

Avaliação do Impacto de Eventos Comerciais de Milho Bt sobre a Microbiota do Solo

Ubiraci Gomes de Paula Lana^(1,2); Amanda Nayê Guimarães Tavares⁽³⁾; Eliane Aparecida Gomes⁽⁴⁾; Christiane Abreu de Oliveira⁽⁴⁾; Arley Figueiredo Portugal⁽¹⁾; Fernando Hercos Valicente⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Analista de Pesquisa; Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas, MG; ubiraci.lana@embrapa.br; ⁽²⁾ Professor; Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM; ⁽³⁾ Estudante, Bolsista FAPEMIG, Faculdade Ciências da Vida; ⁽³⁾ Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo.

RESUMO: Eventos de milho geneticamente modificado (GM) expressando proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) têm sido cultivados comercialmente no Brasil desde a safra 2008/2009. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto de sete eventos comerciais de milho Bt sobre a comunidade microbiana do solo. A qualidade biológica do solo foi avaliada utilizando-se as técnicas de Biolog (diversidade metabólica) e T-RFLP (diversidade genética) em amostras de solo não rizosférico e rizosférico dos eventos de milho DKB 390 YG, FORMULA TL, MORGAN 20A78HX, DKB 390 PRO X, 2B587 POWER CORE, DKB 390 PRO 2 e IMPACTO VIPTERA e seus respectivos isogênicos tratados e não tratados com inseticida químico. As amostras foram coletadas aos 30 e 60 dias após a germinação em Janaúba - MG, safra 2015/2016. Após 72 h de incubação das placas de Biolog, foram observados valores elevados da atividade e da diversidade metabólica (Índice de Shannon) no solo rizosférico em comparação com solo não rizosférico. Entretanto não foram detectadas diferenças significativas entre os eventos transgênicos e os tratamentos convencionais. Além disso, também não foi observada diferença significativa na diversidade genética, avaliada por T-RFLP, das comunidades de bactérias e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) entre genótipos convencionais e eventos GM. Foi verificada uma tendência de agrupamento baseada no período da coleta, mostrando a importância do estágio de desenvolvimento da planta na modulação da comunidade de FMA. Os eventos de milho Bt comercializados no Brasil avaliados neste trabalho não apresentam impacto significativo sobre a estrutura das comunidades bacterianas e de FMA do solo, com base nos parâmetros estudados.

Termos de indexação: Monitoramento, Milho Transgênico Bt, Microrganismos do Solo.

INTRODUÇÃO

Atualmente, cerca de 18 milhões de agricultores em todo mundo já adotam o cultivo de plantas geneticamente modificadas (GM). O Brasil é o segundo maior produtor mundial, ocupando uma área de 44,2 milhões de hectares em 2015 (JAMES, 2016). Vários eventos comerciais de milho GM expressando proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) estão sendo cultivados no Brasil.

Diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de avaliar o impacto de eventos de milho GM para resistência a insetos sobre a microbiota do solo (CASTALDINI et al., 2005; ZENG et al., 2014). Porém, os resultados obtidos por esses trabalhos são controversos e escassos em condições tropicais. A influência das proteínas Bt sobre a composição da microbiota ainda é pouco compreendida. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto de sete eventos comerciais de milho Bt sobre a comunidade microbiana do solo.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e preparo do solo rizosférico

Os genótipos comerciais de milho DKB 390 YG, FORMULA TL, MORGAN 20A78HX, DKB 390 PRO X, 2B587 POWER CORE, DKB 390 PRO 2, IMPACTO VIPTERA e seus respectivos isogênicos tratados e não tratados com o inseticida químico Lannate® BR foram cultivados em triplicatas em Janaúba - MG safra 2015/2016. Aos 30 dias (fase vegetativa) e 60 dias (florescimento) após o plantio, foram coletadas raízes de cinco plantas de cada genótipo. Cinco gramas das raízes finas com o solo fortemente aderido (rizosférico) foram colocadas em tubos cônicos e o volume foi completado para 50 mL com solução de pirofosfato de sódio 0,15% (m/v). Após agitação a 130 rpm por 30 min, as raízes foram removidas e 5 mL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo para análise de diversidade metabólica. O restante da amostra foi centrifugado por 30 min a 10.000

rpm, o sobrenadante descartado e o pellet, solo rizosférico, foi armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Biolog

