coleta de partes vegetativas	16
2.3 Caracteres avaliados	17
2.3.1 Massa fresca e massa seca de raiz	17
2.3.2 Morfologia de raiz	17
2.3.3 Anatomia de raiz, colmo e folha	17
2.4 Análise estatística	19
3. Resultados	20
4. Discussão	25
5. Conclusão	28
6. Referências	28
CAPÍTULO 3: Impacto da zigosidade de diferentes eventos transgênicos na anatomia, morfologia e fertilidade masculina de híbridos de milho	31
RESUMO	31
1. Introdução	32
2. Material e Métodos	33
2.1 Genótipos	33
2.2 Experimento em casa de vegetação	33

2.3 Coleta de partes vegetativas	34
2.4 Características avaliadas	34
2.4.1 Massa fresca e massa seca de raiz	34
2.4.2 Morfologia de raiz	34
2.4.3 Anatomia de raiz, colmo e folha	35
2.5 Estudo do pólen	37
2.5.1 Viabilidade do grão de pólen.....	37
2.5.2 Germinação do grão de pólen	37
2.6 Análises estatísticas	38
3. Resultados	38
4. Discussão.....	44
5. Conclusão	48
6. Referências	48
Apêndices	52
Apêndice A: Anatomia de colmo.....	52
Apêndice B: Anatomia de folha	56
Apêndice C: Anatomia de raiz.....	61

ANATOMIA E MORFOLOGIA DE PLANTAS DE MILHO COM DIFERENTES NÚMEROS DE ALELOS TRANSGÊNICOS

RESUMO - Comercialmente os híbridos de milho transgênico são hemizigotos para o evento que os define, ou seja, das linhagens parentais cruzadas, uma é transgênica e a outra convencional. No entanto, híbridos homozigotos também podem ser obtidos pelo do cruzamento de duas linhagens parentais transgênicas. Assim, uma vez que a influência de genes exógenos é pouco conhecida na morfologia, anatomia e fertilidade masculina de híbridos de milho, buscamos com esse trabalho verificar a influência do número de alelos transgênicos nestes caracteres. Foram utilizados cinco diferentes híbridos com o mesmo evento (TC1507xMON89034xNK603) e o isogênico convencional de um deles, além de um híbrido com três diferentes eventos (Bt11, MIR162 e a piramidação de ambos) e seu isogênico convencional. Totalizando 18 tratamentos, que foram conduzidos em casa de vegetação, elaborado em delineamento de blocos casualizados com duas repetições. Quando as plantas estavam em V3-V4 duas delas foram extraídas para avaliação dos caracteres anatômicos do colmo, as restantes foram conduzidas até V5-V6 e avaliados os caracteres anatômicos da folha e raiz, morfológicos da raiz, matéria fresca e matéria seca. Para a avaliação dos caracteres de fertilidade masculina foram instalados em campo o híbrido com os três diferentes eventos, com cinco repetições e utilizadas três plantas como parcela útil. No terceiro dia após a antese a viabilidade e a germinação desses grãos de pólen foram avaliados. Todos os híbridos foram diferentes quanto aos caracteres anatômicos, os componentes morfológicos e a viabilidade do grão de pólen diferiu somente os híbridos que apresentavam a mesma base genética. Quanto aos cinco híbridos com a mesma transgenia e base genética diferentes, não houve um padrão com que as alterações ocorriam, o que não permitiu com que fossem atribuídas aos alelos transgênicos. Nos híbridos com a mesma base genética, mas com eventos distintos, pode-se notar uma tendência de efeitos reducionais nos caracteres anatômicos para os eventos Bt11 e Vip quando em homozigose, no entanto, a homozigose do evento Vip3 favorece os caracteres anatômicos, mas reduzia a viabilidade. Assim, pode-se afirmar que ocorrem alterações quando a transgenia é inserida e quanto a dose de alelos presentes. No entanto, não se pode atribuí-las a influência direta dos genes exógenos.

Palavras-chaves: anatomia, hemizigoto, homozigoto, milho Bt, morfologia, *Zea mays*.

ANATOMY AND MORPHOLOGY OF CORN PLANTS WITH DIFFERENT NUMBERS OF TRANSGENIC ALLELES

ABSTRACT - Commercially the transgenic maize hybrids are hemizygous for the event that defines them, that is, for crossed parental lines, one is transgenic and the other conventional. However, homozygous hybrids can also be obtained by crossing two transgenic parent lines. Thus, since the influence of exogenous genes is not well known in the morphology, anatomy and male fertility of maize hybrids, we seek to evaluate the influence of the number of transgenic alleles in these traits. Five different hybrids were used with the same event (TC1507xMON89034xNK603) and the conventional isogenic of one of them, besides a hybrid with three different events (Bt11, MIR162 and pyramidation of both and its conventional isogenic. Totaling 18 treatments, they were conducted in greenhouse, elaborated in a randomized complete block design with two replicates. When the plants were in V3-V4, two of them were extracted to evaluate the anatomical traits of the stem, the remaining were conducted to V5-V6 then evaluated the anatomical traits of leaf and root and morphology of root, fresh matter and dry matter. For the evaluation of the male fertility traits, the hybrids with three events different, were installed in the field, with five replications and three plants were used as a useful plot. On the third day after the anthesis the viability and germination of these grains were evaluated. All hybrids were different in the anatomical traits, the morphological components and the viability of the pollen grain differed only in the hybrids that had the same genetic base. For the five hybrids with the same transgenic and different genetic base, there was no pattern for the occurred alterations, which did not allow them to be attributed to the transgenic alleles. For hybrids with the same genetic basis, but with distinct events, we can notice a tendency of reduction effects in the anatomical traits for the Bt11 and Vip events when in homozygosis, however, the homozygosis of the Vip3 event favored the anatomical traits, but reduced the viability. Thus, it can be affirmed that changes occur when the transgene is inserted and as for the dose of alleles present. However, they cannot be attributed to the direct influence of the exogenous genes.

Keywords: anatomical, homozygous. Hemizygous, Bt maize, morphological, *Zea mays*.

CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

A adoção da tecnologia transgênica é crescente desde a sua liberação. Quando comparado somente o ano 2017 com o anterior houve aumento de 3% em relação aos eventos que combinavam resistência a insetos e tolerância a herbicidas, o que em área correspondeu a 41% (ISAAA,2017).

Das transgenias desenvolvidas, as que promovem o controle de pragas são as mais difundidas e responsáveis por sintetizarem proteínas Bt (Sanahuja et. al., 2011; Pardo-López et al., 2013). As proteínas inseticidas são sintetizadas durante a fase de esporulação de estirpes da bactéria *Bacillus thuringiensis*, apresentam ação entomotóxica e aspecto de cristais. Por isso são conhecidas como proteínas cristais (cry) que são expressadas em plantas, como no milho, por meio da técnica do DNA recombinante e então, são popularmente conhecidas como plantas Bt (Bravo et al., 2007).

Inicialmente, a maioria das culturas transgênicas apresentavam somente um gene exógeno que conferia resistência a pragas chaves. No entanto, com a evolução da resistência, a estratégia aplicada foi a piramidação, onde mais de um gene é introduzido, o qual confere resistência a mesma praga, mas sintetiza diferentes proteínas (Siebert, 2012). As proteínas Bt utilizadas no controle de lepidópteros praga em culturas transgênicas podem ser divididas em três categorias: Cry1 que engloba os genes Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F e Cry1A.105; Cry2 que engloba Cry2Ab2 e Cry2Ae; e Vip3A (Niu et. al., 2014; Yang et. al. 2016; Yang et. al. 2017). Atualmente, o desenvolvimento de híbridos de milho apresenta estes eventos piramidados: Cry1F+Cry1Ab, Cry1A.105+Cry2Ab2, Cry1Ab+Vip3Aa20 e Cry1F+Cry1A.105+Cry2Ab2 (Cruz et al. 2015).

Os híbridos que estão disponíveis no mercado, quando transgênicos trazem em sua constituição apenas um alelo exógeno, que o configura como hemizigoto, em razão de no processo para sua obtenção serem cruzadas linhagens em que apenas uma delas é transgênica (Guadagnuolo et al., 2006). Híbridos transgênicos homozigotos também podem ser sintetizados a partir de duas linhagens detentoras da transgenia.

Há uma nova linha de indagação quanto a ocorrência de efeitos não intencionais, inesperados e descontrolados que possam ocorrer nos genótipos transgênicos (Balsamo et al., 2011). Com isso, métodos mais usuais para identificação da equivalência entre os organismos transgênicos e seu isogênico convencional estão em nível de genes, transcritos, proteínas e metabólitos (Rischer e Oksman-Caldentey, 2006). No entanto, caracteres anatômicos, morfológicos e de fertilidade também são ferramentas eficientes que possibilitam a identificação de tais efeitos. Em razão das conexões entre as múltiplas reações que ocorrem nas rotas metabólicas, a alteração de uma única enzima pode refletir e influenciar o desempenho de inúmeras vias (Nielsen e Oliver, 2005) e consequentemente em alguma estrutura do organismo, bem como as integrações aleatórias do transgene (Cellini et al., 2004). Os métodos utilizados do melhoramento convencional também podem ser os responsáveis por gerarem dissimilaridade, como na hibridação, ocorrência de eventos mutantes e os retrocruzamentos (Barros et al., 2010).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Constituição anatômica

Classificada como uma gramínea tropical, o milho apresenta seu colmo no formato cilíndrico, atingindo em média 2m, possuindo nó e entrenó e quando cessa o estágio vegetativo, termina em uma inflorescência masculina (pendão). A cada nó acima do solo emergem as folhas com 90cm de comprimento e cerca de 7-9cm de largura, que quando cessado seu estado vegetativo, nas axilas, emerge a inflorescência feminina (espiga), marcando o estágio reprodutivo. Abaixo do solo, dos nós emergem raízes do tipo fasciculado, característico das gramíneas (Fornasieri Filho, 2007).

Com o intuito de melhor acompanhar o desenvolvimento da cultura Ritchie e Hanway (1989) propuseram o estabelecimento de estádios fenológicos, sendo: VE: emergência; V1 planta com a primeira folha completamente expandida; V2: planta com a segunda folha completamente expandida; Vn: planta com a folha n completamente expandida; VT: emissão da inflorescência masculina – pendão; R1: emissão da inflorescência feminina – espiga; R2: grãos bolha d'água; R3: grãos leitosos; R4: grãos pastosos; R5: definição dente e R6: maturidade fisiológica. Os

autores enfatizam o estágio V3 e V5 como marcantes, sendo que o primeiro é crucial para o sucesso da cultura, pois é neste que ocorre a formação de todas as folhas e espigas que a planta terá. O segundo trata-se do surgimento de todas as folhas e espigas, mesmo que microscopicamente como o pendão. No entanto, o período crítico para o preenchimento da espiga se estabelece entre V10-V17, quando são estabelecidos o tamanho da espiga e número de óvulos, que implicará na produtividade.

O colmo basicamente serve para condução e suporte e nas gramíneas, de um modo geral, apresenta, de uma maneira bem definida, os três tecidos: epidérmico, fundamental e vascular. O tecido parenquimático presente no colmo compreende como fundamental, abrigando cloroplastos, amiloplastos, cristais e inúmeros compostos secretados (Apezato-da-Glória e Carmello-Guerreiro, 2006). Os feixes vasculares ficam dispersos (ESAU, 2013), denominando esse padrão como atactostele, (Ferri, 1999). Quanto às dimensões, é predominante na região central os feixes mais robustos, enquanto que aqueles menos pronunciados ficam voltados para o perímetro (Ferri, 1999). Nestes é encontrado o xilema voltado para o centro, enquanto que o floema está mais externamente (Raven et al., 2003).

Emergindo como expansão lateral do colmo, a folha tem seus constituintes voltados para desempenhar as funções de respiração e fotossíntese, principalmente. No limbo, basicamente estão presentes epiderme, parênquima e tecidos condutores. A epiderme consiste numa camada de células de revestimento do organismo que, em órgãos aéreos da planta, atua como uma barreira minimizadora da perda de água e choque mecânicos, facilitadora de trocas gasosas e reserva de água e metabólitos. Complementar aos demais órgãos e tecidos, no mesófilo há o parênquima, cuja principal função é o preenchimento dos espaços deixados entre os outros tecidos, além de atuar como abrigo das principais atividades para a sobrevivência do vegetal como a respiração, armazenamento, secreção, excreção e fotossíntese. Esta última é desempenhada pela presença de cloroplastos dispersos (Ferri, 1999). Os vasos condutores além de atuarem distribuindo o conteúdo nutritivo, apresentam a função de sustentação da mesma, afim de maximizar a recepção dos raios solares e consequentemente a efetivação da fotossíntese, cuja disposição se caracteriza no xilema voltado para a epiderme adaxial e o floema para a abaxial (Ferri, 1999). Apresentando o metabolismo fotossintético mais eficiente, o milho é uma planta do tipo C4, resultando em altas taxas de conversão da luz captada em produção de

fotoassimilados e conseqüentemente, seus derivados (Nascimento-Júnior et al., 2015).

A fixação da planta no solo e absorção dos nutrientes é função desempenhada pela raiz. Sua estrutura mais externa é formada por camadas de epiderme, enquanto que a interna é composta pelo cilindro central, onde estão presentes elementos condutores, fibras e parênquima. A endoderme é a camada de células que permite separar os limites da casca e do cilindro central, cuja função é a de não permitir a passagem de metabolitos entre essas duas estruturas (Ferri, 1999) e também como barreira contra patógenos (Dalla Vecchia et al., 1999). O córtex ocupa grande espaço nas regiões internas das raízes, podendo muitas vezes apresentar lignificações. Neste sentido, permite o transporte de substâncias entre protoplastos por meio dos plasmodesmas como via parede celular (Raven et al., 2003), Insausti et al. (2001) apresentam a importância das dimensões da espessura do córtex para a difusão dos gases e conseqüentemente uma melhor adaptação em ambientes com excesso hídrico. Souza et al. (2016) reporta que as maiores áreas de vasos do xilema permitem aumento da capacidade do fluxo de água devido a condutividade hidráulica dos mesmos. Nesse mesmo sentido ocorre com os vasos do floema, o aumento em sua espessura é resultado de adaptação da planta à condição de alagamento, afim de contribuir para facilitar o fluxo dos metabólitos (Pereira et al., 2008).

O início do florescimento é marcado por pronunciadas alterações, quando o meristema do colmo é inativado, passando a ser ápice reprodutivo (Raven et al., 2003). A fertilização ocorre quando é firmado o contato do grão de pólen com o estilo-estigma da espiga. Aqui o processo seguinte se dá com o desenvolvimento e crescimento do tubo polínico em direção ao óvulo, para fecunda-lo e então resultar na formação do grão (Ritchie e Hanway, 1989). Estabelecendo etapas, Kiesselbach (1949) sintetiza as fases que antecedem a formação dos grãos em três etapas. O primeiro deles é a iniciação e diferenciação das estruturas reprodutivas, flores masculinas (estaminadas) na inflorescência apical, flores femininas (pistiladas) lateralmente na terminação da espiga. Quando a planta atinge a maturidade das inflorescências se caracteriza o segundo estágio, onde os grãos de pólen são produzidos em grandes quantidades e o stigma se encontra receptivo para captar o pólen trazido pelo vento. Em média, o pendão produz 25 milhões de grãos de pólen, garantindo a polinização completa de espigas com tamanho padrão, cuja quantidade de óvulos presente se encontra entre 750 e 1000 (Ritchie e Hanway, 1989).

A germinação do grão só irá ocorrer a partir do momento em que este encontra os estilos-estigmas viáveis (Alvim, 2008). Nas gramíneas, viabilidade é perdida muito rapidamente em condições de armazenamento, sem que este afete a sua aparência externa, o que ocorre para outras espécies (Stanley e Linskens, 1974). Estes autores resumem a germinação in vitro como uma técnica que utiliza uma amostra e com auxílio de microscópio, é realizada a contagem de grãos de pólen que desenvolveram tubo polínico a partir de um período determinado. No intuito de simular as condições de germinação que ocorrem na planta, Bhonjwani e Bhatnagar (1974) afirmam que a adição do cálcio no meio de cultura utilizado na germinação do grão de pólen propicia maior estabilidade quanto a basicidade do meio, maior rigidez ao tubo polínico e linearidade no desenvolvimento do mesmo. Assim como ocorre com o boro, que em condições naturais é encontrado no estilo-estigma (Kavand et al., 2014).

As técnicas para estimar a viabilidade e germinação do grão de pólen são baseadas nos testes com corantes químicos, germinação in vitro e in vivo (Pio, 2004). O teste de viabilidade desenvolvido por Alexander (1969) que utiliza fucsina ácida e verde malaquita indica ser o mais seguro em função de colorir tanto os grãos viáveis como os inviáveis. Desse modo, quando viáveis coloram-se de roxo e verde quando inviáveis (Alvim, 2008).

2.2 A cultura do milho

Segundo a FAO (2016), o milho (*Zea mays*) é um dos cereais que constitui o tripé da dieta mundial, sendo eles o milho, arroz e trigo. Juntos compreendem pouco mais de 42% do suprimento calórico, favorecendo ainda cerca de 37% e 6% de proteínas e gorduras, respectivamente, da dieta. Quando dado o foco para países emergentes, como a Sul da África, esses três cereais passam a ser responsáveis pela metade do fornecimento de calorias.

Quanto a produção mundial de milho, o Brasil fica com a terceira colocação, atrás dos EUA e China, respectivamente (USDA, 2018). E destaque deve ser dado para sua diversidade de produtos que podem ser gerados tanto para a alimentação como para a indústria, incluindo amido, adoçante, óleo, bebidas, cola, álcool industrial e etanol combustível (Ranum et al., 2014).

Dados divulgado recentemente pela Conab (2019), mostram que a safra 2017/2018 apresentou produção de aproximadamente 81 mi t, produtividade de 5 mil

kg.ha⁻¹, área plantada de pouco mais de 17 milhões de ha, com destaque para a região centro-oeste como maior produtora. Tais dados implicam numa redução em todas as variáveis avaliadas devido principalmente ao déficit híbrido severo, além de os produtores enfrentarem a baixa expectativa de preço para a venda e como consequência, uma menor adoção de sementes detentoras de tecnologias, no intuito de reduzir os custos produção.

