

Monitoramento do Impacto do Cultivo de Eventos de Milho Geneticamente Modificado Expressando Proteínas *Bt* sobre as Comunidades Microbianas da Rizosfera



ISSN 1679-0154
Dezembro, 2014

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 105

Monitoramento do Impacto do Cultivo de Eventos de Milho Geneticamente Modificado Expressando Proteínas *Bt* sobre as Comunidades Microbianas da Rizosfera

Eliane Aparecida Gomes
Ubiraci Gomes de Paula Lana
Fernando Augusto Gonçalves dos Santos
Lucas Fernandes Silva
Christiane Abreu de Oliveira Paiva
Fernando Hercos Valicente

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2014

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: cnpms.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Dagma Dionísia da Silva, Maria Marta Pastina, Monica Matoso Campanha, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro e Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Fernando Hercos Valicente

1ª edição

1ª impressão (2014): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Milho e Sorgo

Monitoramento do impacto do cultivo de eventos de milho geneticamente modificado expressando proteínas Bt sobre as comunidades microbianas da rizosfera / Eliane Aparecida Gomes... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2014.

29 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 105).

1. *Zea mays*. 2. Planta transgênica. 3. *Bacillus thuringiensis*. 4. Microbiologia do solo. I. Gomes, Eliane Aparecida. II. Série.

CDD 633.15 (21. ed.)

© Embrapa 2014

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	14
Conclusões	23
Referências	24

Monitoramento do Impacto do Cultivo de Eventos de Milho Geneticamente Modificado Expressando Proteínas *Bt* sobre as Comunidades Microbianas da Rizosfera

*Eliane Aparecida Gomes*¹

*Ubiraci Gomes de Paula Lana*²

*Fernando Augusto Gonçalves dos Santos*³

*Lucas Fernandes Silva*⁴

*Christiane Abreu de Oliveira Paiva*⁵

*Fernando Hercos Valicente*⁶

Resumo

Eventos de milho geneticamente modificado (GM) expressando proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) têm sido cultivados comercialmente no Brasil desde 2008. O monitoramento dessas plantas transgênicas após a liberação comercial deve ser feito a fim de analisar e avaliar os possíveis efeitos ambientais sobre organismos não alvo. Microrganismos no solo podem entrar em contato com as proteínas *Bt* quando estas são liberadas em exsudatos de raízes de milho *Bt* ou tecidos da planta em decomposição, sendo que a influência

¹Bióloga, Ph.D., Pesquisadora em Microbiologia da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, 35701-970. eliane@cnpmc.embrapa.br // Bióloga, D.Sc. em Genética, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, eliane.aparecida@embrapa.br

²Químico, D.Sc. em Genética, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas, MG, ubiraci.lana@embrapa.br

³Estudante de mestrado em Bioengenharia da Universidade Federal de São João Del Rei. lucasfernandes_silva@hotmail.com

⁴Estudante de Biotecnologia da Faculdade Ciências da Vida. nando_biotec@ymail.com

⁵Engenheira Agrônoma, D.Sc. em Biologia Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, christiane.paiva@embrapa.br

⁶Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Entomologia (Genética Molecular), Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, fernando.valicente@embrapa.br

dessas proteínas sobre a composição da microbiota ainda é pouco compreendida. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto de eventos comerciais de milho transgênico expressando proteínas *Bt* na comunidade bacteriana do solo rizosférico. Para este fim, os milhos transgênicos MON 810, *Bt* 11, Herculex, MON 89034, VTPro II e Viptera, seus respectivos isogênicos tratados e não tratados com inseticidas químicos foram avaliados utilizando placas de Biolog EcoPlates™ e DGGE (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante). Os solos rizosféricos foram coletados aos 30 e 60 dias após a germinação em dois ambientes (Sete Lagoas e Janaúba - MG), por três anos consecutivos (safras 2010/2011, 2011/2012 e 2012/2013), sob condições de campo. A atividade e a diversidade metabólica avaliada utilizando o Biolog EcoPlates™ após 72 h de incubação não detectou diferenças entre o milho transgênico e o milho não transgênico. Os valores do índice de diversidade de Shannon demonstraram um alto nível de diversidade na comunidade bacteriana na rizosfera, porém, a análise estatística não revelou diferenças significativas entre os transgênicos, isogênicos e amostras tratadas com inseticida químico. A análise de DGGE também não mostrou diferença entre transgênicos e tratamentos não transgênicos, sendo agrupadas por local do cultivo, mostrando a importância do solo na modulação da comunidade microbiana. Em conclusão, estes resultados demonstraram que os eventos de milho transgênico expressando proteínas *Bt* comercializados no Brasil não apresentaram impacto significativo sobre a estrutura das comunidades bacterianas do solo, com base nos parâmetros estudados.