Para a determinação da atividade (AWCD) e diversidade metabólica por meio do índice de diversidade de Shannon (H) foram utilizadas placas Ecoplates com diferentes fontes de carbono (Biolog, Inc., Hayward, CA, EUA). Um volume de 5 mL da solução de pirofosfato de sódio 0,1% (m/v) contendo solo da etapa anterior foi centrifugado por 15 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante foi diluído 50X. Cada poço da placa de Biolog foi inoculado com 120 μL da solução e as placas foram incubadas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Labstems, Multiskan, MS, EUA) com comprimento de onda de 590 nm, nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 h de incubação. A leitura de 72 h (tempo médio) foi utilizada para estimar os valores de AWCD e H (ZAK et al., 1994), que foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

T-RFLP

O DNA genômico do solo rizosférico foi extraído utilizando o kit Power Soil DNA Isolation (MoBIO La., Inc., EUA). Para análise de bactérias, fragmentos do gene 16S rRNA foram amplificados utilizando os primers 8F marcado na posição 5' (6-FAM) e 1492R (LAMONTAGNE et al., 2002). Para a amplificação do gene 23S rRNA de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) foi utilizado *nested*-PCR a partir de reação com primers LR1 e FLR2 (TROUVELOT et al., 1999). Para a 2ª reação de PCR foram utilizados 2,5 μL do produto da 1ª reação e os primers FLR3 (6-FAM) e FLR4 (NED) (GOLLOTTE et al., 2004). Os fragmentos amplificados das regiões 16S e 23S rDNA foram digeridos com as enzimas restrição AluI e TaqI, respectivamente. Os fragmentos de DNA foram detectados no equipamento Genetic Analyzer 3500XL com GeneMapper 5.0. (Applied Biosystems) e analisados no software T-REX (CULMAN et al., 2009). Os dados foram ordenados por escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) a partir de uma matriz de similaridade de Jaccard utilizando o programa Past versão 3.04 (HAMMER et al., 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade e diversidade metabólica

As comunidades bacterianas apresentaram diferenças na utilização das fontes de carbono em função das fases de desenvolvimento da cultura

(coleta) e do material genético (genótipo). As diferenças foram significativas para atividade metabólica (AWCD) e para o índice de Shannon (H). Valores elevados de AWCD (2,2 - 2,6) e H (3,3 - 3,4) foram observados no solo rizosférico em comparação com solo não rizosférico (AWCD = 0,1; H = 2,2 - 2,6). Aos 30 e 60 dias do desenvolvimento da cultura, as comunidades microbianas dos eventos Bt e isogênicos tratados ou não com inseticida químico não apresentaram diferenças significativas na atividade e diversidade metabólica, diferindo apenas em relação ao solo não rizosférico (**Tabela 1**). No entanto, os métodos dependentes do cultivo *in vitro* de microrganismos, como o Biolog, apresentam limitações, uma vez que algumas bactérias não podem ser cultivadas, incorrendo em uma seletividade para determinados grupos de bactérias (ZAK et al., 1994). Portanto, para complementar as análises, a diversidade genética foi avaliada por T-RFLP, uma técnica que independe do cultivo dos microrganismos.

Diversidade genética

Para avaliarmos a influência dos diferentes eventos transgênicos sob a diversidade genética dos microrganismos presentes na rizosfera foi utilizada a técnica de T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism). Nesse estudo, as amostras de solo rizosférico distanciaram-se das amostras de solo não rizosférico na projeção bidimensional das comunidades bacterianas (**Figura 1**), indicando diferenças nítidas na estruturação das comunidades microbianas, que podem ser influenciadas por diversos fatores, como o tipo de solo e exsudação de compostos pela raiz, que podem influenciar no crescimento dos microrganismos da rizosfera (YANG; CROWLEY, 2000). Entretanto, os pontos de ordenação não mostraram uma tendência no agrupamento entre as comunidades bacterianas dos genótipos.

Foi verificada uma tendência de agrupamento de FMA baseada no período da coleta (**Figura 2**), mostrando a importância do estágio de desenvolvimento da planta na modulação da estrutura de FMA. Assim, os pontos de ordenação não mostraram uma tendência no agrupamento entre as comunidades bacterianas e de FMA dos genótipos de milho transgênico e convencional, em consonância com outros estudos (BECKER et al., 2014; ZENG et al., 2014; CHEEKE et al., 2015).