Extrapolando a massiva participação do milho na economia devido a sua destinação para alimentação de aves, suínos e bovinos, há de se destacar seu papel na rotação com outras culturas tão importantes quanto, como a soja e o algodão, agindo como agente retardante para alguns problemas fitossanitários relacionados á nematoides, mofo branco, entre outros, o qual resulta em um sistema agrícola mais sustentável, tanto no âmbito nacional como mundial (CIB, 2010).

As carências encontradas pelos produtos para atender as necessidades do mercado começaram a ser supridas com o advento dos métodos de melhoramento de plantas, cujo intuito principal era a expansão da produtividade e dos valores nutricionais, além das particularidades de valor comercial a cada cultura. Para isso, os métodos se baseiam no desenvolvimento de genótipos superiores, seleção e fixação destes (Moose e Mumm, 2008).

O princípio desenvolvido por Shull e East em 1909 para a construção do milho híbrido estabelece-se em autofecundações sucessivas para obtenção das linhagens puras e posterior cruzamento para explorar o vigor híbrido na geração F1. São necessárias 7 a 10 gerações de autofecundação para atingir a maior porção dos alelos em homozigose, implicando em menor vigor destas plantas. No entanto, o cruzamento entre as linhagens endogâmicas resulta em aumentos significativos na produtividade, feito conhecido como heterose (Guimarães, 2007).

Russell (1991) destaca que as altas produtividades obtidas não podem ser atribuídas somente á adoção do híbrido, mas também da difusão da adubação sintética, herbicidas químicos, além da mecanização do plantio e da colheita que os tornaram mais eficientes. Recentemente, também podemos atribuir uma parcela dos ganhos aos transgênicos.

2.3 Milho transgênico

Desde o início das primeiras culturas transgênicas no Brasil, a área cultivada passou de 1,7 mi de hectares em 1996 para 189,8 mi em 2017, dos quais o Brasil, como segundo maior produtor detém 26% (ISAAA, 2017). O país aprovou 69 eventos transgênicos sendo eles nas culturas do algodão, feijão, milho, soja, cana-de-açúcar e eucalipto (CTNBio, 2017). A safra 2016/2017 contou com pouco mais de 93% da área cultivada com as três principais culturas sendo transgênicas (Céleres, 2017). Em relação a área agrícola transgênica mundial, o Brasil representa 26% desta (189.8mi/ha), colocando-se no ranking como segunda maior área plantada, com destaque para soja, milho e algodão (ISAAA, 2017).

Os organismos transgênicos ou transformados geneticamente consistem ter em sua constituição genética um ou mais genes oriundos de outro organismo, que não de sua espécie. Na maioria das plantas, esses genes são responsáveis por conferir resistência a herbicidas, resistência a doenças, resistência á seca, ataque de insetos e aumentar a qualidade do produto (www.ctnbio.mcti.gov.br/processo-de-ogm).

Os principais veículos para transformação de plantas é a utilização da biobalística e *Agrobacterium tumefaciens*. Diniz (2011) destaca as particularidades dessa última, tratando-se de um dos métodos mais precisos, o qual a sequência exógena é inserida no genoma do vegetal em uma região previamente determinada. A capacidade de inserção da sequência desejada via plasmídeo da *A. tumefaciens* é devido sua capacidade infectiva natural, por possuir no plasmídeo Ti a região codificadora tumoral (Carneiro et al., 2009). Para fins biotecnológicos, a região que confere o tumor no plasmídeo é substituída pela a sequência de DNA de interesse, que apresenta em ambas extremidades regiões flangeadoras, para precisar a sua região de introdução, no entanto, rearranjos não são descartados.

Já o *Bacillus thuringiensis*, “Bt” como popularmente é conhecida a sequência que confere resistência a alguns insetos, tem sua origem no genoma de uma bactéria, Gram positiva e que sobrevive nos mais diversos ambientes, como solo, filoplano, resíduos de grãos, poeira, água, matéria vegetal e insetos. Sua particularidade se dá devido a produção de cristais proteicos na fase crítica de seu ciclo, denominada estacionária ou de esporulação (Carneiro 2009). Para o processo de transformação um genótipo mais responsivo a fase de formação de calus e regeneração é utilizado,

então para a transferência do transgene às linhagens elites do programa de melhoramento o retrocruzamento é o mecanismo mais comum (Carneiro et al., 2009).

Além da análise da sequência inserida, é considerado o número de cópias do transgene, região em que foi inserido, acúmulo e expressão da proteína e ainda, consequências esperadas e não esperadas da proteína funcional transgênica (Coll et al., 2008).

Predominantemente, os híbridos comerciais de milho transgênico são hemizigotos para o evento que o define, ou seja, apresentam em sua constituição apenas um alelo no locus transgênico. Isto se dá em função de no processo de obtenção do híbrido ser cruzada uma linhagem convencional (sem transgenia) e outra linhagem transgênica (homozigota para a transgenia). Consequentemente, a prole obtida terá um alelo transgênico e um alelo nulo, definindo-o como hemizigoto (Guadagnuolo et al., 2006).

Há uma dualidade quanto a questão de partição energética para a síntese de proteínas que são exógenas à natureza da planta, acreditando que pode haver influência em outras vias de síntese (Heidel et al., 2004) ou, como Purrington e Bergelson (1997) afirmam, a irrelevância de gasto energético na síntese de novas proteínas, em contraposição ao que ocorre nas bactérias. Neste mesmo raciocínio, outros autores propõem a busca mais aprofundada da fonte das diferenças inesperadas encontradas quando comparadas linhagens GM e sua isogênica convencional (Cellini et al. 2004). Coll et al. (2008) atribuem os efeitos não intencionais responsáveis pela dissimilaridade entre a variedade transgênica e sua isogênica convencional à maneira como o transgene foi introduzido. O evento MON810 avaliado por eles, teve o evento introduzido via retrocruzamento na variedade comercial Aristis (resultando em Aristis Bt), e ao final do processo de recuperação do genoma do material elite pode ocorrer que outras características do genitor doador da transgenia (transformado) tenha se mantido, resultando em divergências, como encontrado entre Aristis Bt / Aristis.

São inúmeros os trabalhos que comparam as variedades desenvolvidas por biotecnologia - transgênicos - com aquelas via melhoramento convencional, de modo a testar a estabilidade e a segurança da composição nutricional dos transgênicos (Cellini et al., 2004).

3. OBJETIVO GERAL

Verificar o custo energético da introdução do transgene em híbridos de milho, bem como a da zigosidade desses eventos, com ênfase nos caracteres anatômicos da folha, colmo e raiz, morfológicos da raiz e a capacidade de fertilização do grão de pólen.

4. REFERÊNCIAS

Alexander MP (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. **Stain Technology** 44:117-122.

Alvim PDO (2008) **Viabilidade e Conservação de grãos de pólen de milho**. 65 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - UFLA, Lavras.

Apezato-da-Glória B, Carmello-Guerreiro SM: Anatomia Vegetal (2006). Viçosa: UFV.438 p.

Balsamo GM, Cangahuala-Inocente GC, Bertoldo JB, Terenzi H, Arisi ACM (2011) Proteomic analysis of four Brazilian MON810 maize varieties and their four non-genetically-modified isogenic varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 59:11553–11559.

Barros E, Lezar S, Anttonen MJ, van Dijk JP, Rohlig RM, Kok EJ, Engel KH (2010) Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. **Plant Biotechnology Journal** 8:436-451.

Bhojwani SS, Bhatnagar SP: The Embryology of Angiosperms (1974) New Delhi. 264p.

Bravo A, Gill SS, Soberón M (2007) Mode of action Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potencial for insect control. **Toxicon** 49:423-435.

Carneiro AA, Guimarães CT, Valicente FH, Waquil JM, Vasconcelos MJV, Carneiro NP, Mendes SM (2009) **Milho Bt: Teoria e Prática da Produção de Plantas Transgênicas Resistentes a Insetos-Praga**. Circular Técnica EMBRAPA 135:1–26.

Cellini F, Chesson A et al. (2004) Unintended effects and their detection in genetically

modified crops. **Food and Chemical Toxicology** 42:1089–1125.

Céleres. 2º levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2016/2017.

CIB (2010) Milho: Tecnologia do campo á mesa. 16 p. (Conselho de Informações sobre Biotecnologia).

Coll A, Nadal A, Palaudemas M, Messeguer J, Melé E, Puigdoménech P, Pla M (2008) Lack of repeatable differential expression patterns between MON810 and comparable commercial varieties of maize. **Plant Molecular Biology** 68:105–117.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 5 - Safra 2017/18, n. 11 - Décimo Primeiro Levantamento, agosto/2018. Brasília: 2019, 148p.

Cruz JC, Pereira filho IA, Borghi E, Simão EP (2015) **Quatrocentas e sessenta e sete cultivares de milho estão disponíveis no mercado de sementes do Brasil para a safra 2015/16**. Sete Lagoas: Embrapa: CIP, 28p. (Embrapa-CIP. Documentos 184).

Dalla Vecchia F, Cuccato F, La Rocca N, Larcher W, Rascio N (1999) Endodermis-like sheaths in the submerged freshwater macrophyte *Ranunculus trichophyllus* Chaix. **Annals of Botany** 83:93-97.

Diniz RP (2011) **Adaptabilidade e estabilidade de híbridos de milho transgênicos respectivos isogênicos não transgênicos**. 53f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – UFLA.

Esau K: Anatomia das plantas com sementes (2013). São Paulo: Edgard Blücher. 296 p.

FAO (2016) Save and grow in practice: maize, rice and wheat. A guide to sustainable. Rome, 124 p.

Ferri MG: Botânica: morfologia interna das plantas (anatomia) (1999) São Paulo: Nobel, 112p.

Fornasieri Filho D: Manual da cultura do milho (2007). Jaboticabal: Funep. 574 p.

Guadagnuolo R, Clegg J, Ellstrand C (2006) Relative fitness of transgenic vs. non-transgenic maize x teosinte hybrids: a field evaluation. **Ecological Applications**

16:1967-1974.

Guimarães PDES (2007) **Desempenho de híbridos simples de milho (*Zea mays* L.) e correlação entre heterose e divergência genética entre as linhagens parentais**. 132 f. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) - IAC, Campinas.

Heidel AJ, Clarke JD, Antonovics J, Dong X (2004) Fitness costs of mutations affecting the systemic acquired resistance pathway in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics** 168:2197-2206.

Insausti P, Grimoldi AA, Chaneton EJ, Vasellati V (2001) Flooding induces a suite of adaptive plastic responses in the grass *Paspalum dilatatum*. **New Phytologist** 152:291-299.

ISAAA (2017) Global Status of Commercialized Biotech / GM Crops in 2017 : Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years. Ithaca, NY, 153 p (ISAAA *Brief* No.53) .

Kavand A, Ebadi A, Shuraki YD, Abdosi V (2014) Effect of calcium nitrate and boric acid on pollen germination of some date palm male cultivars. **European Journal of Experimental Biology** 4:10–14.

Kiesselbach TA (1949). The structure and reproduction of corn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 101 p.

Moose SP, Mumm RH (2008) Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement. **Plant Physiology** 147:969–977.

Nascimento-Júnior I, Môro GV, Môro FV (2017) Indirect selection of maize genotypes based on associations between root agronomic and anatomical characters. **Chilean Journal of Agriculture Research** 78:39–47.

Nielsen, J. and Oliver, S. (2005) The next wave in metabolome analysis. **Trends Biotechnol** 23:544–546.

Niu Y, Yang F, Dangal V, Huang F (2014) Larval survival and plant injury of Cry1F-susceptible, -resistant, and -heterozygous fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on non-Bt and Bt corn containing single or pyramided genes. **Crop Prot.** 59:22–28.

Pardo-López L, Soberón M, Bravo A (2013) *Bacillus thuringiensis* insecticidal threedomain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiol. Rev.** 37:3–22.

Pereira FJ, Castro EM, Souza TC, Magalhães PC (2008) Evolução da anatomia radicular do milho “Saracura” em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira** 43:1649–1656.

Pio LAS, Santos FC, Rufini JCM, Ramos JD, Araújo AG (2004) Germination in vitro pólen de citrus sob diferentes concentrações de cálcio e boro. **Revista Brasileira de Agrociência** 10:293-296.

Purrington CB, Bergelson J (1997) Fitness consequences of genetically engineered herbicide and antibiotic resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics** 145:807-814.

Ranum P, Peña-Rosas JP, Garcia-Casal MN (2014) Global maize production, utilization, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1312:105–12, 2014.

Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE: *Biologia Vegetal* (2003). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 728 p.

Rischer H, Oksman-Caldentey K (2006) Unintended effects in genetically modified crops : revealed by metabolomics ? **Trends in Biotechnology** 24:102–104.

Ritchie S, Hanway JJ (1989) How a cornplant develops. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 21 p (Special Report 48).

Russel WA (1991) Genetic improvement of maize yields. **Advances in Agronomy, Cambridge** 46:245-298.

Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P (2011) *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnol. J.** 9:283–300.

Siebert MW, Nolting SP, Hendrix W, Dhavala S, Craig C, Leonard BR, Stewart SD, All J, Musser, FR, Buntin GD, Samuel L (2012) Evaluation of corn hybrids expressing Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry34Ab1/Cry35Ab1, and Cry3Bb1 against southern United States insect pests. **Journal of Economic Entomology** 105:1825-1834.

Souza TC, Magalhães PC, Castro EM (2016) Corn root morphoanatomy at different development stages and yield under water stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 51:330–339.

Stanley RG, Linskens HF: Pollen: Biology, biochemistry and management (1974) New York. 314 p.

USDA (2018) Maize production mundial 2018/2019 .

Yang F, Kerns DL, Brown S, Kurtz R, Dennehy T, Braxton B, Head G, Huang F (2016) Performance and cross-crop resistance of Cry1F-maize selected *Spodoptera frugiperda* on transgenic Bt cotton: implications for resistance management. **Scientific Reports** 6:28059.

Yang F, Kerns DL, Head G, Brown S, Huang F (2017) Susceptibility of Cry1F-maize resistant, heterozygous, and susceptible *Spodoptera frugiperda* to Bt proteins used in the transgenic cotton. **Crop Protection** 98:128–135.

CAPÍTULO 2 - Influência da zigosidade do evento TC1507 x MON89034 x NK603 na anatomia e morfologia de híbridos de milho

RESUMO - Comercialmente, híbridos de milho transgênico são hemizigotos para o evento que os define, ou seja, das linhagens parentais cruzadas, uma é transgênica e a outra convencional. No entanto, híbridos homozigotos também podem ser obtidos pelo do cruzamento de duas linhagens parentais transgênicas. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência do número de alelos transgênicos do evento TC1507xMON89034xNK603 na anatomia e morfologia de híbridos de milho. Foram utilizados cinco diferentes híbridos de milho com o mesmo evento, cada um deles nas suas versões hemizigota e homozigota e um híbrido na versão isogênica convencional utilizado como controle, totalizando 11 tratamentos, com duas repetições. Os híbridos foram conduzidos em casa de vegetação de maneira que parte das plantas foram avaliadas para as características anatômicas do colmo no estágio V3-V4 e a outra mantida até o estágio de V5-V6 para a avaliação das características anatômicas da folha e raiz e morfológicas da raiz. Quanto os caracteres morfológicos da raiz não houve diferença entre as versões de cada híbrido. Para os caracteres anatômicos foram detectadas variações, tanto para os de parte área como do sistema radicular. Essas apresentaram diferentes níveis de similaridade entre as versões de cada híbrido e diferentes padrões de alteração nas características. Com isso, podemos demonstrar a existência de alterações entre as versões hemizigota e homozigota da transgenia. No entanto, não podemos vincula-las a transgenia em razão da inexistência de um padrão com que ocorrem.

Palavras-chaves: anatomia, homozigoto, hemizigoto, *Zea mays*.

1. Introdução

No Brasil, a partir de 2007 os eventos geneticamente modificados da cultura do milho foram liberados e passaram a ser utilizados pelos agricultores (Souza et al., 2010). Inicialmente continham somente um gene originário da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), que garantia a resistência a alguns insetos pragas (Souza et al., 2010). Desde então, é crescente o número de eventos desenvolvidos por empresas de melhoramento genético vegetal e aprovados comercialmente pela CTNBio, sejam eles singulares ou, mais comumente, piramidados, combinando resistência a insetos pragas e tolerância a herbicidas. A piramidação de diferentes genes em uma planta pode ser resultado de uma única transformação, de várias sequências de transformações ou por meio da introgressão de transgenes utilizando melhoramento clássico (Dietz-Pfeilstetter, 2010), sendo esse complexo multi-tóxico uma estratégia para atrasar a evolução da resistência nos insetos pragas (Carrière et al., 2015).

Os híbridos de milho transgênicos comerciais são, em sua maioria, hemizigotos para a transgenia, possuindo apenas um alelo no locus transgênico. Isso ocorre porque no processo de obtenção do híbrido há o cruzamento de uma linhagem convencional (ausente de transgenia) e outra linhagem transgênica (homozigota para a transgenia). Consequentemente, a progênie obtida terá apenas um alelo transgênico, sem o homólogo correspondente, definindo o híbrido como hemizigoto (Guadagnuolo et al., 2006). Por outro lado, o híbrido homozigoto se caracteriza por ser produto de ambas linhagens parentais transgênicas.

Podemos classificar as transformações genéticas, para obter os organismos geneticamente modificados (OGM), em dois tipos: aquelas cuja introdução do transgene é no sítio de mutação, como ocorre por intermédio do método por *Agrobacterium tumefaciens* e aquela cuja introdução do transgene ocorre de maneira aleatória no genoma, como a biobalística (Patel e Mankad, 2015). Assim, é possível que a introdução de genes exógenos resulte em alterações não intencionais e desconhecidas da natureza do transgene (Wilson et al., 2004), as quais, se existentes, podem ser positivas ou negativas (Cellini et al. 2004). Esses autores também definem como efeitos não intencionais a diferença no fenótipo, resposta ou composição quando se comparam OGM isogênicos e convencionais, cultivados sob as mesmas condições.

Na literatura, tem-se expressivo número de trabalhos avaliando efeitos não intencionais em genótipos comerciais transgênicos (hemizigoto) contrapondo seu isogênico convencional (Coll et al., 2009), porém não há relatos da influência do número de alelos transgênicos nas alterações não intencionais.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do número de alelos TC1507xMON8934xNK603 nas características anatômicas e morfológicas de híbridos de milho.