Palavras-chave: Biolog, DGGE, microbiota, plantas GM, rizosfera, *Zea mays* L.

Monitoring of the Impact of Genetically Modified Maize Cultivation Events Expressing *Bt* Proteins on Rhizosphere Microbial Communities

*Eliane Aparecida Gomes*¹

*Ubiraci Gomes de Paula Lana*²

*Fernando Augusto Gonçalves dos Santos*³

*Lucas Fernandes Silva*⁴

*Christiane Abreu de Oliveira Paiva*⁵

*Fernando Hercos Valicente*⁶

Abstract

Genetically modified (GM) maize events expressing the insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) has been cultivated commercially in Brazil since 2008. The post-release monitoring of transgenic plants should be done in order to assess and evaluate possible environmental effects on non-target organisms. Microorganisms in soil could come into contact with *Bt* proteins when they are released from root exudates of *Bt* maize or from decomposing plant tissue, and the impact of these proteins on the composition of the root-associated microbiota is still poorly understood. The objective of this study was to evaluate the impact of commercial transgenic maize events expressing *Bt* proteins on bacterial community in the rhizosphere. To this end, the transgenic maize genotypes MON 810, *Bt* 11, Herculex, MON 89034, VTPro II and Viptera, and their respective isogenics treated and not treated with chemical insecticides were assessed using Biolog EcoPlates™ and DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). The rhizosphere soil was collected at 30 and 60 days after germination in two

different environments (Sete Lagoas and Janaúba - MG), for three consecutive years (2010/2011, 2011/2012 e 2012/2013), under field conditions. The activity and metabolic diversity evaluated using the Biolog EcoPlates™, after 72 h of incubation, showed no differences between transgenic and non-transgenic maize. The values of Shannon diversity index demonstrated a high level of diversity in the rhizosphere bacterial community; however, the statistical analysis indicated no significant differences among transgenic, isogenic counterparts and samples sprayed with chemical insecticide. The DGGE analysis also did not show difference between transgenic and non-transgenic treatments, but the samples were grouped by local of cultivation, showing the importance of soil modulating the microbial community. In conclusion, transgenic maize events expressing *Bt* proteins cultivated in Brazil showed no significant impact on the soil bacterial community structures based on the parameters studied.

Key-words: Biolog, DGGE, GM plant, microbiota, rhizosphere, *Zea mays* L.

Introdução

A rizosfera, zona da raiz diretamente circundada e influenciada pelas raízes das plantas e seus exsudatos, possui uma concentração de microrganismos, aproximadamente, dez vezes maior do que a encontrada no solo não rizosférico. Isto se deve à presença de altos níveis de nutrientes, na forma de secreções e exsudatos, liberados pelas raízes de plantas promovendo o chamado “efeito rizosfera” (BOWEN; ROVIRA, 1991). Logo, uma alteração na composição dos exsudatos pode alterar a biodiversidade e a atividade da comunidade microbiana,

gerando, eventualmente, microfloras específicas para diferentes cultivares (GRANSEE, 2001; HUANG et al., 2014).

Alterações na composição dos exsudatos das raízes podem ocorrer por causa de fatores que afetam a expressão de genes por variações naturais ou introduzidas via transgenia. Desse modo, em razão da importância dos possíveis impactos ambientais das plantas transgênicas sobre a microbiota do solo e por ser uma exigência dos órgãos regulamentares e da legislação de biossegurança, o desenvolvimento de pesquisas e metodologias para avaliar as comunidades microbiológicas no campo e em casa de vegetação torna-se fundamental (VASCONCELOS; CARNEIRO, 2013).