CONCLUSÕES

Os eventos de milho Bt comercializados no Brasil avaliados neste trabalho não apresentam impacto significativo sobre a estrutura das comunidades

bacterianas e de fungos micorrízicos arbusculares do solo, com base nos parâmetros estudados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Célio Ramos das Neves pelo auxílio na coleta das amostras e à Embrapa e Fapemig pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- BECKER, R.; BUBNER, B.; REMUS, R.; WIRTH, S.; ULRICH, A. Impact of multi-resistant transgenic Bt maize on straw decomposition and the involved microbial communities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 73, p. 9-18, 2014.
- CASTALDINI, M.; TURRINI, A.; SBRANA, C.; BENEDETTI, A.; MARCHIONNI, M.; MOCALI, S.; FABIANI, A.; LANDI, S.; SANTOMASSIMO, F.; PIETRANGELI, B.; NUTI, M. P.; MICLAUS, N.; GIOVANNETTI, M. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms, **Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 6719-6729, 2005.
- CHEEKE, T. E.; SCHUTTE, U. M.; HEMMERICH, C. M.; CRUZAN, M. B.; ROSENSTIEL, T. N.; BEVER, J. D. Spatial soil heterogeneity has a greater effect on symbiotic arbuscular mycorrhizal fungal communities and plant growth than genetic modification with *Bacillus thuringiensis* toxin genes. **Molecular Ecology**, Oxford, v.24, p. 2580-2593, 2015.
- CULMAN, S. W.; BUKOWSKI, R.; GAUCH, H. G.; CADILLO-QUIROZ, H.; BUCKLEY, D. H. T-REX: Software for the processing and analysis of T-RFLP data. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 171-180, 2009.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.
- GOLLOTTE, A.; VAN TUINEN, D.; ATKINSON, D. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 14, p. 111-117, 2004.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RIAN, P. D. **Past**: Palaeontological statistics software package for education and data analysis: version. 1.37. 2011. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em: 28 mar. 2016.
- JAMES C. **Global status of commercialized Biotech/GM crops**. Ithaca: ISAAA, 2016.
- LAMONTAGNE, M. G.; MICHEL, JR.; HOLDEN, P. A.; REDDY, C. A. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 49, p. 255-264, 2002.
- TROUVELOT, S.; Van TUINEN, D.; HIJRI, M.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence *in situ* hybridization. **Mycorrhiza**, Amsterdam, v. 8, p. 203-206, 1999.
- YANG, C. H.; CROWLEY, D. E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 66, p. 345-351, 2000.
- ZAK, J. C.; WILLING, M. R.; MOOREHEAD, D. L.; WILDMAN, H. G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1101-1108, 1994.
- ZENG, H.; TAN, F.; ZHANG, Y.; FENG, Y.; SHU, Y.; WANG, J. Effects of cultivation and return of *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize or the diversity of the arbuscular mycorrhizal community in soils and roots of subsequently cultivated conventional maize. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 75, p. 254-263, 2014.

Tabela 1. Atividade (AWCD) e diversidade metabólica (Índice de Shannon - H) determinadas por BILOG da população bacteriana de amostras de solo não rizosférico (controle) e solo rizosférico de sete genótipos comerciais de milho transgênico Bt e respectivos isogênicos, tratados (ISO + I) ou não (ISO) com o inseticida químico Lannate® BR coletadas no Município de Janaúba-MG, safra 2015/2016.