2. Material e Métodos

2.1 Genótipos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP – FCAV), sob temperatura média de 27°C e umidade de 70%. Foram utilizados cinco híbridos de milho (A, B, C, D e E) sintetizados pela Corteva Agriscience, contendo os eventos piramidados TC1507 x MON89034 x NK603, que codificam as proteínas Cry1F + enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT), proteínas Cry1A.105 + Cry2Ab2, e enzima 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase (EPSPS), respectivamente. Para cada híbrido foram avaliadas as versões em hemizigose (HE) e homozigose (HO) e, para o híbrido A, também foi avaliada a versão convencional (CO), totalizando 11 tratamentos. O delineamento do experimento foi em blocos casualizados com duas repetições, sendo cada parcela composta de quatro plantas dispostas em saco de polietileno (20x30cm) e volume de 2L, contendo substrato Bioplant e terra na proporção de 1:1, aplicando-se os tratos culturais recomendados para a cultura (Cruz et al., 2009).

2.2 Coleta de partes vegetativas

Quando as plantas atingiram o estágio V3-V4 foi coletado o colmo de duas plantas da parcela, os quais foram lavados e submetidos a dois cortes cada com aproximadamente 1 cm de espessura na região basal (zona ausente em bainha foliar), com auxílio de uma lâmina, totalizando quatro circunferências por tratamento. Em seguida, as circunferências foram colocadas em recipientes contendo FAA50 (fixador

de formaldeído, ácido acético e etanol 50%) até estarem completamente submersas (Johansen, 1940).

Quando as duas plantas remanescentes de cada parcela estavam no estágio V5-V6, a quarta folha de cada uma das plantas foi removida e foram realizados dois cortes em formato de retângulo abrangendo a nervura principal. Nas raízes destas mesmas plantas, foram escolhidos dois seguimentos por planta na região mediana, ausente de raízes secundárias, para a realização dos cortes com aproximadamente 1 cm de comprimento. As estruturas coletadas nas folhas e raízes foram acondicionadas em um recipiente contendo FAA50 até ficarem completamente submersas.

2.3 Caracteres avaliados

2.3.1 Massa fresca e massa seca de raiz

O sistema radicular de cada planta foi separado da parte aérea, com auxílio de uma lâmina para aferição da massa em uma balança de precisão. Posteriormente foram acondicionadas em saco de papel e submetidas a 65°C por 72 horas em estufa, para a pesagem da massa seca.

2.3.2 Morfologia de raiz

As raízes foram lavadas em água corrente, uma amostra de 1g foi retirada da região representativa de cada planta e colorida COM azul de metileno (1%) por aproximadamente dois minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a raiz foi novamente lavada e transferida para uma bandeja com água, para leitura dos caracteres da raiz: área, densidade, comprimento médio e diâmetro. Essas avaliações foram processadas no scanner Delta-T Scan e as imagens foram analisadas com auxílio do software Delta-T Scan Root Analysis System.

2.3.3 Anatomia de raiz, colmo e folha

As amostras de raiz, colmo e folha foram submetidas a uma série de desidratações pela da bateria alcoólica descrita por Johansen (1940), seguida da série etanol-xilólica na proporção de 1:1. Essas amostras foram transferidas para formas

de alumínio com parafina fundida, e mantidas em estufa a 60°C por 12h, sendo feita a troca da parafina a cada 4 h. Em seguida, o material foi transferido para caixas de papel parafinada, ocupando a região central. Após a completa solidificação dos blocos, as fitas de parafina foram seccionadas com micrótomo de deslize na espessura de 10 µm. Os cortes foram acomodados em lâminas e estas submetidas a uma placa aquecedora (40°C) para minimização da parafina na fita e uma melhor fixação dos cortes, sendo geradas três lâminas por planta contendo aproximadamente, seis cortes por lâmina. Cada lâmina foi imersa em xilol para retirada da parafina, e reidratada por meio da série etanol-xilólica (3:1), conforme descrito por Johansen (1940). Em seguida, foram coradas com Azul de Toluidina (Sakai, 1973) em capela de exaustão, lavadas em água corrente para retirada do excesso e colocadas para secagem em temperatura ambiente. Para a conservação das lâminas, uma gota de Entellan foi utilizada na colocação da lamínula, deixando-as em repouso sob temperatura ambiente até a secagem completa. As lâminas foram fotografadas com o auxílio do microscópio óptico, BELL Photonics, em aumento de 4x. Os caracteres anatômicos da raiz, colmo e folha foram avaliados com o auxílio de um software de edição de imagens.

Nas imagens obtidas foram avaliadas:

Para o colmo:

Diâmetro total do colmo (DIA): foram avaliadas cinco medidas em cada corte, sendo três cortes por lâmina por planta (µm);

Área de feixes vasculares do colmo (AFVm): foram realizadas cinco medidas por lâmina, por tratamento, por repetição (µm²);

Para a folha:

Espessura da epiderme adaxial do limbo da folha (Ead): foram realizadas três medidas na região do limbo por tratamento, por repetição (µm);

Espessura do mesófilo da folha (Eme): foram realizadas três medidas por tratamento, por repetição (µm);

Área dos feixes vasculares do xilema da folha (Axi_m): foram realizadas cinco medidas de comprimento e largura por lâmina, por tratamento, por repetição e em seguida aplicada a fórmula para área de elipse (μm^2);

Área dos feixes vasculares do floema da folha (Afi_m): foram realizadas cinco medidas de comprimento e largura por lâmina, por tratamento, por repetição e em seguida aplicada a fórmula para área de elipse (μm^2).

Para a raiz:

Espessura do córtex (EC): medidas de área do cilindro total desconsiderando a medida da área feixe da raiz (μm);

Cilindro total (CT): foram realizadas três medidas por tratamento, por repetição (μm);

Proporção do córtex em relação ao cilindro total (PC): proporção entre as medidas de espessura do córtex e as medidas de cilindro total (μm);

Espessura da epiderme (EP): foram realizadas três medidas por tratamento, por repetição (μm);

Espessura da endoderme (EN): foram realizadas três medidas por tratamento, por repetição (μm);

Área dos feixes vasculares (AF): medidas de área cilindro total subtraída da medida da área da medula (μm^2);

Proporção dos feixes vasculares em relação ao cilindro total (PF): proporção entre as medidas de área dos feixes vasculares e as medidas do cilindro total (μm).

2.4 Análise estatística.

Os dados foram submetidos a teste de normalidade e homocedasticidade por Shapiro-Wilk e O'Neill e Mathews, respectivamente. Em seguida realizou-se análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott. A normalidade não foi constatada para as variáveis diâmetro total do colmo e espessura do mesófilo da folha, e então foi aplicado o modelo não paramétrico de Kruskal-Wallis. Todas as análises foram realizadas no software R (R core team, 2019).

3. Resultados

Não houve diferença para todas as variáveis morfológicas da raiz pelo teste F (Tabela 1). Para as variáveis anatômicas houve diferença significativa, sendo as de parte aérea: diâmetro total do colmo, área dos feixes vasculares do colmo, espessura do mesófilo da folha, área dos feixes do xilema e área dos feixes do floema na folha (Tabela 2). Com exceção da área dos feixes da raiz, diferenças entre os tratamentos para as demais variáveis do sistema radicular foram significativas (Tabela 3).

Tabela 1: Quadrados médios da análise de variância para os caracteres morfológicos de raiz dos 11 híbridos de milho.

FV ¹	GL ²	Caráter ³					
		CR	MFR	MSR	DMR	ASR	DTR
Híbridos	10	629249 ^{ns}	13,977 ^{ns}	0,0482 ^{ns}	0,0019 ^{ns}	99564 ^{ns}	0,1573 ^{ns}
Bloco	1	7538	56,206	0,0051	0,0004	19261	0,0019
Resíduo	32	453477	12,487	0,0366	0,0023	90884	0,1134
Total	43	-	-	-	-	-	-
CV ⁴ (%)		20,90	39,29	33,02	10,58	20,88	20,90
Média		3221,74	8,99	0,58	0,45	1443,81	1,61

¹Fonte de variação (FV); ²Graus de liberdade (GL); ³CR: comprimento da raiz (mm), MFR: matéria fresca da raiz (g), MSR: matéria seca da raiz (g), DMR: diâmetro médio da raiz (mm), ASR: área do sistema radicular (cm²), DTR: densidade do tecido radicular (mm.ml⁻¹).

⁴Coefficiente de variação (CV, %); ^{ns} não significativos para o teste F a 5%.

Tabela 2: Quadrados médios da análise de variância para os caracteres anatômicos da parte área dos 11 híbridos de milho

FV ¹	GL ²	Caráter (colmo) ³		Caráter (folha) ⁴			
		DIA	AFVm	Ead	Eme	Axim	Aflom
Híbridos	10	2726502***	379077382***	19,735 ^{ns}	467,8***	6722966***	795135***
Bloco	1	145606	5835040	23,115	9,47	9421	340879
Resíduo	54	471011	29008824	11,199	109,78	629968	81062
Total	65	-	-	-	-	-	-
CV ⁵		19,44	31,83	13,74	12,52	14,54	17,18
Média		3530,303	16920,72	24,36	83,71	5458,03	1657,22

¹Fonte de variação (FV); ²Graus de liberdade (GL); ³DIA: diâmetro total do colmo (μm), AFVm: área dos feixes vasculares do colmo (μm^2), ⁴Ead: espessura da epiderme adaxial da folha (μm), Eme: espessura do mesófilo da folha (μm), Axim: área dos feixes vasculares do xilema (μm^2), Aflom: Área dos feixes vasculares do floema (μm^2); ⁵Coeficiente de variação (CV, %); ^{ns}: não significativo; ***: significativo a 1% pelo teste de F.

Tabela 3: Quadrados médios da análise de variância para os caracteres anatômicos do sistema radicular dos 11 híbridos de milho.

FV ¹	GL ²	Raiz ³						
		EC	CT	PC	EP	EN	AF	PF
Híbridos	10	9262,3***	4,19e+11**	0,0023***	17,61**	0,0015*	1,04e+10**	0,0024 ^{ns}
Bloco	1	1725,9	4,85e+11	0,0023	9,56	0,0008	1,91e+10	0,0012
Resíduo	54	2218,2	1,24e+11	0,0004	5,36	0,0006	3,99e+09	0,0005
Total	65	-	-	-	-	-	-	-
CV ⁴		14,83	29,91	2,76	18,58	7,92	27,80	11,89
Média		317,61	1178402	0,77	12,47	9,05	227319,20	0,20

¹Fonte de variação (FV); ²Graus de liberdade (GL); ³EC: espessura do córtex (μm), CT: circunferência total (μm^2); PC: proporção área do córtex (μm); EP: espessura epiderme (μm); EN: espessura de endoderme (μm); AF: área do feixe vascular (μm^2) e PF: proporção da área do feixe (μm). ⁴Coeficiente de variação (CV, %); ^{ns}: não significativo; ***: significativo a 1%; **: significativo a 5%; *: significativo a 10% pelo teste de F.

Para diferenciar as versões de cada híbrido o teste de Scott-Knott (5%) foi aplicado para todos os híbridos. No entanto, para melhor representação foi destacado apenas a diferença entre as versões do mesmo híbrido. Com relação aos caracteres anatômicos da parte aérea (Tabela 4), somente a variável espessura da epiderme adaxial não diferenciou as versões de nenhum dos híbridos. E para os caracteres anatômicos da raiz (Tabela 5) tem-se somente a espessura da endoderme apresentando as versões como similares em todos os híbridos.

Tabela 4: Médias e teste de médias para os caracteres anatômicos da parte aérea dos 11 híbridos de milho.

Híbridos	Versões	Caráter Colmo		Caráter Folha			
		DIA	AFVm	Ead	Eme	Axim	Aflom
A	Convencional	3275,00	11794,15	22,19	83,33	4362,58	1171,60
	Hemizigoto	3712,50	17433,48	22,27	95,83	5182,71	1370,53
	Homozigoto	3895,83	19237,50	25,62	95,83	5387,97	1499,36
B	Hemizigoto	4862,50	33016,36	23,80	87,50	6343,03	2205,80
	Homozigoto	3679,17	21624,79	27,08	83,33	4432,26	1431,71
C	Hemizigoto	3200,00	13178,52	25,54	75,00	5971,07	2058,18
	Homozigoto	4325,00	23120,33	26,84	95,83	8108,34	2292,36
D	Hemizigoto	2641,67	7764,65	25,47	75,00	5182,15	1647,62
	Homozigoto	3354,17	21970,17	22,49	75,00	4717,75	1507,79
E	Hemizigoto	3308,33	11223,19	23,04	79,17	5268,42	1461,16
	Homozigoto	2579,17	5764,82	23,67	75,00	5082,04	1583,34

DIA: diâmetro total do colmo (μm), AFVm: área dos feixes vasculares do colmo (μm^2), Ead: espessura da epiderme adaxial da folha (μm), Eme: espessura do mesófilo da folha (μm), Axim: área dos feixes vasculares do xilema (μm^2), Aflom: Área dos feixes vasculares do floema (μm^2); Valores em negrito indicam diferença pelo teste de Kruskal para DIA e Scott-knott, para as demais variáveis, ambos à 5% de probabilidade. As diferenças são consideradas entre cada uma das versões do mesmo híbrido.

Tabela 5: Médias e teste de médias para os caracteres anatômicos do sistema radicular dos 11 híbridos de milho.

Híbridos	Versões	Caráter Raiz						
		EC	CT	PC	EP	EN	AF	PF
A	Convencional	300,00	1042370,60	0,77	13,58	9,34	217293,50	0,21
	Hemizigoto	322,92	1165170,90	0,78	13,50	9,69	231856,10	0,20
	Homozigoto	329,17	1336731,30	0,76	15,11	8,67	284952,30	0,21
B	Hemizigoto	327,08	1313169,40	0,76	10,14	9,12	239546,40	0,19
	Homozigoto	341,67	1208776,90	0,80	12,37	10,70	214757,30	0,18
C	Hemizigoto	281,25	838248,90	0,79	13,09	7,33	159370,40	0,19
	Homozigoto	389,58	1786944,40	0,78	12,32	9,26	310232,30	0,18
D	Hemizigoto	268,75	923988,20	0,75	9,56	8,65	216639,00	0,23
	Homozigoto	252,08	894863,00	0,75	12,20	8,75	185304,90	0,22
E	Hemizigoto	335,42	1223175,80	0,79	10,94	8,43	224411,20	0,18
	Homozigoto	345,83	1228894,50	0,80	14,30	9,57	216148,10	0,18

EC: espessura do córtex (μm), CT: circunferência total (μm^2); PC: proporção área do córtex (μm); EP: espessura epiderme (μm); EN: espessura de endoderme (μm); AF: área do feixe vascular (μm^2) e PF: proporção da área do feixe (μm). Valores em negrito indicam diferença pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade, entre as versões do mesmo híbrido.

O teste de Scott-Knott para o diâmetro total do colmo (**DIA**), mostrou que as versões transgênicas do híbrido A e seu respectivo isogênico convencional não diferiram e os híbridos B e E tiveram redução do diâmetro na versão homozigota em relação a versão hemizigota de 24,33% e 22,04%, respectivamente. Por outro lado, os híbridos C e D, tiveram um aumento de 35,16% e 26,97%, respectivamente, na versão homozigota em relação a hemizigota. Na área média dos feixes vasculares do colmo (**AFVm**), no híbrido A as versões hemizigota e homozigota não diferiram, embora a versão convencional tenha apresentado redução de aproximadamente 35,50%; para o híbrido B houve redução na versão homozigota de 34,50% em relação a hemizigota, enquanto que para C e D houve aumento de 75,44% e 183%, respectivamente, para a versão homozigota em relação a hemizigota.

Para a anatomia de folha a espessura da epiderme do limbo (**Ead**) não apresentou diferença para nenhum dos híbridos avaliados. A espessura do mesófilo (**Eme**) no híbrido A foi similar nas versões hemizigota e homozigota e estas superiores

em 13,04% em relação a versão convencional. O híbrido C teve a versão homozigota superior a hemizigota em 27,77%, não diferindo para os demais híbridos. A área média dos feixes do xilema (**Axim**) apresentou redução de 30,12% para a versão homozigota do híbrido B em relação ao hemizigoto. No híbrido C homozigoto ocorreu aumento de 35,79% quando comparado com a versão hemizigota, e sem alterações para os demais híbridos. A área média dos feixes do floema (**Aflom**) apresentou redução de 35,09% para a versão homozigota do híbrido B em relação ao hemizigoto, não diferindo-se para os demais híbridos.

Entre as características anatômicas da raiz, a espessura do córtex (**EC**) foi similar nas versões isogênicas transgênicas do híbrido A e superiores em 8,7% quando comparadas com a versão convencional, no híbrido C homozigoto houve aumento de 38,52% na espessura em relação a versão hemizigota, sem diferenças para os demais híbridos. A circunferência total (**CT**) apresentou diferença apenas para o híbrido C, sendo o homozigoto superior em 113% ao hemizigoto. Na proporção do córtex em relação a área total (**PC**), a versão convencional e hemizigota do híbrido A foram similares enquanto a versão homozigota foi 1,93% inferior em relação a estas, no híbrido B homozigoto foi superior em 5,23% em relação a versão hemizigota, não diferindo para os demais híbridos. A área dos feixes vasculares (**AF**) do híbrido A não foi diferente entre as versões convencional e hemizigota, embora a versão homozigota foi superior em 27%; a versão homozigota do híbrido C foi superior em 94,66% em relação a sua versão hemizigota. A proporção da área do feixe em relação a área total (**PF**) apresentou a versão convencional e homozigota similares no híbrido A e 5,00% superiores em relação a versão hemizigota. Na espessura da epiderme (**EP**) a versão homozigota foi superior nos híbridos B, D e E em 22%, 27.55% e 30.70%, respectivamente, quando comparados com suas respectivas versões hemizigotas. Já na espessura da endoderme (**EN**) não foi notada diferença para as versões dos híbridos.

4. Discussão

Não foi possível diferenciar as versões de cada híbrido quanto as características morfológicas de raiz. Para as características anatômicas foi possível detectar alterações entre as versões. Os valores encontrados nos coeficientes de variação para os caracteres morfológicos estão condizentes com os encontrados por Silva et al. (2016) e, para os caracteres anatômicos da raiz, os valores foram similares aos reportados Nascimento-junior et al. (2017).

As diferenças significativas encontradas entre os pares de versões dos cinco híbridos avaliados quanto as variáveis anatômicas não permitiram estabelecer qualquer padrão nas alterações em função do número de alelos, pois as variações diferiram entre cada híbrido.

A transgenia promoveu efeitos positivos para a maioria das características anatômicas avaliadas no híbrido A quando comparamos seu isogênico convencional com as versões hemizigota e homozigota. Para área média dos feixes vasculares do colmo (AFVm), espessura do mesófilo da folha (Eme), espessura do córtex da raiz (EC) e área dos feixes vasculares da raiz (AF) houve predominância de efeitos positivos significativos e proporcional ao número de alelos. Para proporção do córtex da raiz (PC) e proporção dos feixes em relação a área total da raiz (PF) predominou os efeitos negativos significativos. Tais alterações nos levam a caracterizar o híbrido A homozigóticos com uma robusta estrutura para condução de água e nutrientes, quanto ao mesófilo, em altamente eficientes na atividade fotossintética e dissipação de gases (Raven et al., 2003), e ainda com o aumento da espessura do córtex pode indicar a presença de maiores aerênquimas, o que permitiria que essas plantas fossem tolerantes a condições de alagamento (Pereira et al., 2008). No entanto em condições normais também conferiria a uma maior resistência da passagem da água até os feixes vasculares da raiz (Pereira et al., 2008) . Ambas variáveis que apresentaram redução indicam a expansão da área de cilindro da raiz, condizente em função do aumento da espessura do córtex da raiz e área dos feixes vasculares da raiz

A atribuição de efeitos positivos e negativos em função da transgenia também foi proposto por Shi et al. (2013) para a produtividade de grão de milho. As combinações transgênicas estavam relacionadas à quatro eventos: resistência a *Ostrinia nubilalis* (ECB), resistência a *Diabrotica sp.* (CRW), tolerância ao glufosinato

(GFT) e tolerância ao glifosato (GT), dos quais o efeito dos eventos piramidados ou isolados resultaram em positivos ou negativos. Assim, foi constatado o efeito negativo para os eventos ECB-GT; ECB-GFT; ECB-GT-GFT e ECB-GT-GFT-CRW, mas positivo para ECB-CRW.

O resultado de cada híbrido para anatomia nos permite verificar uma tendência nos híbridos A, C e D, de superioridade do homozigoto em relação ao hemizigoto, sugerindo um efeito aditivo do alelo para a maioria das características. Contrariamente, para os híbridos B e E, verifica-se uma redução das características em função do aumento na zigosidade. Esse efeito aditivo encontrado para algumas características quando o número de alelos está em homozigose também pode ser vantajoso para outras variáveis aqui não analisadas, como por exemplo, contribuir positivamente para maior mortalidade dos insetos alvos na cultura do milho. Por isso seria interessante confirmar se o número de alelos afeta a síntese das proteínas transgênicas. Essa hipótese é reforçada pelo trabalho de Hood et al. (2012), que notaram que os eventos transgênicos *pat* e da enzima celulase introduzidos em plantas de milho tinham sua expressão no genótipo homozigoto até quatro vezes superior quando comparada ao seu isogênico hemizigoto.

A falta de consistência dos resultados entre as diferentes versões dos híbridos também foi observada por Balsamo et al. (2011), o que permite desvincular esse tipo de comportamento do efeito da transgenia inserida. Estes autores conduziram um trabalho com quatro genótipos de milho e compararam a versão transgênica MON810 (hemizigota) com a convencional por meio do peso da parte aérea, comprimento da folha bandeira e concentração de clorofila. Foram observadas diferenças significativas apenas para alguns dos genótipos e alguns ambientes em que foram avaliados, e assim concluíram que o padrão de alteração não foi definido e, portanto, ausência de efeitos causados pela tecnologia.

Quando as avaliações testadas para diferenciar as versões dos genótipos transgênicos (hemizigotos) e seu respectivo isogênico convencional, ou ainda o genótipo com maior similaridade, pertencem ao processo pós-transcricional, pode ser encontrado em trabalhos desse tipo o mesmo comportamento, ou seja, ausência de constância no padrão de alterações. Isto pode ser notado no trabalho de Barros et al. (2010), que analisando transcritos, proteínas e metabólitos de genótipos de milho transgênicos e seus respectivos isogênicos convencionais, encontraram diferenças que atribuíram como sendo de origem ambiental, em função da não constância dos

resultados nos diferentes ambientes de estudo. Neste mesmo sentido, Vidal et al. (2015) compararam amostras de farinha de milho transgênico (evento MON810) e convencional quanto a proteômica em presença e concentração, atribuindo a expressão destas quanto a sua natureza indutiva, em ambiental ou genética. Esses pesquisadores concluíram que somente metade destas proteínas eram induzidas pela inserção do transgene e a outra devido ao ambiente, e ainda notaram que maior variabilidade era encontrada entre as variedades convencionais do que entre a transgênica e seu respectivo isogênico. Quando comparamos a manipulação do fenótipo via transgenia ou método convencional, pode-se inferir que no primeiro deles resulta um genótipo mais estável, em função da sua precisão, no entanto, quando consideramos o segundo método, o genótipo filial pode apresentar muitas vezes um perfil de transcriptoma muito discrepante do seu parental (Baudo et al., 2006).

O evento MON810, característico de muitas variedades comerciais, tem em seu processo de desenvolvimento outros genomas envolvidos. A introgressão é uma ferramenta utilizada pelas empresas para transferir o gene transgênico para seus materiais, além dos outros genomas utilizados durante os cruzamentos para se obter os genótipos elite. Então, a variação notada entre os transgênicos e seu isogênico convencional pode ser em decorrência da permanência de alguma porção desses genomas que participaram no processo (Coll et al., 2009) ou ainda à diversidade natural das linhagens envolvidas (Vidal et al., 2015).

O genótipo de cada híbrido aqui analisado apresentou suas alterações não intencionais em proporção diferente, nos quais os híbridos A, B e C têm suas versões mais discrepantes, enquanto D e E foram os mais similares. Considerando a variação da expressão entre plantas transgênicas com o mesmo cassete gênico, também não há uma fonte completamente esclarecida, no entanto, têm-se teorias que são melhores aceitas, como o efeito de posição do sítio de inserção nas regiões vizinhas no cromossomo e a metilação epigenética que pode ter ocorrido no DNA inserido (Que et al., 2010).

5. Conclusão

Apesar das pequenas diferenças nas características anatômicas de colmo, folha e raiz em função do número de alelos transgênicos, elas não apresentaram um padrão de resultado. Assim, não é possível verificar a interferência direta do número de alelos dos eventos TC1507 x MON89034 x NK603 no desenvolvimento de híbridos de milho.

6. Referências

- Balsamo GM, Cangahuala-Inocente GC, Bertoldo JB, Terenzi H, Arisi ACM (2011) Proteomic analysis of four Brazilian MON810 maize varieties and their four non-genetically-modified isogenic varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 59:11553–11559.
- Barros E, Lezar S, Anttonen MJ, van Dijk JP, Rohlig RM, Kok EJ, Engel KH (2010) Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. **Plant Biotechnology Journal** 8:436-451.
- Baudo MM, Lyons R, Powers S, Pastori GM, Edwards KJ, Holdsworth MJ, Shewry PR (2006) Transgenesis has less impact on the transcriptome of wheat grain than conventional breeding. **Plant Biotechnology Journal** 4:369–380.
- Carrière Y, Crichmore N, Tabashnik B (2015). Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology** 33:161-168.
- Cellini F, Chesson A et al. (2004) Unintended effects and their detection in genetically modified crops. **Food Chemistry Toxicology** 42:1089–1125.
- Coll A, Nadal A, Palaudemas M, Messeguer J, Melé E, Puigdoménech P, Pla M (2008) Lack of repeatable differential expression patterns between MON810 and comparable commercial varieties of maize. **Plant Molecular Biology** 68:105–117.
- Coll A, Nadal A, Collado R, Capellades G, Messeguer J, Melé E, Palaudemas M, Pla M. (2009) Gene expression profiles of MON810 and comparable non-GM maize varieties cultured in the field are more similar than are those of conventional lines. **Transgenic Research** 18:801–808.

Cruz JC, Garcia JC, Pereira Filho IA, Pinto LBB, Queiroz LR (2009) **Caracterização dos sistemas de produção de milho para altas produtividades.**

Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 15 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica124).

Dietz-Pfeilstetter A (2010) Stability of transgene expression as a challenge for genetic engineering. **Plant Science** 179:164–167.

Guadagnuolo R, Clegg J, Ellstrand NC (2006) Relative fitness of transgenic vs. non-transgenic maize x teosinte hybrids: a field evaluation. **Ecological Applications** 16:1967-1974.

Hood EE, Devaiah SP et al. (2012) Manipulating corn germplasm to increase recombinant protein accumulation. **Plant Biotechnology Journal** 10:20–30.

Johansen DA: Plant microtechnique (1940). New York: Mc Graw Hill. 487 p.

Nascimento-Júnior I, Môro GV, Môro FV (2017) Indirect selection of maize genotypes based on associations between root agronomic and anatomical characters. **Chilean Journal of Agriculture Research** 78:39–47

Patel RG, Mankad AU (2015) In Vitro Pollen Germination - A Review. **Internacional Journal of Science and Research** 3:304–307.

Paterniani E, Stort AC (1974) Effective maize pollen dispersal in the field. *Euphytica* 23:129–134.

Pereira FJ, Castro EM, Souza TC, Magalhães PC (2008) Evolução da anatomia radicular do milho “Saracura” em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira** 43:1649–1656.

Que Q, Chilton MDM, Fontes CM, He C, Nuccio M, Zhu T, Wu Y, Chen JS, Shi L (2010) Trait stacking in transgenic crops: Challenges and opportunities Trait stacking in transgenic crops Challenges and opportunities. **GM Crops** 1:220–229.

Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE: *Biologia Vegetal* (2003). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 728 p.

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Sakai, WS (1973) Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue **Stain technology Journal**, 43:247-249.

Shi G, Chavas JP, Lauer J (2013) Commercialized transgenic traits, maize productivity and yield risk. **Nature Biotechnology** 31:111–114.

Silva TN, Moro GV, Moro FV, Santos DMM, Buzinaro R (2016) Correlation and path analysis of agronomic and morphological traits in maize. **Revista Ciencia Agronomica** 47:351–357.

Souza MP, Neumann M, Horst EH, Leão GFM, Slompo D, Dochwat A, Almeida ER (2010) Composição morfológica da planta de híbridos de milho convencionais e transgênicos (bt). **Agropecuária Científica no Semiárido** 13:53–58.

Vidal N, Barbosa H, Jacob S, Arruda M (2015) Comparative study of transgenic and non-transgenic maize (*Zea mays*) flours commercialized in Brazil, focussing on proteomic analyses. **Food Chemistry** 180:288–294.

Wilson A, Latham J, Steinbrecher R (2004) Genome Scrambling - Transformation-Induced mutations in trnasgenic crop plants. **EcoNexus** (Technical Report), 40 p.

CAPÍTULO 3: Impacto da zigosidade de diferentes eventos transgênicos na anatomia, morfologia e fertilidade masculina de híbridos de milho

RESUMO - Os estudos sobre a ocorrência de efeitos não intencionais em plantas transformadas geneticamente são relativamente recentes. Neste sentido é levado em consideração diferenças significativas entre o transgênico e seu respectivo isogênico convencional ou parental próximo, quanto a resposta, composição ou fenótipo. As tecnologias transgênicas inseridas são, em sua maioria, voltadas para a resistência a insetos e tolerância a herbicidas na cultura do milho, cujos genótipos comerciais são hemizigotos para o evento, ou seja, das linhagens parentais cruzadas, uma é transgênica e a outra convencional. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi verificar o efeito do número de alelos dos eventos que conferem resistência a insetos e tolerância a herbicidas, nos caracteres anatômicos, morfológicos e de fertilidade masculina do milho. Foram utilizados dois eventos isolados e a piramidação deles sendo, Bt11, MIR162 e Bt11xMIR162, denominados Bt11, Vip e Vip3, respectivamente, nas suas versões em homozigose, hemizigose e o respectivo isogênico convencional. Em casa de vegetação foram conduzidas quatro plantas por parcela e duas repetições, das quais metade foi conduzida até o estágio V3-V4 para os caracteres anatômicos do colmo e o restante até o estágio V5-V6 para os caracteres anatômicos da folha, anatômicos da raiz e morfológicos da raiz. Para estudo de fertilidade do grão de pólen, os genótipos foram semeados em campo e utilizadas três plantas por parcela e cinco repetições. Foi notada diferença entre os genótipos nos caracteres morfológicos, anatômicos e de fertilidade e comportamento diferente para os eventos analisados. Pode ser inferido que o número de alelos dos eventos quando isolados, Bt11 e Vip, foram inversamente acompanhados pelas alterações nas variáveis anatômicas, enquanto que os eventos piramidados, Vip3, teve o aumento do número de alelos acompanhado do aumento das variáveis anatômicas. A morfologia do sistema radicular e a viabilidade do grão de pólen também se comportaram de maneira inversa ao número de alelos transgênicos envolvidos, ou seja, essas características foram prejudicadas quando haviam dois alelos transgênicos.

Palavras-chaves: germinação, hemizigoto, homozigoto, milho Bt, viabilidade.

1. Introdução

A técnica do DNA recombinante ou engenharia genética permitiu que a performance das culturas agrícolas alavancasse em razão da aquisição da resistência a doenças, tolerância a herbicidas, adaptação a estresse, além da suplementação nutritiva (Barros et al., 2010).

O comportamento dos genótipos transgênicos é influenciado pelas diversas variáveis que participam durante o processo do seu desenvolvimento. Joyce et al. (2014) consideram como principais fontes das alterações notadas (a) o método de transformação utilizado, (b) influência dos transgenes no metabolismo das plantas, (c) cultura de tecidos e histórico de introdução de eventos transgênicos utilizados nos ensaios de campo e (d) volume de genótipos avaliados, bem como os eventos.

Independentemente do método direto ou indireto utilizado para a transformação genética, ele é passível de equívocos no momento da inserção do gene exógeno no DNA alvo, resultando em quebra de sequência gênica, alterações nas sequências e produção de novas proteínas. Os efeitos não intencionais são gerados tanto no melhoramento clássico como nas técnicas de recombinação, tanto que no primeiro, retrocruzamentos são realizados para eliminar as características indesejáveis (Rischer e Oksman-Caldentey, 2006).

Os híbridos de milho geneticamente modificados não foram desenvolvidos com o intuito de que haja alterações nos aspectos de morfologia quando comparados com seu isogênico convencional, como a maturação e produção pólen, a não ser as alterações propostas pelos eventos inseridos. No entanto, essas alterações podem ocorrer de maneira não programadas em detrimento da planta necessitar realocar o custo energético básico para sintetizar o produto do evento inserido (Agapito-Tenfen et al., 2014).

No aspecto comercial, em geral, os híbridos transgênicos de milho são definidos como hemizigotos para o evento. Isso ocorre em razão de no cruzamento das linhagens parentais apenas uma delas ser transgênica. Assim o híbrido possuirá um alelo transgênico, sem o homólogo equivalente (Guadagnuolo et al., 2006). Quando ambos parentais são transgênicos, a progênie é dita homozigota.

Para garantir a alta produtividade de um genótipo, a viabilidade do grão de pólen é um dos fatores-chaves, bem como a germinação e viabilidade desse grão são essenciais para programas de hibridização (Patel e Mankad, 2015). No estudos

realizados por Pfahler e Linskens (1972) para fertilização e viabilidade do pólen *in vitro* com genótipos de milho, sendo eles mutantes e normais para alguns caracteres fenotípicos, foi obtido que estes respondem de maneira diferente, ou seja, os alelos que compõem o genótipo do pólen tem influência na capacidade de germinação e fertilização.

Poucos são os estudos voltados para os custos adaptativos das plantas em função do gene exógeno, bem como ao processo de transformação utilizado (Snow et al., 1999). Os eventos aqui avaliados são resultados de diferentes métodos, onde o evento Bt11 foi introduzido por meio do bombardeamento de micropartículas, o evento MIR162 é resultado da transformação mediada via *Agrobacterium tumefaciens*. O evento piramidado resulta da combinação da introgressão dos eventos Bt11, MIR162 e GA21.

Com isso, o intuito do trabalho foi verificar o efeito dos eventos que conferem resistência a insetos e tolerância a herbicidas, isolados e combinados em hemizigose e homozigose nos caracteres anatômicos, morfológicos e de fertilidade masculina do milho.

2. Material e Métodos

2.1 Genótipos

Foi utilizado como base genética o híbrido Status associado a três eventos Bt11, MIR162 e Bt11xMIR162, que codificam as proteínas Cry1Ab, Vip3A20 e Cry1Ab+Vip3A20, respectivamente. Para cada evento, foram avaliadas as versões em hemizigose (HE) e homozigose (HO) e o isogênico convencional, totalizando sete tratamentos.

2.2 Experimento em casa de vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP – FCAV), sob temperatura média de 27°C e umidade de 70%. A montagem do experimento se deu em delineamento de blocos casualizados com duas repetições, sendo cada parcela composta de quatro plantas dispostas em saco de polietileno

(20x30cm), de capacidade para 2 L, contendo substrato Bioplant e terra na proporção de 1:1, aplicando-se os tratos culturais recomendados para a cultura (Cruz et al., 2009).

2.3 Coleta de partes vegetativas

Quando as plantas atingiram o estágio V3-V4 foi coletado o colmo de duas plantas da parcela, os quais foram lavados e submetidos a dois cortes cada com aproximadamente 1 cm de espessura na região basal (zona ausente em bainha foliar), com auxílio de uma lâmina, totalizando quatro circunferências por tratamento, por repetição. Em seguida, as circunferências foram colocadas em recipientes contendo FAA50 (fixador de formaldeído, ácido acético e etanol 50%) até estarem completamente submersas (JOHANSEN, 1940).

Quando as duas plantas remanescentes de cada parcela estavam no estágio V5-V6, a quarta folha de cada uma das plantas foi removida e foram realizados dois cortes em formato de retângulo abrangendo a nervura principal. Nas raízes destas mesmas plantas, foram escolhidos dois seguimentos por planta na região mediana, ausente de raízes secundárias, para a realização dos cortes com aproximadamente 1 cm de comprimento. As estruturas coletadas nas folhas e raízes foram acondicionadas em um recipiente contendo FAA50 até ficarem completamente submersas.

2.4 Características avaliadas

2.4.1 Massa fresca e massa seca de raiz

O sistema radicular de cada planta foi separado da parte aérea, com auxílio de uma lâmina para aferição da massa em uma balança de precisão. Posteriormente foram acondicionadas em saco de papel e submetidas a 65°C por 72 horas em estufa seguida da pesagem da massa seca.