Genótipo	Transgene <i>Bt</i>	Atividade (AWCD)		Diversidade metabólica	
		Coleta 1 30 dias	Coleta 2 60 dias	Coleta 1 30 dias	Coleta 2 60 dias
Solo não rizosférico	-	0,110 a	0,049 a	1,898 a	2,252 a
DKB 390 YG	<i>Cry1Ab</i>	2,535 b	2,407 b	3,389 b	3,348 b
ISO DKB 390	-	2,473 b	2,217 b	3,405 b	3,324 b
ISO DKB 390 + I	-	2,468 b	2,452 b	3,388 b	3,370 b
FÓRMULA TL	<i>Cry1Ab</i>	2,415 b	2,460 b	3,409 b	3,351 b
ISO FÓRMULA	-	2,638 b	2,489 b	3,406 b	3,372 b
ISO FÓRMULA + I	-	2,630 b	2,563 b	3,390 b	3,388 b
MORGAN 20A78 HX	<i>Cry1F</i>	2,428 b	2,444 b	3,398 b	3,357 b
ISO MORGAN	-	2,467 b	2,377 b	3,355 b	3,353 b
ISO MORGAN + I	-	2,555 b	2,478 b	3,398 b	3,347 b
DKB 390 PRO X	<i>Cry1A.105, Cry2Ab2</i>	2,570 b	2,578 b	3,391 b	3,373 b
ISO DKB 390	-	2,473 b	2,217 b	3,405 b	3,324 b
ISO DKB 390 + I	-	2,468 b	2,452 b	3,388 b	3,370 b
2B587 POWER CORE	<i>Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F</i>	2,453 b	2,399 b	3,369 b	3,319 b
ISO 2B587	-	2,415 b	2,341 b	3,398 b	3,380 b
ISO 2B587 + I	-	2,543 b	2,393 b	3,383 b	3,373 b
DKB 390 PRO 2	<i>Cry1A.105, Cry2Ab2</i>	2,532 b	2,345 b	3,412 b	3,345 b
ISO DKB 390	-	2,528 b	2,603 b	3,411 b	3,402 b
ISO DKB 390 + I	-	2,468 b	2,452 b	3,388 b	3,370 b
IMPACTO VIPTERA	<i>Vip3Aa20</i>	2,545 b	2,585 b	3,383 b	3,415 b
ISO IMPACTO	-	2,495 b	2,343 b	3,412 b	3,365 b
ISO IMPACTO + I	-	2,437 b	2,535 b	3,403 b	3,390 b

* Valores seguidos da mesma letra entre linhas não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