2.4.2 Morfologia de raiz

As raízes foram lavadas em água corrente, uma amostra de 1g foi retirada da região representativa de cada planta e colorida em azul de metileno (1%) por

aproximadamente dois minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a raiz foi novamente lavada e transferida para uma bandeja com água, para leitura dos caracteres da raiz: área, densidade, comprimento médio e diâmetro, no scanner Delta-T Scan. As imagens foram analisadas com auxílio do software Delta-T Scan Root Analysis System.

2.4.3 Anatomia de raiz, colmo e folha

As amostras de raiz, colmo e folha foram submetidas a uma série de desidratações pela bateria alcoólica descrita por Johansen (1940), seguida da série etanol-xilólica na proporção de 1:1. Essas amostras foram transferidas para formas de alumínio com parafina fundida e mantidas em estufa a uma temperatura de 60°C por 12h, sendo feita a troca da parafina a cada 4 h. Em seguida, o material foi transferido para caixas de papel parafinado, ocupando a região central. Após a completa solidificação dos blocos, as fitas de parafina foram seccionadas com micrótomo de deslize na espessura de 10 µm. Os cortes foram acomodados em lâminas e estas submetidas a uma placa aquecedora (40°C) para minimização da parafina na fita e uma melhor fixação dos cortes, sendo geradas três lâminas por planta, contendo aproximadamente seis cortes por lâmina. Cada lâmina foi imersa em xilol para retirada da parafina e reidratada por meio da série etanol-xilólica (3:1), conforme descrito por Johansen (1940). Em seguida, foram coradas com Azul de Toluidina (Sakai, 1973) em capela de exaustão, lavadas em água corrente para retirada do excesso e colocadas para secagem em temperatura ambiente. Para a conservação das lâminas, uma gota de Entellan foi utilizada na colocação da lamínula, deixando-as em repouso sob temperatura ambiente até a secagem completa. As lâminas foram fotografadas com o auxílio do microscópio óptico BELL Photonics, em aumento de 4x. Os caracteres anatômicos da raiz, colmo e folha foram avaliados com o auxílio de um software de edição de imagens. Nas imagens obtidas foram avaliadas:

Para anatomia do colmo:

Diâmetro total do colmo (DIA): foram realizadas cinco medidas em cada corte, sendo três cortes por lâmina por plantas (µm);

Espessura de parênquima do colmo (ESP): foram realizadas três medidas por tratamento por repetição (μm);

Área de feixes vasculares do colmo (AFVm): foram realizadas cinco medidas por lâmina, por tratamento, por repetição (μm^2);

Para anatomia de folha:

Espessura da epiderme adaxial da folha (Ead): foram realizadas três medidas na região do limbo por tratamento, por repetição (μm);

Espessura do mesófilo da folha (Eme): foram realizadas três medidas por tratamento, por repetição (μm);

Área dos feixes vasculares do xilema da folha (Axim): foram realizadas cinco medidas de comprimento e largura por lâmina, por tratamento, por repetição e em seguida aplicada a formula para área de elipse (μm^2);

Área dos feixes vasculares do floema da folha (Aflom): foram realizadas cinco medidas de comprimento e largura por lâmina, por tratamento, por repetição e em seguida aplicada a formula para área de elipse (μm^2).

Para anatomia de raiz:

Espessura do córtex (EC): medidas de área cilindro total subtraída a medida da área feixe (μm);

Cilindro total (CT): foram realizadas três medidas por tratamento, por repetição (μm);

Proporção do córtex em relação ao cilindro total (PC): proporção entre as medidas de espessura do córtex e as medidas de cilindro total (μm);

Espessura da epiderme (EP): foram realizadas três medidas por tratamento, por repetição (μm);

Espessura da endoderme (EN): foram realizadas três medidas por tratamento, por repetição (μm);

Área dos feixes vasculares (AF): medidas de área cilindro total subtraída medida da área da medula (μm);

Proporção dos feixes vasculares em relação ao cilindro total (PF): proporção entre as medidas de área dos feixes vasculares e as medidas do cilindro total (μm).

2.5 Estudo do pólen

A condução do experimento se deu em campo na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (UNESP – FCAV). A semeadura dos genótipos foi realizada de modo escalonado de modo que as repetições se constituíram nas cinco épocas de semeio e consideradas três plantas por parcela. Ao atingirem o segundo/terceiro dia após antese, os pendões foram protegidos com sacos de papel kraft no início do dia e, às 10h da manhã, foram agitados para liberação dos grãos de pólen, sendo coletados e levados para o laboratório.

2.5.1 Viabilidade do grão de pólen

Foi utilizada a metodologia proposta por Alexander (1969), em que o grão de pólen é tratado o corante composto por 20ml de álcool etílico (95%), 20mg de verde malaquita, 50ml de água destilada, 40 ml de glicerina, 100mg fucsina ácida e 5g fenol. O corante foi adicionado a lâmina, em seguida o pólen foi espalhado sobre a mesma com auxílio de um pincel e em seguida colocada uma lamínula sobre a mesma. Após 30 minutos em temperatura ambiente as lâminas foram avaliadas em microscópio óptico na ocular de 4x, considerando 6 campos por lâmina. Os grãos considerados viáveis adquiriram uma coloração avermelhada, já aqueles cujo conteúdo não apresentava atividade coravam-se de verde e os malformados permaneceram transparentes, ambos contabilizados como inviáveis.

2.5.2 Germinação do grão de pólen

A germinação in vitro foi realizada utilizando o meio de cultura composto por 17g de sacarose, 0,3 mg de CaCl_2 , 0,1 mg de H_3BO_3 e 0,7 g de ágar. Os componentes foram misturados em um Becker e completado com água destilada até 100 ml, ajustado o pH para 6,4 e aquecido em forno micro-ondas para completa dissolução dos mesmos. O meio foi colocado em placas de petri, que foram mantidas em geladeira para a completa solidificação. Após a coleta dos grãos de pólen, os mesmos

foram espalhados sobre o meio de cultura com auxílio de um pincel e em seguida mantidos à temperatura ambiente na ausência de luminosidade. A avaliação ocorreu após 3 horas, em lupa sob aumento de 4,5x, sendo analisados 6 campos por lâmina. Foram considerados germinados os grãos que apresentaram o comprimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro do mesmo

2.6 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a teste de normalidade e homocedasticidade por Shapiro-Wilk e O'Neill e Mathews, respectivamente. Em seguida realizou-se análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott. A normalidade não foi constatada para as variáveis morfológicas relacionada a área e densidade do sistema radicular e anatômicas quanto a espessura do parênquima do colmo, espessura do córtex da raiz, área do cilindro total e a viabilidade do grão de pólen. Por isso foi aplicada a transformação por boxcox para a área do sistema radicular os demais caracteres, modelo não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação das médias. Todas as análises foram realizadas no software R (R core team, 2019).

3. Resultados

A análise de variância permitiu detectar diferenças para variáveis testadas. Na morfologia do sistema radicular os genótipos se comportaram de maneira diferentes somente para a área do sistema radicular (ASR) (Tabela 1). Para anatomia da parte aérea somente a espessura da epiderme adaxial da folha (Ead) não foi significativa (Tabela 2). Para a anatomia do sistema radicular houve diferenças para espessura do córtex (EC), cilindro total da raiz (CT), proporção do córtex em relação a área total da raiz (PC), área de feixes vasculares (AF) e a proporção dos feixes vasculares em relação a área total da raiz (Tabela 3). Dos caracteres que avaliaram a fertilidade dos grãos de pólen apenas a viabilidade (VIA) foi significativa (Tabela 4).

Tabela 1: Quadrados médios da análise variância para os caracteres morfológicos de raiz dos três eventos transgênicos do híbrido de milho Status, nas versões homozigota e hemizigota e o respectivo isogênico convencional.

FV ¹	GL ²	Caráter ³					
		CR	MFR	MSR	DMR	ASR	DTR
Genótipos	6	505371 ^{ns}	29,73 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,0008 ^{ns}	229610*	0,500 ^{ns}
Bloco	1	1593991	1,57	0,04	0,0014	165461	0,004
Resíduo	20	281337	30,12	0,07	0,0016	82817	0,380
Total	27	-	-	-	-	-	-
CV ⁴		16,46	52,98	42,12	9,18	21,18	35,86
Média		3221,70	10,36	0,64	0,44	1358,60	1,71

¹Fonte de variação (FV); ²Graus de liberdade (GL); ³CR: comprimento da raiz (mm), MFR: matéria fresca da raiz (g), MSR: matéria seca da raiz (g), DMR: diâmetro médio da raiz (mm), ASR: área do sistema radicular (cm²), DTR: densidade do tecido radicular (mm.ml⁻¹).

⁴Coeficiente de variação (CV, %); ^{ns}: não significativo, ^{***}: significativo a 1%, ^{**}: significativo a 5%, ^{*}: significativo a 10% para o teste F.

Tabela 2: Quadrados médios para os caracteres anatômicos da parte aérea dos três eventos transgênicos do híbrido de milho Status nas versões homozigota e hemizigota e o respectivo isogênico convencional.

FV ¹	GL ²	Caráter (colmo) ³			Caráter (folha) ⁴			
		DIA	ESP	AFVm	Ead	Eme	Axim	Aflom
Genótipos	6	2565208 ^{***}	22981,2 ^{***}	602217218 ^{***}	17,16 ^{ns}	1875,00 ^{***}	6546877,00 ^{***}	486799,00 ^{***}
Bloco	1	952	1205	741874305 ^{***}	153,56	59,52	187680	120611
Resíduo	34	227472	4330,4	49711869	14,69	182,07	800013	68928
Total	41							
CV ⁵		10,20	28,42	20,57	17,73	13,49	14,30	16,42
Média		4675	231,55	34271,19	21,62	100,00	6254,46	1598,71

¹Fonte de variação (FV); ²Graus de liberdade (GL); ³DIA: diâmetro total do colmo (μm), ESP: espessura do parênquima do colmo (μm), AFVm: área dos feixes vasculares do colmo (μm²),

⁴Ead: espessura da epiderme adaxial da folha (μm), Eme: espessura do mesófilo da folha (μm), Axim: área dos feixes vasculares do xilema (μm²), Aflom: Área dos feixes vasculares do floema (μm²); ⁵Coeficiente de variação (CV, %); ^{ns}: não significativo, ^{***}: significativo a 1%, ^{**}: significativo a 5%, ^{*}: significativo a 10% para o teste F.

Tabela 3: Quadrados médios para os caracteres anatômicos do sistema radicular dos três eventos transgênicos do híbrido de milho Status nas versões homozigota e hemizigota e o respectivo isogênico convencional.

FV ¹	GL ²	Caráter (raiz) ³						
		EC	CT	PC	EP	EN	AF	PF
Genótipos	6	7753,9**	3,79e+11***	0,0024*	1,36 ^{ns}	3,66 ^{ns}	8920653890**	0,0019*
Bloco	1	9867,0*	4,52e+11*	0,0008	2,19	2,07	1120817944	0,0093**
Resíduo	34	1647,8	7,15e+11	0,0008	3,69	1,90	2366259180	0,0009
Total	41							
CV ⁴		13,77	25,09	3,82	15,97	15,10	22,93	14,38
Média		294,79	1,07e+06	0,76	12,02	9,13	212151	0,21

¹Fonte de variação (FV); ²Graus de liberdade (GL); ³EC: espessura do córtex (µm), CT: circunferência total (µm²); PC: proporção área do córtex (µm); EP: espessura epiderme (µm); EN: espessura de endoderme (µm); AF: área do feixe vascular (µm²) e PF: proporção da área do feixe (µm). ⁴Coeficiente de variação (CV, %); ^{ns}: não significativo; ***: significativo a 1%; **: significativo a 5%; *: significativo a 10% pelo teste de F.

Tabela 4: Quadrados médios para os caracteres de fertilidade do grão de pólen dos três eventos transgênicos do híbrido de milho Status nas versões homozigota e hemizigota e o respectivo isogênico convencional.

FV ¹	GL ²	Caráter (fertilidade masculina) ³	
		GER	VIA
Genótipos	6	252,17	138,04***
Bloco	4	404,95	6,01
Resíduo	194	146,89	8,38
Total	104		
CV ⁴		33,57	3,03
Média		36,10	95,70

¹Fonte de variação (FV); ²Graus de liberdade (GL); ³GER: germinação (%), VIA: viabilidade (%). ⁴Coeficiente de variação (CV, %); ^{ns}: não significativo; ***: significativo a 1%; **: significativo a 5%; *: significativo a 10% pelo teste de F.

Considerando os caracteres morfológicos da raiz, houve similaridade entre as versões convencional, hemizigota e homozigota dos eventos Bt11 e Vip para a área da raiz (ASR). No evento Vip3 houve uma redução de 40,47% da versão homozigota em relação á convencional. Para as demais variáveis, não ocorreu diferença entre as três versões de cada genótipo (Tabela 5).

Tabela 5: Médias e teste de médias para os caracteres morfológicos do sistema radicular para os três eventos transgênicos do híbrido de milho Status nas versões homozigota e hemizigota comparados com o isogênico convencional.

Híbrido	Versões	CR	MFR	MSR	DMR	ASR	DTR
	Convencional	3598,63a	13,13a	0,73a	0,42a	1509,30a	1,80ab
Bt11	hemizigoto	3657,85a	10,24a	0,73a	0,43a	1588,03a	1,83a
	homozigoto	3176,12a	9,29a	0,58a	0,45a	1433,15a	1,59ab
Vip	hemizigoto	3320,38a	13,83a	0,83a	0,45a	1496,75a	2,41a
	homozigoto	3231,85a	8,71a	0,54a	0,43a	1404,60a	1,62ab
Vip3	hemizigoto	2621,30a	5,90a	0,33a	0,45a	1182,88ab	1,33b
	homozigoto	2905,80a	11,40a	0,75a	0,42a	898,50b	1,45ab

CR: comprimento da raiz (mm), MFR: matéria fresca da raiz (g), MSR: matéria seca da raiz (g), DMR: diâmetro médio da raiz (mm), ASR: área do sistema radicular (mm²), DTR: densidade do tecido radicular (mm.ml⁻¹). Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade para ASR e por Kruskal-wallis a 5% para DTR.

Tabela 6: Médias e teste de médias para os caracteres anatômicos da parte área para os três eventos transgênicos do híbrido de milho Status nas versões homozigota e hemizigota comparados com o isogênico convencional.

Evento	Versões	Caráter Colmo			Caráter Folha			
		DIA	ESP	AFVm	Ead	Eme	Axim	Aflom
	Convencional	5075,00a	220,83b	35182,92b	24,37a	120,83a	6965,22a	1821,58a
Bt11	hemizigoto	5204,17a	325,00ab	39471,52b	22,01a	100,00b	6561,27a	1634,43b
	homozigoto	4425,00a	158,33c	37252,91b	22,46a	104,17b	6370,34a	1485,00b
Vip	hemizigoto	5041,67a	154,17c	49996,09a	20,53a	116,67a	7645,25a	1972,40a
	homozigoto	4937,50a	229,17b	19101,25c	20,81a	83,33c	5494,04b	1554,62b
Vip3	hemizigoto	3312,50b	254,17ab	24891,43c	22,10a	70,83c	4406,62c	1070,99c
	homozigoto	4729,17a	279,17a	34002,20b	19,04a	104,17b	6338,50a	1651,97b

DIA: diâmetro total do colmo (µm), ESP: espessura de parênquima do colmo (µm), AFVm: área dos feixes vasculares do colmo (µm²), Ead: espessura da epiderme adaxial da folha (µm), Eme: espessura do mesófilo da folha (µm), Axim: área dos feixes vasculares do xilema (µm²), Aflom: Área dos feixes vasculares do floema (µm²); Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de kruskal-wallis a 5% de probabilidade para a ESP e Scott-Knott à 5% de probabilidade para os demais caracteres.

Tabela 7: Médias e teste de médias para os caracteres anatômicos do sistema radicular para os três eventos transgênicos do híbrido de milho Status nas versões homozigota e hemizigota comparados com o isogênico convencional.

Evento	Versões	Caráter Raiz						
		EC	CT	PC	EP	EN	AF	PF
	Convencional	305,21ab	1029035,00ab	0,78a	12,75a	8,78a	198640,3b	0,20b
Bt11	hemizigoto	351,04a	1311369,00a	0,79a	12,45a	9,72a	229729,0a	0,18b
	homozigoto	263,54b	897317,40ab	0,75b	11,80a	9,90a	194795,1b	0,23a
Vip	hemizigoto	301,04ab	1159689,00ab	0,74b	11,58a	8,62a	232510,6a	0,22a
	homozigoto	252,08b	761263,50b	0,76b	11,67a	7,77a	166488,0b	0,22a
Vip3	hemizigoto	266,67b	856002,20b	0,76b	11,60a	9,77a	182032,4b	0,22a
	homozigoto	323,96a	1444642,00a	0,74b	12,33a	9,32a	280861,7a	0,20b

EC: espessura do córtex (μm), CT: circunferência total (μm^2); PC: proporção área do córtex (μm); EP: espessura epiderme (μm); EN: espessura de endoderme (μm); AF: área do feixe vascular (μm^2) e PF: proporção da área do feixe (μm). Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de kruskal-wallis a 5% de probabilidade para EC e CT e Scott-Knott à 5% de probabilidade para os demais caracteres.

Tabela 8: Média e teste de médias para os caracteres de fertilidade do grão de pólen para os três eventos transgênicos do híbrido de milho Status nas versões homozigota e hemizigota comparados com o isogênico convencional

Evento	Versões	GER	VIA
	Convencional	40,00a	97,65a
Bt11	hemizigoto	38,00a	97,90a
	homozigoto	39,39a	98,08a
Vip	hemizigoto	33,81a	96,78ab
	homozigoto	29,80a	92,84bc
Vip3	hemizigoto	39,50a	96,50ab
	homozigoto	32,24a	90,14c

GER: germinação (%), VIA: viabilidade (%). Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de kruskal-wallis a 5% de probabilidade para GER e Scott-Knott à 5% de probabilidade para VIA.

Quanto os caracteres anatômicos da parte aérea relacionados ao colmo notamos que o diâmetro total (**DIA**) apresentou diferença apenas para o evento Vip3, diferindo o homozigoto do hemizigoto em um aumento de 42,77%. O convencional diferiu apenas da versão hemizigota do evento Vip3, cuja redução foi de 34,73%. Para a espessura do parênquima do colmo (**ESP**), temos ambas versões dos eventos Bt11

e Vip diferentes, sendo a versão homozigota do evento Bt11 inferior em 51,28% em relação a hemizigota. Já a versão homozigota do evento Vip foi superior em 48,64% em relação a hemizigota. A versão convencional diferiu de pelo menos uma das versões dos três eventos, sendo os híbridos Bt11 homozigoto e Vip hemizigoto inferiores em 28,30% e 30,19%, respectivamente e, para o híbrido Vip3 homozigoto houve superioridade de 26,42% com relação ao convencional. Na área média dos feixes vasculares (**AFVm**), temos as versões do evento Vip se diferenciando, sendo o homozigoto inferior em 61,79% e também no Vip3, mas com a versão homozigota superior em 36,60%, com relação ao hemizigoto. As versões que diferiram do convencional em função da redução na estrutura foi Vip homozigoto e Vip3 hemizigoto, com 45,70% e 29,25%, respectivamente. O híbrido Vip hemizigoto foi superior em 42,10%. Quanto aos caracteres avaliados na folha, temos a espessura do mesófilo (**Eme**), o qual as versões dos eventos Vip e Vip3 se diferenciaram, com redução do homozigoto em 28,58% e aumento de 47,07%, respectivamente, com relação ao hemizigoto. A versão convencional se diferenciou de ambas versões do Bt11, Vip homo e ambas versões do Vip3, sendo todas reduzidas em 17,24%, 13,79%, 31,04%, 41,38% e 13,79%. Com relação a área média dos feixes vasculares do xilema (**Axim**), as versões dos eventos Vip e Vip3 se diferenciaram, sendo o homozigoto menor em 28,14% e maior em 43,84%, respectivamente em relação ao hemizigoto. O híbrido convencional se diferiu do evento Vip em homozigose e Vip3 em hemizigose, ambos com redução de 21,12% e 36,73%, respectivamente. A área média de feixes do floema (**Aflom**) permitiu diferenciar as versões dos eventos Vip e Vip3, sendo o homozigoto menor em 21,18% e maior em 54,25%, respectivamente. Para a versão convencional a diferença se deu com relação a ambas versões do evento Bt11, Vip homo e ambas versões do Vip3, todas marcadas pela redução na estrutura, seguindo a sequência de 10,27%, 18,48%, 14,66%, 41,21% e 9,31%. A espessura da epiderme adaxial (Ead) não apresentou diferença entre as versões dos eventos (Tabela 6).

Os caracteres relacionados com o sistema radicular que apresentaram semelhança entre os eventos e as versões de cada um deles foi com base na espessura da epiderme (**EP**), espessura da endoderme (**EN**) e proporção dos feixes em relação a área total (**PF**). Para a espessura do córtex (**EC**), as versões dos eventos Bt11 e Vip3 diferiram o homozigoto em relação ao hemizigoto, com redução de 24,93% e aumento de 21,47%, respectivamente, e o convencional similar a todos. Para o cilindro total (**CT**), somente a versão Vip3 diferiu suas versões sendo o

homozigoto superior em 68,77%, com relação ao hemizigoto. A proporção do córtex **(PC)** diferiu apenas a versão do evento Bt11, sendo o homozigoto inferior em 5,06%. O híbrido convencional se diferiu dos eventos Bt11 homozigoto, ambas versões do evento Vip e ambas do Vip3, sendo todas caracterizadas pela redução de 3,85%, 5,13%, 2,56%, 2,56% e 5,13%, respectivamente. Com relação a área dos feixes vasculares **(AF)** todas os eventos tiveram suas versões diferenciadas, sendo que para o Bt11 e Vip a versão homozigota foi inferior em 15,20% e 28,39% com relação a hemizigota, e para o evento Vip3 o homozigoto foi superior ao hemizigoto em 54,43%. A diferença do genótipo convencional se deu nos genótipos Bt11 hemizigoto, Vip hemizigoto e Vip3 homozigoto, sendo estes superiores em 15,65%, 17,05% e 41,39%, respectivamente (Tabela 7).

Os caracteres que avaliaram a capacidade do pólen de fertilização não apresentaram diferença entre as versões quando considerada a germinação, nem entre as versões e o híbrido convencional. Para a viabilidade, houve diferença apenas entre as versões dos eventos Vip3, com redução do homozigoto em torno de 6,59% com relação ao hemizigoto. O híbrido convencional se diferiu do híbrido Vip homozigoto e Vip3 homozigoto, acarretando em uma redução de 4,93% e 7,69% (Tabela 8).

4. Discussão

São escassos na literatura trabalhos que buscam efeitos não intencionais na anatomia e morfologia das plantas transgênicas, bem como essas alterações relacionadas ao número de alelos inseridos. Maior ênfase na abordagem de efeitos não intencionais está direcionada para a proteômica (Agapito-Tenfen et al., 2014; Que et al., 2010; Poerschmann et al., 2005; Balsamo et al., 2011; Baudo et al., 2006; Barros et al., 2010), metabolômica (Zhou et al., 2009) e efetivamente a produtividade (Shi et al., 2013). Os estudos ligados à anatomia estão vinculados a alterações no ambiente, como compactação do solo (Bergamin et al., 2010), regime hídrico (Pereira et al., 2008) e deficiência nutricional.

A busca por efeitos não intencionais deve abranger inúmeras variáveis (Jiang e Xiao, 2010), e isso fica evidenciado com os nossos resultados, pois ocorreu significância de algumas variáveis e outras não, bem como a diferença entre os eventos.

A redução da área da raiz causada pelo evento Vip3 em relação ao convencional, pode acarretar na menor exploração do solo (Ali et al., 2016) comprovaram que raízes mais longas estão associadas a genótipos de milho mais tolerantes a estresse hídrico, devido à maior exploração do solo e consequentemente captura da água nas camadas mais profundas. Com isso, entendemos que, os eventos de resistência a insetos e tolerância a herbicida, quando piramidados, podem prejudicar os genótipos em relação ao suprimento hídrico.

De maneira geral, o evento Bt11 em homozigose refletiu em redução das variáveis espessura do parênquima do colmo, espessura do córtex da raiz, cilindro total da raiz, proporção do córtex em relação a área total e a área de feixes vasculares. No colmo o parênquima tem função de preenchimento e permite o armazenamento de água e ar, dependendo se o ambiente é deficiente em água ou excesso dela, respectivamente (Apezato-da-Glória e Carmello-Guerreiro, 2006). Quanto ao aumento da espessura do córtex pode indicar a presença de maiores aerênquimas, o que permitiria que essas plantas suportassem condições específicas, como períodos de alagamento (Pereira et al., 2008). No entanto em condições normais também conferiria a uma maior resistência da passagem da água até os feixes vasculares da raiz (Pereira et al., 2008). O aumento do cilindro total da raiz se deu em resposta ao aumento do córtex e da área dos feixes.

O evento Vip resultou em maior espessura do parênquima do colmo e menor espessura do mesófilo da folha, menor área de xilema da folha e menor área de floema da folha quando em homozigose, comparado com o hemizigoto. A maior espessura do parênquima do colmo condiciona a maior rigidez, além de sugerir aumento do número de feixes vasculares (Brito e Rodella, 2002). No mesófilo da folha está disposto o parênquima clorofiliano, responsável pela atividade fotossintética da planta, que refletirá na sua produtividade. A redução de área do xilema é indicativa de adaptação a uma situação de perturbação (Apezato-da-Glória e Carmello-Guerreiro, 2006).

Quando os eventos estão piramidados, como o evento Vip3, há um maior número de alterações nas variáveis anatômicas de folha, colmo e raiz, todas induzidas, o que foi observado para o diâmetro do colmo, espessura do mesófilo da folha, espessura do córtex da raiz, cilindro total da raiz e a área de feixes nas três estruturas. Tais condições indicam que as três estruturas avaliadas se tornaram mais robustas com a adição de mais um alelo transgênico. Joyce et al. (2014), utilizando

cana-de-açúcar convencional e transgênica a partir de diferentes métodos de transformação, detectaram diferença no desempenho de campo (diâmetro, comprimento e número de colmos) e na produtividade, onde na maioria delas o genótipo convencional demonstrou superioridade aos transgênicos. No entanto, nenhum padrão de alterações pode ser definido. Jiang e Xiao (2010), buscando alterações inesperadas em arroz transgênico (resistente ao glifosato) comparado com seu isogênico convencional em parâmetros fenotípico, constataram diferenças estatisticamente significativas para a largura da folha bandeira, espiguetas por panícula, comprimento da panícula e índice de colheita. No entanto, as alterações não prejudicam a manutenção do metabolismo da planta, pois todos os caracteres mantiveram a variação esperada para a cultura.

O comportamento da transgenia quando combinada entre diferentes genes podem resultar em diferentes efeitos na variável analisada. Shi et al. (2013) notaram que a produtividade foi incrementada ou atenuada a depender da combinação entre genes de tolerância a herbicidas e resistência a pragas na cultura do milho. Foram testados para resistência a *Ostrinia nubilalis* (ECB), resistência a *Diabrotica sp.* (CRW), tolerância ao glufosinato (GFT) e tolerância ao glifosato (GT), dos quais o efeito na produtividade foi negativo para os eventos ECB-GT; ECB-GFT; ECB-GT-GFT e ECB-GT-GFT-CRW, e positivo para ECB-CRW.

Quando extrapolado a outras culturas, os efeitos não intencionais em cultivares transgênicas também é notado. O perfil metabólico de uma variedade transgênica de arroz em contrapartida a sua convencional se difere em 17 pontos. Destes, 9 foram identificados e compreendem a classe dos carboidratos, ácidos orgânicos, aminoácidos, ácido graxo e monoglicerídeos. Com esse perfil uma análise de componentes principais foi aplicada, e identificados dois grupos bem definidos, de variedade transgênica e convencional, sendo explicada aproximadamente 86% da variação pelo PC1 (Zhou et al., 2009).

Estudos iniciais voltados para a fertilidade do grão de pólen em milho buscaram definir o conceito de fluxo gênico e a capacidade de mistura nas lavouras vizinhas, como o trabalho de Kuperinen et al. (2007). No entanto, quando se trata da fertilidade destas plantas voltadas para a produtividade do campo, Brookes et al. (2004) ponderam que somente uma parte dos grãos de pólen originados em uma planta geneticamente modificada, carregará consigo o gene exógeno. Um exemplo são os grãos de plantas com o evento MON810, em que somente 50% deles o terão. Isso em

função da zigosidade, como dito anteriormente, a maioria dos genótipos transgênicos comerciais são hemizigotos para o evento, atribuindo este fato a razão da maioria dos genótipos aqui analisados nesta condição não terem apresentando diferença.

Os valores de porcentagem da germinação aqui encontrados são condizentes com o trabalho de Pfahler e Linskens (1972). Os dados de viabilidade são dependentes diretos do genótipo e das condições ambientais (Martins et al., 2016) e, em razão disso, podemos inferir que a piramidação dos genes pode ter influência direta com as variáveis que prejudicam a viabilidade do pólen como a maior suscetibilidade à perda de água (Luna et al., 2001). Quando isolados, os eventos se assemelharam ao convencional, independentemente do número de alelos, assim como no estudo de Wang et al. (2004) que avaliaram o efeito da transgenia na viabilidade e a manutenção da mesma em diferentes períodos para festuca (*Festuca arundinacea*), também pertencente à família Poacea.

Moraes (2017) avaliando a zigosidade do evento TC1507xMON89034xNK603 em cinco genótipos de milho observou um aumento na expressão da proteína Cry1F quando os híbridos estavam em homozigose, porém sem alterar a produtividade de grãos. Embora não tenha contemplado no estudo a viabilidade e germinação do grão de pólen, assim como não o fez com a anatomia e morfologia, podemos inferir que não houve custo enérgico para a planta a presença do alelo adicional (homozigoto para o evento). Com isso, a menor viabilidade para os grãos de pólen nas versões homozigotas dos eventos Vip e Vip3 pode não ser fator relevante para a diminuição do número de grãos formados e consequentemente, reduzir a produtividade. Complementar a isto, ocorre redução no número de grãos de milho e na produtividade quando o número de grãos por estilo-estigma é menor que 3000 (Westgate et al., 2003). Uma planta de milho é capaz de produzir entre 4,5 e 25 milhões de grãos de pólen para formar uma espiga que contenha em torno de 500 grãos (Paterniani e Stort, 1974). Sendo assim, a redução de 6% na viabilidade de grãos de pólen na versão homozigota do híbrido Vip3 homozigoto provavelmente não limitaria a produção de grãos da planta, pois o seu isogênico hemizigoto é um híbrido de alto desempenho produtivo (EMBRAPA, 2016).

5. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos os eventos Bt11 e Vip, quando em homozigose, causam uma redução nas características anatômicas, sem efeito na capacidade reprodutiva do pólen. No evento piramidado Vip3, a homozigose promoveu aumento das estruturas anatômicas e redução na viabilidade do grão do pólen.

6. Referências

Alexander MP (1969) Differential staining of aborted and non-aborted pollen. **Stain Technology**, 62:107-112.

Ali ML, Luetchens J, Singh A, Shaver TM, Kruger GR, Lorenz AJ (2016) Greenhouse screening of maize genotypes for deep root mass and related root traits and their association with grain yield under water-deficit conditions in the field. **Euphytica** 207:79-94.

Agapito-Tenfen SZ, Vilperte V, Benevenuto RF, Rover CM, Traavik TI, Nodari RO (2014) Effect of stacking insecticidal cry and herbicide tolerance epsps transgenes on transgenic maize proteome. **BMC Plant Biology** 14:1-19.

Apezato-da-Glória B, Carmello-Guerreiro SM: Anatomia Vegetal (2006). Viçosa: UFV.438 p.

Balsamo GM, Cangahuala-Inocente GC, Bertoldo JB, Terenzi H, Arisi ACM (2011) Proteomic analysis of four Brazilian MON810 maize varieties and their four non-genetically-modified isogenic varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 59:11553–11559.

Barros E, Lezar S, Anttonen MJ, van Dijk JP, Rohlig RM, Kok EJ, Engel KH (2010) Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. **Plant Biotechnology Journal** 8:436-451.

Baudo MM, Lyons R, Powers S, Pastori GM, Edwards KJ, Holdsworth MJ, Shewry PR (2006) Transgenesis has less impact on the transcriptome of wheat grain than conventional breeding. **Plant Biotechnology Journal** 4:369–380.

Bergamin AC, Vitorino ACT, Lempp B, Souza CMA, Souza FR (2010) Anatomia radicular de milho em solo compactado. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira** 45:299–305.

Brito CJFA e Rodella RA (2002) Caracterização morfo-anatômica da folha e do caule de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *B. humidicola* (Rendle) Schweick. (Poaceae). **Revista brasileira de Botânica**, 25:221:228.

Brooke S G, Barfoot P, Melé E, Messeguer J, Bénétix F, Bloc D, Foueillassar X, Fabié A, Poeydomenge C (2004) Genetically modified maize: pollen movement and crop co-existence. **PG Economics**, 15:1-20.

Cruz JC, Garcia JC, Pereira Filho IA, Pinto LBB, Queiroz LR (2009) **Caracterização dos sistemas de produção de milho para altas produtividades**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 15 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica 124).

Guadagnuolo R, Clegg J, Ellstrand NC (2006) Relative fitness of transgenic vs. non-transgenic maize x teosinte hybrids: a field evaluation. **Ecological Applications** 16:1967-1974.

Jiang X, Xiao G (2010) Detection of unintended effects in genetically modified herbicide-tolerant (GMHT) rice in comparison with non-target phenotypic characteristics. **African Journal of Agricultural Research** 5:1082–1088.

Johansen DA: Plant microtechnique (1940). New York: Mc Graw Hill. 487 p.

Joyce P, Hermann S, O'Connell A, Dinh Q, Shumbe L, Lakshmanan P (2014) Field performance of transgenic sugarcane produced using *Agrobacterium* and biolistics methods. **Plant Biotechnology Journal** 12:411–424.

Kuparinen A, Schurr F, Tackenberg O, O'Hara RB (2007) Air-Mediated Pollen Flow from Genetically Modified to Conventional Crops. **Ecological Applications** 17:431–440.

Luna S, Figueroa J, Baltazar B, Gomez R, Townsend R, Schoper JB (2001) Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. **Crop Science** 41:1551–1557.

Martins ES, Davide LMC, Miranda GJ, Barizon JO, Souza-junior FA, Carvalho RP, Gonçalves MC (2016) In vitro pollen viability of maize cultivars at different times of collection. **Ciência Rural** 47:1–8.

Moraes KE (2017) **Expressão de cry1f, controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae) e produtividade de grãos em híbridos de milho homozigotos e hemizigotos transgênicos**. 32 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Unesp, Jaboticabal. [s.l: s.n.].

Patel RG, Mankad AU (2015) In Vitro Pollen Germination - A Review. **Internacional Journal of Science and Research** 3:304–307.

Paterniani E, Stort AC (1974) Effective maize pollen dispersal in the field. **Euphytica** 23:129–134.

Pereira FJ, Castro EM, Souza TC, Magalhães PC (2008) Evolução da anatomia radicular do milho “Saracura” em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 43:1649–1656.

Pfahler PL, Linskens HF (1972) In Vitro Germination and Pollen Tube Growth of Maize (*Zea mays* L .) Pollen. **Theoretical and Applied Genetics** 42:136–140.

Poerschmann J, Gathmann A, Augustin J, Langer U, Górecki T (2005) Molecular Composition of Leaves and Stems of Genetically Modified Bt and Near-Isogenic Non-Bt Maize—Characterization of Lignin Patterns. **Journal of Environment Quality** 34:1508.

Que Q, Chilton MDM, Fontes CM, He C, Nuccio M, Zhu T, Wu Y, Chen JS, Shi L (2010) Trait stacking in transgenic crops : Challenges and opportunities Trait stacking in transgenic crops Challenges and opportunities. **GM Crops** 1:220–229.

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rischer H, Oksman-Caldentey K (2006) Unintended effects in genetically modified crops : revealed by metabolomics ? **Trends in Biotechnology** 24:102–104.

SAKAI, WS (1973) Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue Stain technology Journal, 43:247-249.

Shi G, Chavas JP, Lauer J (2013) Commercialized transgenic traits, maize productivity and yield risk. **Nature Biotechnology** 31:111–114.