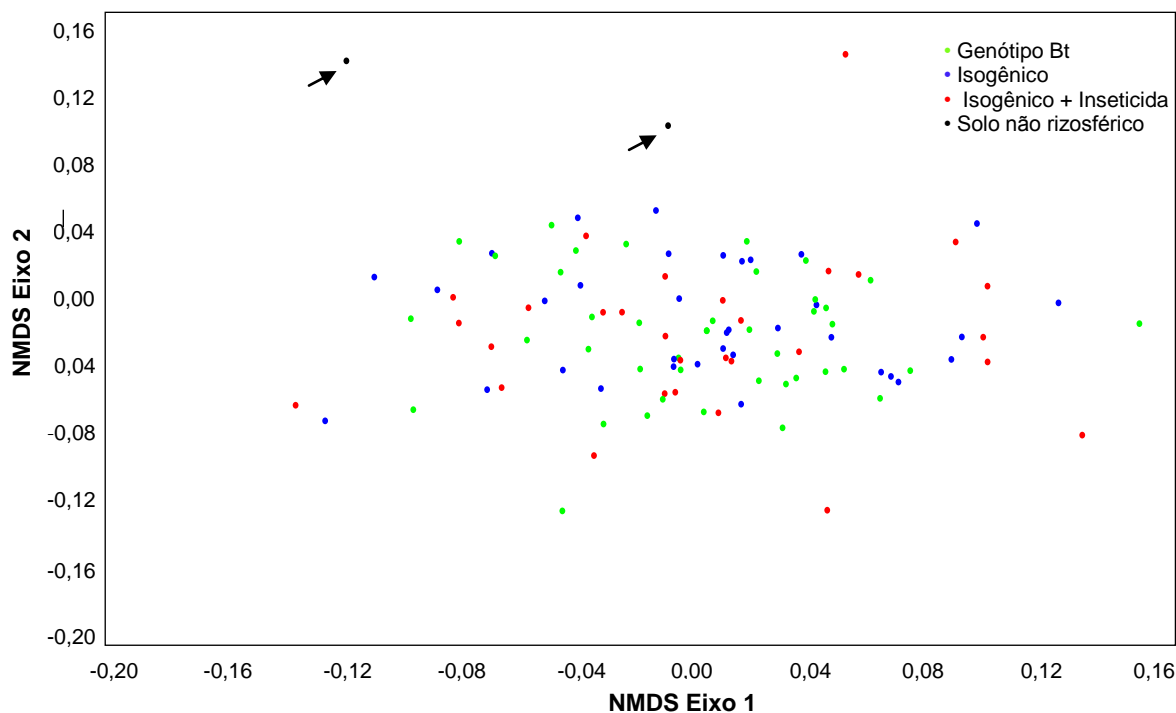


Figura 1. Análise de escalonamento multidimensional não métrico (MDS) da diversidade genética, determinada por T-RFLP, de bactérias de amostras de solo não rizosférico (controle) e solo rizosférico de sete genótipos de milho Bt e isogênicos tratados ou não com o inseticida químico Lannate® BR, coletadas aos 30 e 60 dias após plantio em Janaúba-MG, safra 2015/2016. As setas indicam as amostras de solo não rizosférico.

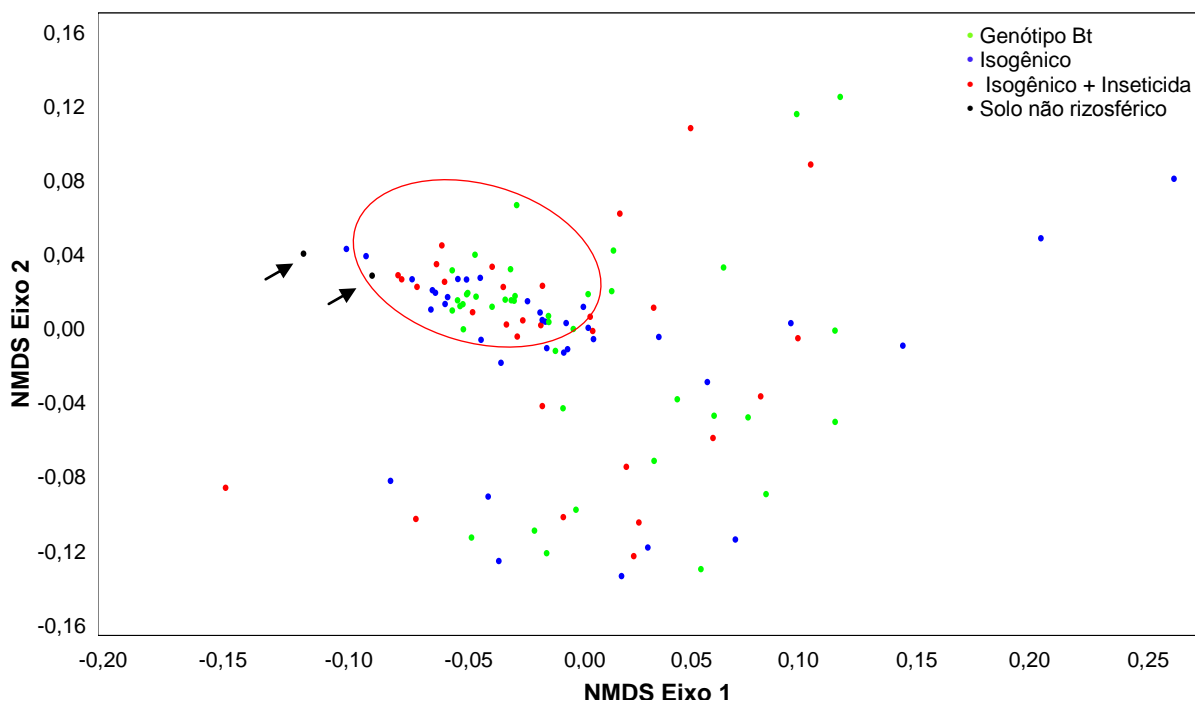


Figura 2. Análise de escalonamento multidimensional não métrico (MDS) da diversidade genética, determinada por T-RFLP, de fungos micorrízicos arbusculares de amostras de solo não rizosférico (controle) e solo rizosférico de sete



genótipos de milho *Bt* e isogênicos tratados ou não com o inseticida químico Lannate® BR, coletadas aos 30 e 60 dias após plantio em Janaúba-MG, safra 2015/2016. As setas indicam o solo não rizosférico e o círculo em vermelho destaca o agrupamento preferencial das amostras coletadas aos 60 dias após o plantio.