Snow AA, Andersen B, Jorgensen RB (1999) Costs of transgenic herbicide resistance introgressed from *Brassica napus* into weedy *B. rapa*. **Molecular Ecology** 8:605–615.

Wang ZY, Ge Y, Scott M, Spangenberg G (2004) Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) (Poaceae) plants. **American Journal of Botany** 91:523–530.

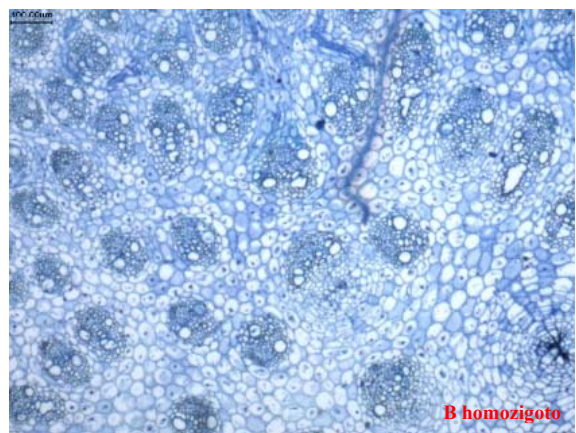
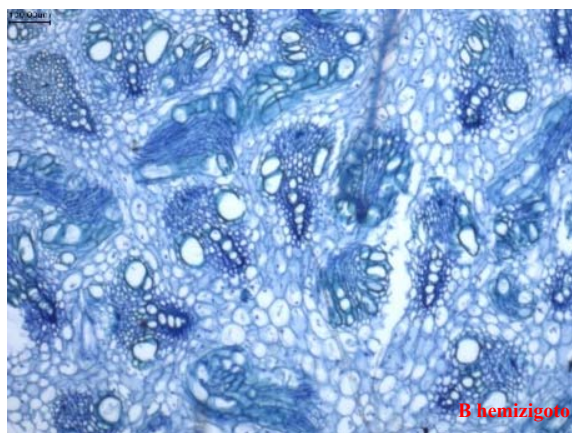
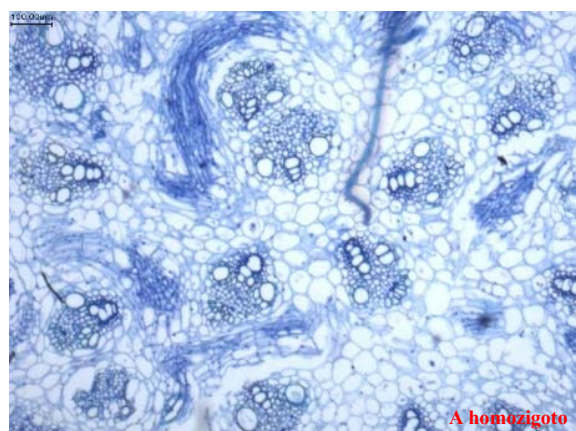
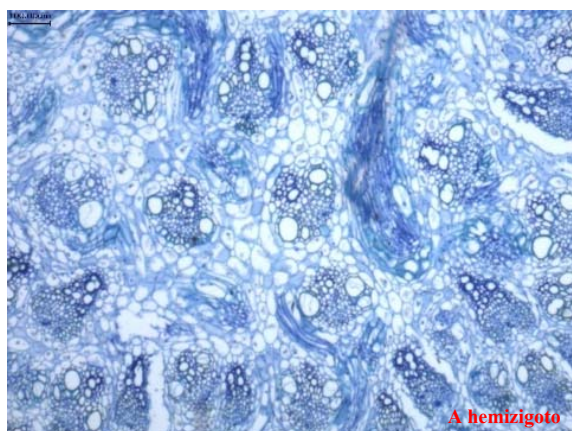
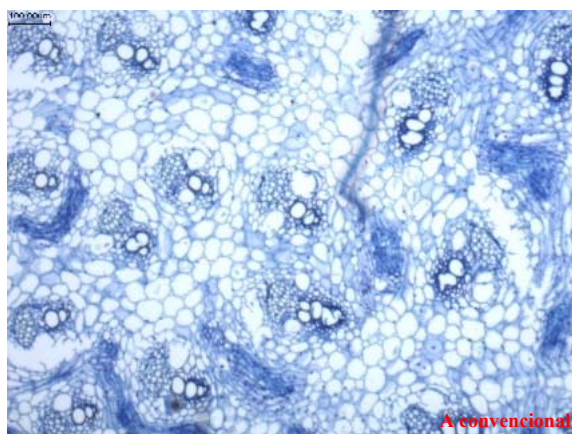
Westgate ME, Lizaso J, Batchelor W (2003) Quantitative Relationships between Pollen Shed Density and Grain Yield in Maize. **Crop Science** 43:934–942.

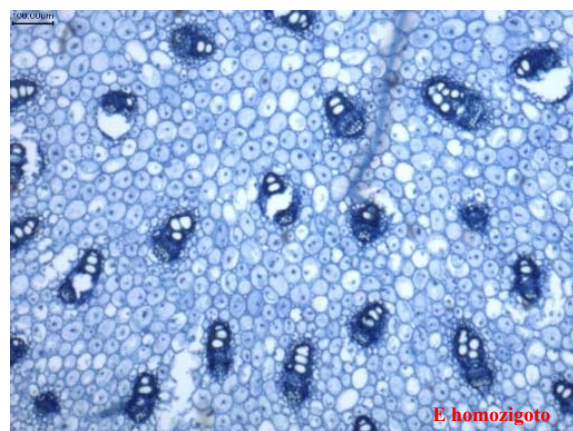
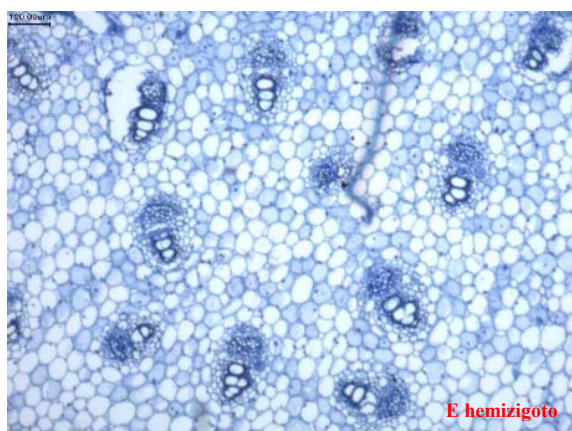
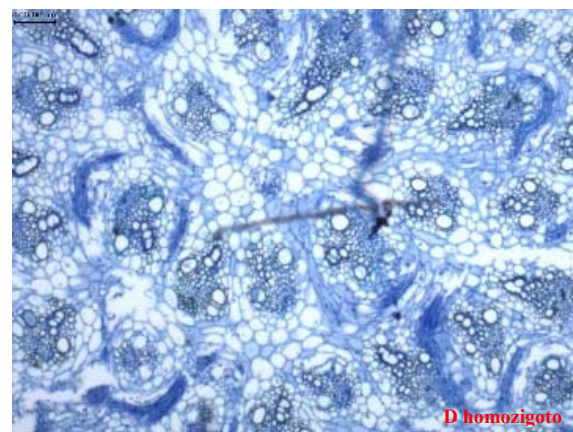
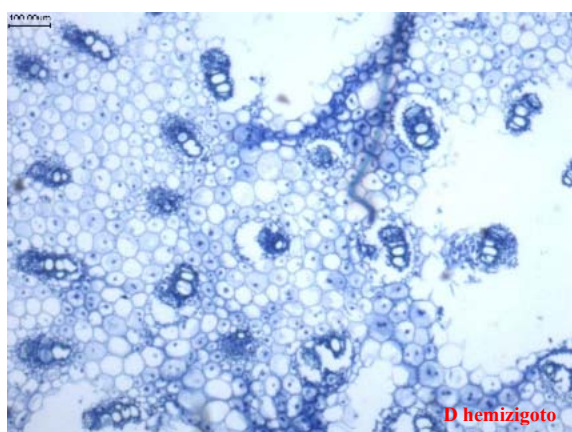
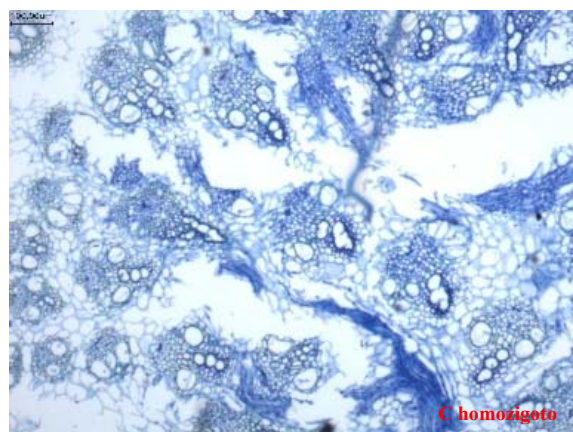
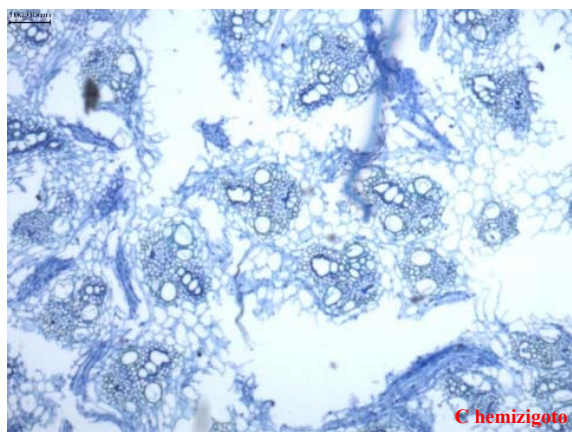
Zhou J, Ma C, Xu H, Yuan K, Zhu Z, Xu G (2009) Metabolic profiling of transgenic rice with cryIAc and sck genes: An evaluation of unintended effects at metabolic level by using GC-FID and GC–MS. **Journal of Chromatography B** 877:725–732.

Apêndices

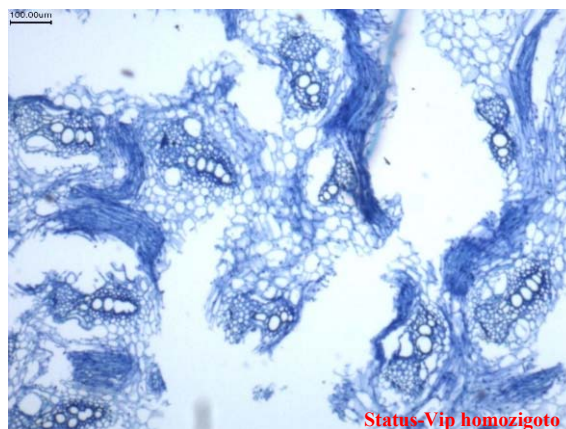
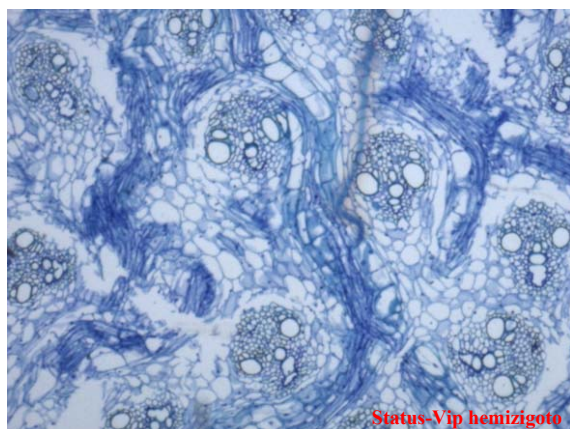
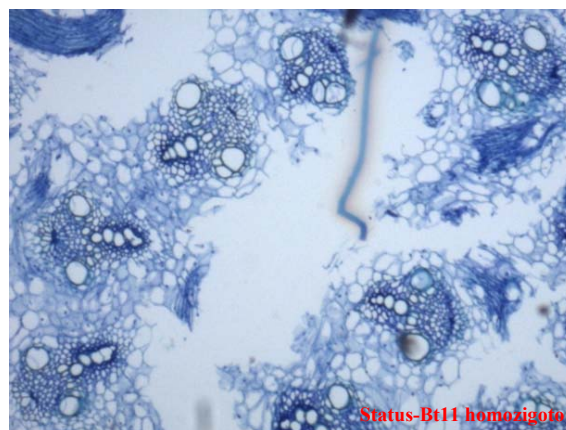
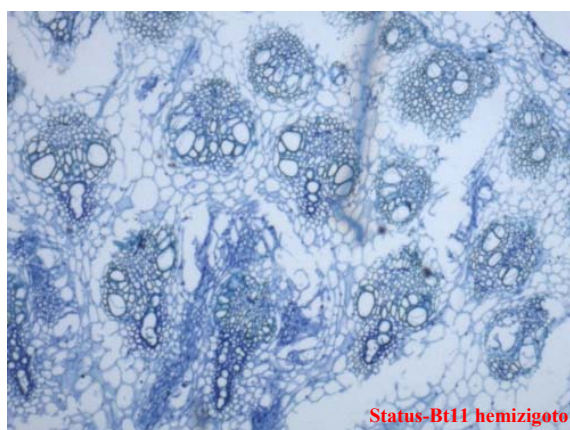
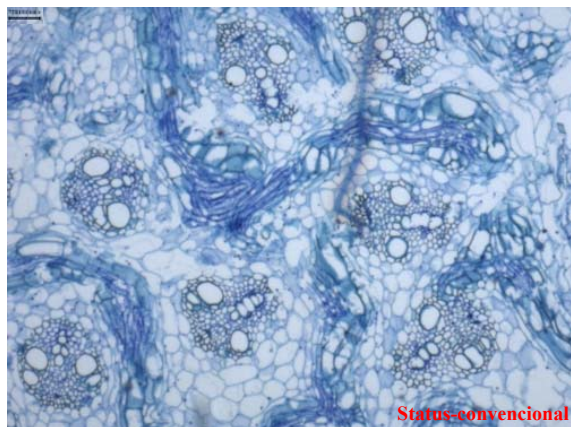
Apêndice A: Anatomia de colmo

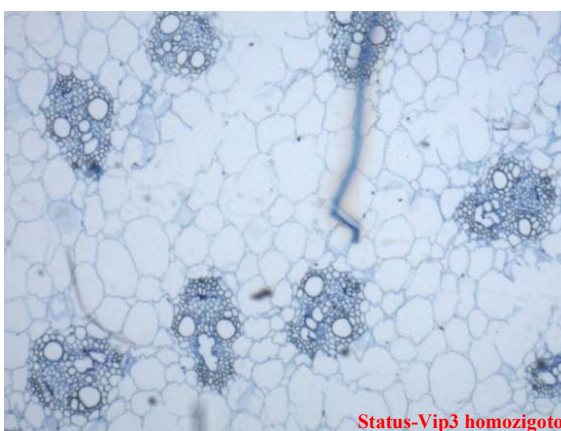
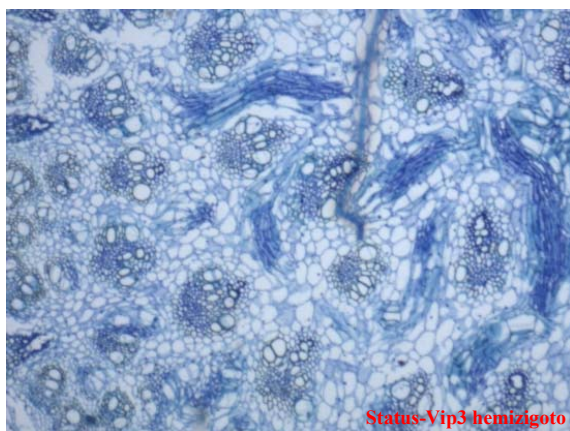
Apêndice 1A: Detalhes das seções transversais do colmo dos cinco híbridos de milho transgênicos e o respectivo isogênico.





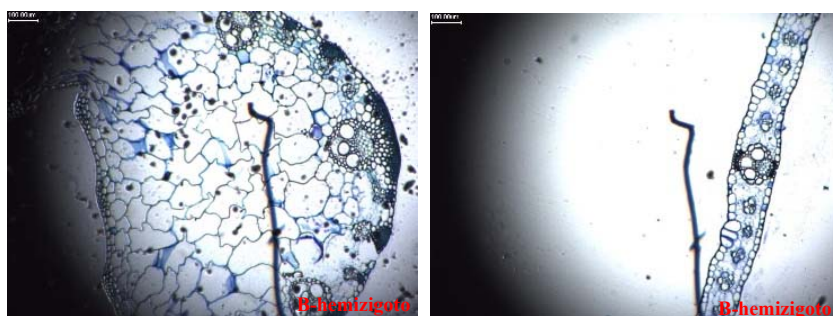
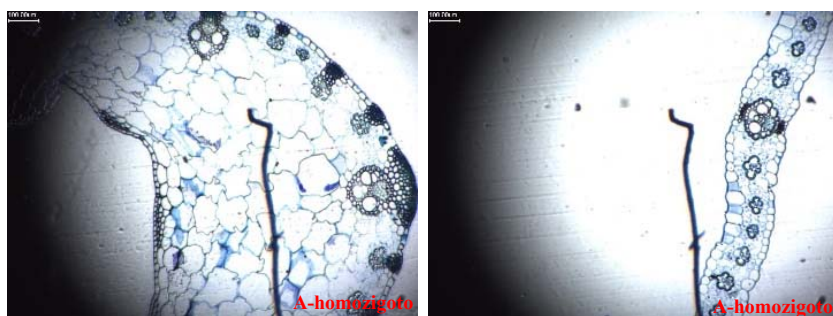
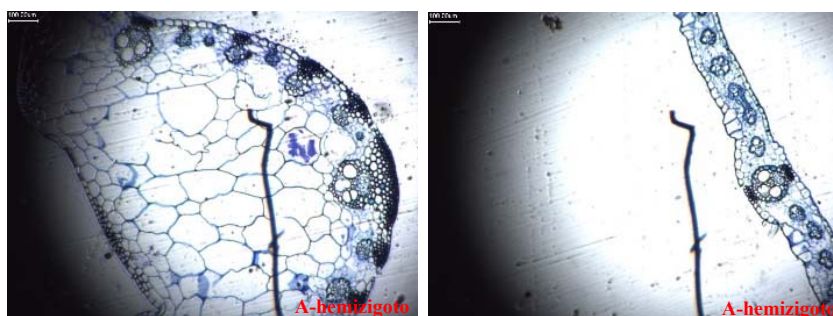
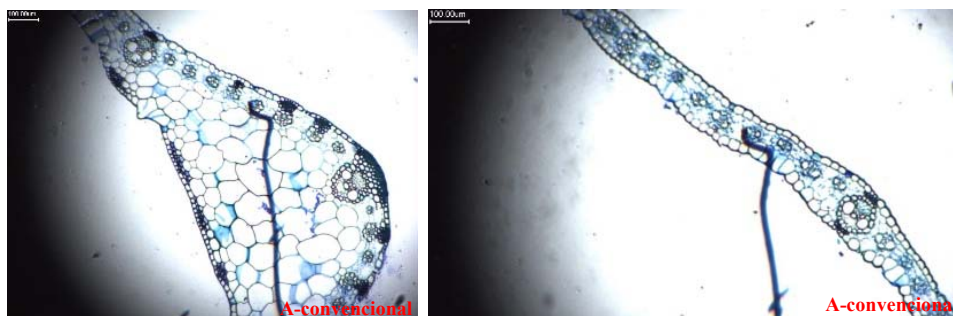
Apêndice 2A: Detalhes das seções transversais do colmo dos três eventos transgênicos do híbrido de milho Status nas versões homozigota e hemizigota e o respectivo isogênico convencional.

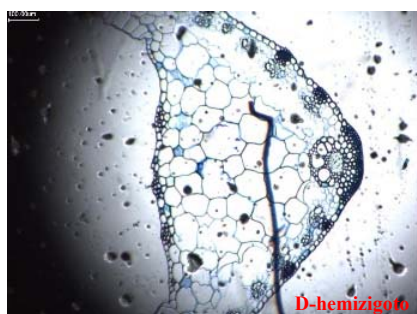
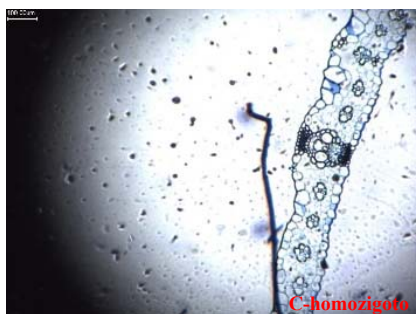
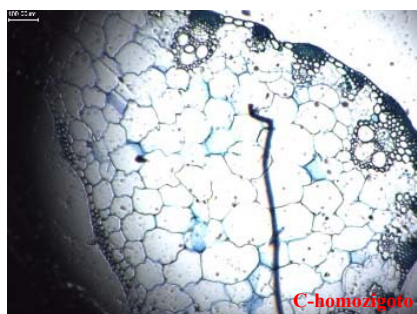
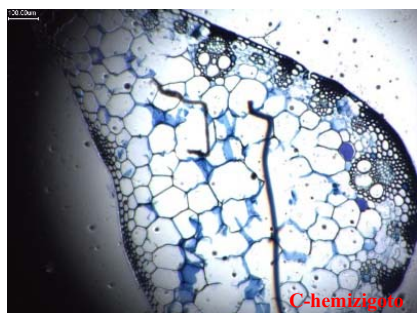
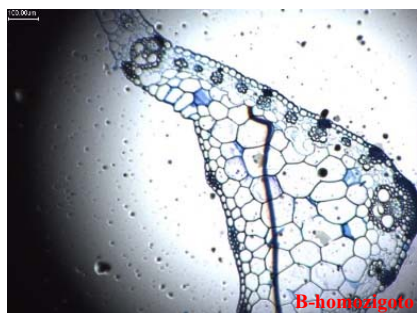


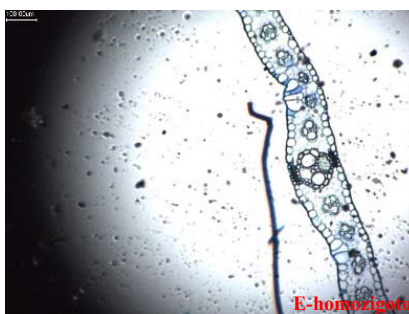
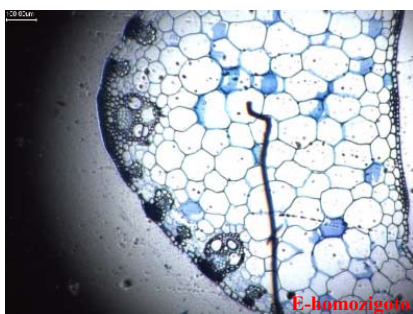
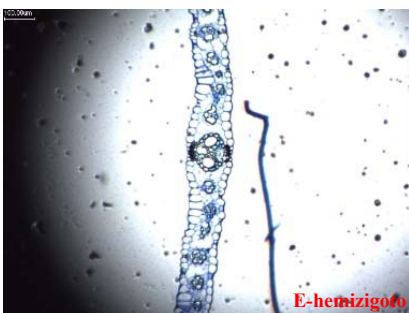
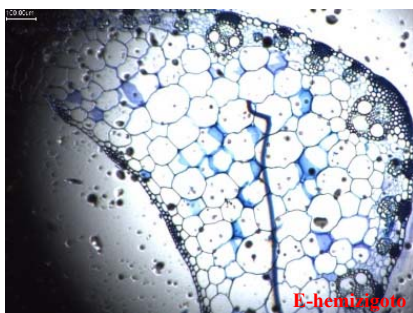
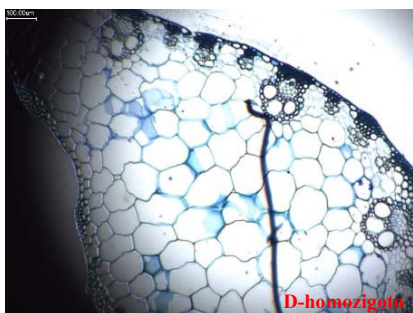


Apêndice B: Anatomia de folha

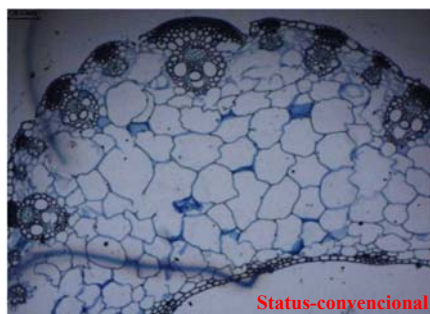
Apêndice 1B: Detalhes das seções transversais da folha dos cinco híbridos de milho transgênicos e o respectivo isogênico.







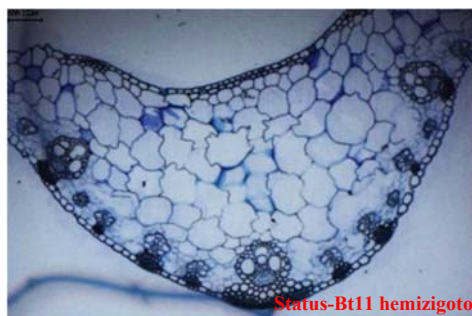
Apêndice 2B: Detalhes das seções transversais da folha dos três eventos transgênicos do híbrido de milho Status nas versões homozigota e hemizigota e o respectivo isogênico convencional.



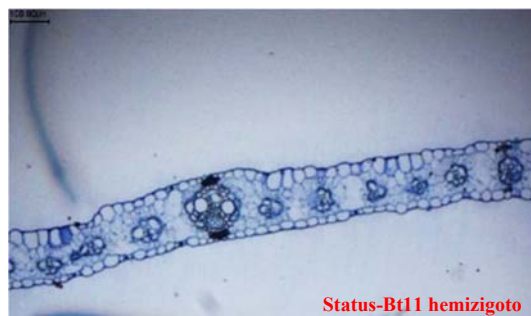
Status-convencional



Status-convencional



Status-Bt11 hemizigoto



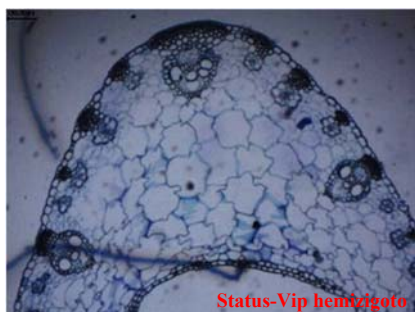
Status-Bt11 hemizigoto



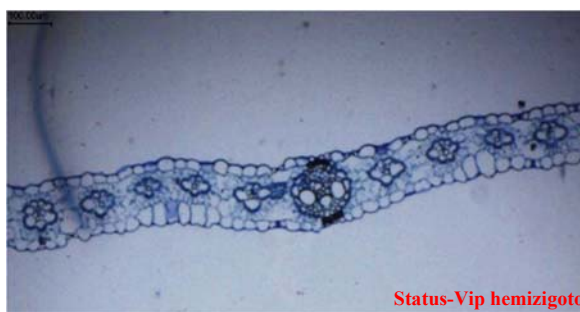
Status-Bt11 homozigoto



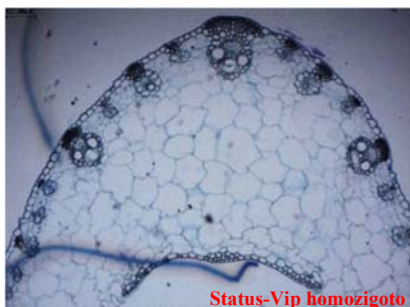
Status-Bt11 homozigoto



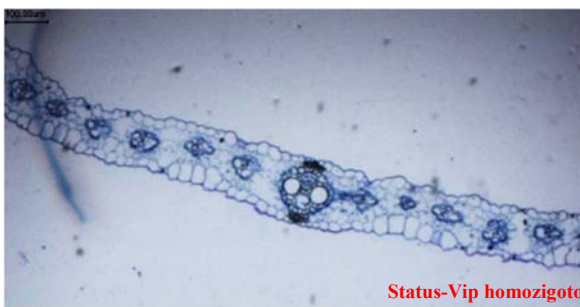
Status-Vip hemizigoto



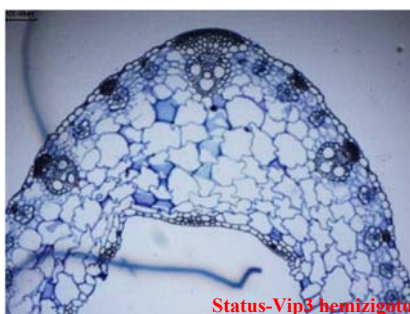
Status-Vip hemizigoto



Status-Vip homozigoto



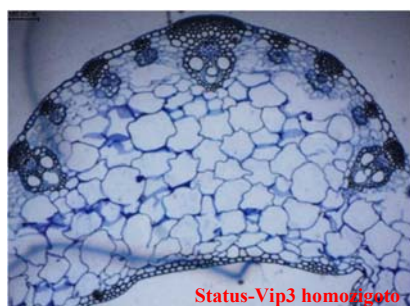
Status-Vip homozigoto



Status-Vip3 hemizigoto



Status-Vip3 hemizigoto



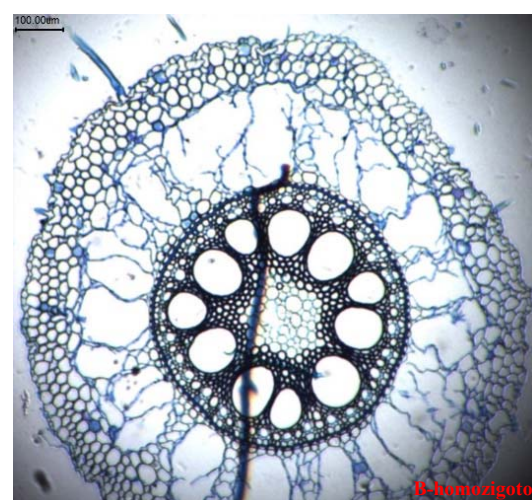
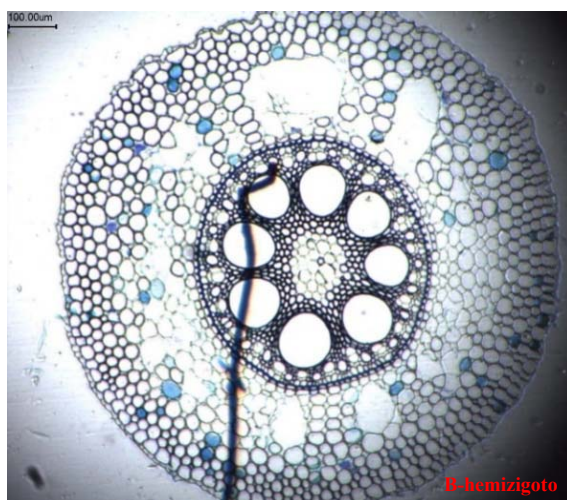
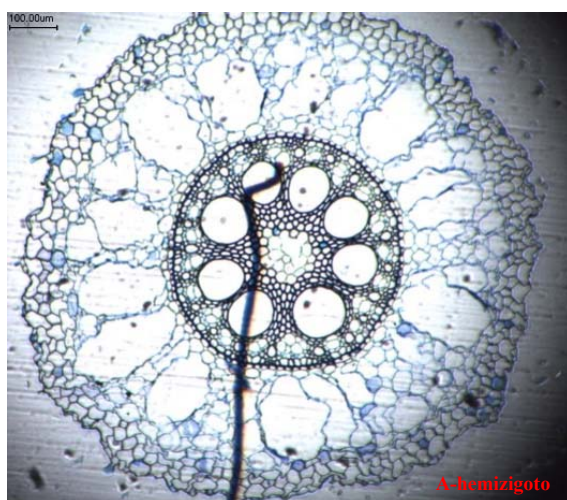
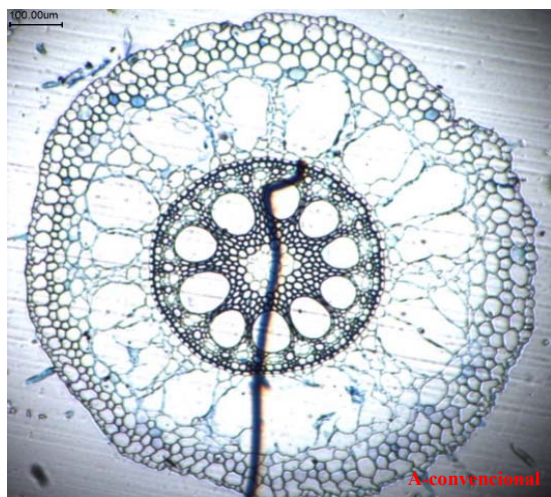
Status-Vip3 homozigoto

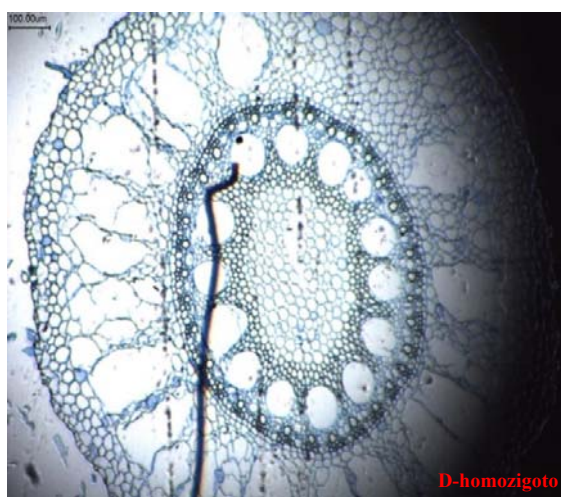
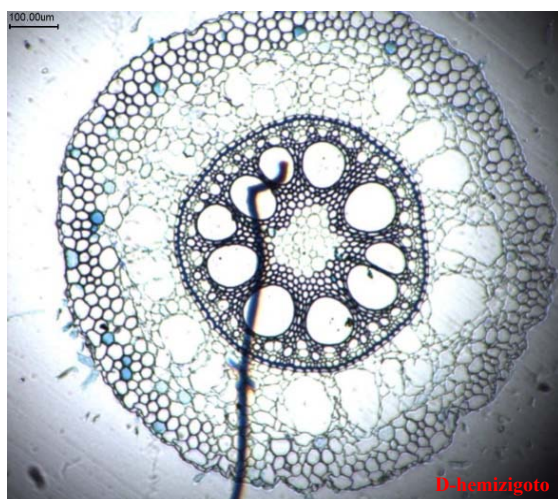
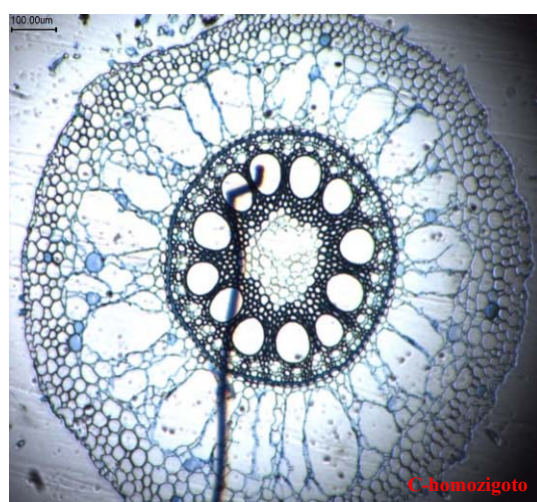
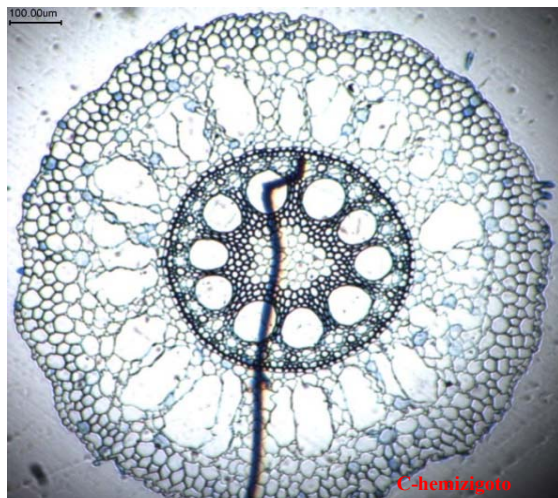


Status-Vip3 homozigoto

Apêndice C: Anatomia de raiz

Apêndice 1C: Detalhes das seções transversais da raiz dos cinco híbridos de milho transgênicos e o respectivo isogênico.





Apêndice 2C: Detalhes das seções transversais da raiz dos três eventos transgênicos do híbrido de milho Status nas versões homozigota e hemizigota e o respectivo isogênico convencional.