As proteínas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) expressas em vários eventos comerciais de milho transgênico resistentes a insetos são liberadas no solo durante todo o seu ciclo de vida da planta, como resultado de exsudação radicular, dano natural sofrido pela planta, envelhecimento das raízes, deposição de pólen e resíduos de plantas após a coleta (SAXENA et al., 2002a; BAUMGARTE; TEBBE, 2005). As proteínas podem permanecer ativas no solo, ligadas a argilas e ao ácido húmico por mais de 200 dias, podendo mover-se verticalmente no solo para diferentes profundidades, dependendo do teor de argila (SAXENA; STOTZKY, 2000; SAXENA et al., 2002a,b). A degradação de proteínas *Bt* pelos microrganismos do solo pode afetar a estrutura da comunidade bacteriana associada à rizosfera do milho transgênico, visto que os microrganismos que utilizarem preferencialmente esta proteína como fonte de energia seriam selecionados, modificando a estrutura da comunidade (SAXENA et al., 2002b; BAUMGARTE; TEBBE, 2005; DOHRMANN et al., 2013).

Diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de avaliar o impacto de eventos de milho geneticamente modificado para resistência a insetos na microbiota do solo (SAXENA; STOTZKY, 2001; BAUMGARTE; TEBBE, 2005; CASTALDINI et al., 2005; BECKER et al., 2014; ZENG et al., 2014). Porém, os resultados obtidos por esses trabalhos são bastante controversos e praticamente ausentes em solos tropicais. Alguns trabalhos descrevem alteração da comunidade microbiana da rizosfera, principalmente em relação ao isolamento de bactérias aeróbias e fungos (MOTAVALLI et al., 2004). No trabalho de Castaldini et al. (2005) foi observada, além da alteração na estrutura da comunidade de bactérias da rizosfera e na taxa de respiração do solo, uma menor colonização pelos fungos micorrízicos arbusculares no milho transgênico *Bt* quando comparado ao genótipo equivalente não transgênico (CASTALDINI et al., 2005). No entanto, a maioria das pesquisas sugere que os exsudatos das plantas geneticamente modificadas (GM) não causam alterações significativas na microbiota do solo e que estas diferenças são sazonais e dependentes da espécie de planta, o gene específico, a composição genética do híbrido onde o gene é expresso e do tipo de manejo do solo (SAXENA; STOTZKY, 2001; GYAMFI et al., 2002; HEUER et al., 2002; SCHMALENBERGER; TEBBE, 2003; MULDER et al., 2006; COTTA et al., 2013; BECKER et al., 2014; ZENG et al., 2014).

Existem numerosos métodos para avaliar as comunidades microbianas do solo, incluindo cultivo dos microrganismos e técnicas moleculares que independem do crescimento. O cultivo dos microrganismos usualmente não é capaz de detectar efeitos significativos das plantas GM nas comunidades microbianas (DONEGAN et al., 1995; SAXENA; STOTZKY,

2001; WU et al., 2004), uma vez que a grande maioria dos microrganismos é recalcitrante ao crescimento em meio de cultivo seletivo (LEADBETTER, 2003; PHAM; KIM, 2012). Portanto, para medir os efeitos nas comunidades microbianas, esta técnica deve ser combinada com outros métodos, como o BIOLOG, que avalia a utilização de diferentes substratos pelos microrganismos, também conhecido como *fingerprinting* metabólico (DONEGAN et al., 1995; GIOVANNI et al., 1999; GRIFFITHS et al., 2000; HEUER et al., 2002; DUNFIELD; GERMIDA, 2003; TESFAYEA et al., 2003) e técnicas de biologia molecular. As técnicas moleculares que avaliam genes funcionais ou os genes que codificam o DNA ribossômico (rDNA) apresentam como principal vantagem a possibilidade de detecção de microrganismos não cultiváveis, por meio da extração do DNA diretamente do solo rizosférico e posterior amplificação, por PCR, utilizando *primers* específicos para determinados grupos de organismos. Entre os métodos de análise baseados no rDNA, o DGGE (eletroforese em gel de gradiente desnaturante), técnica baseada na separação de fragmentos do rDNA, amplificados por PCR, em gel de poliacrilamida contendo um gradiente desnaturante linear, tem sido a mais utilizada.

Para uma avaliação mais acurada e extensiva dos efeitos das plantas GM sobre a comunidade microbiana do solo, é necessária a utilização de diferentes métodos que fornecerão informações complementares, de acordo com as vantagens e desvantagens de cada um. Este conhecimento permitirá a definição de metodologias eficientes e rápidas para monitorar o impacto de culturas transgênicas, em condições tropicais, norteando as pesquisas e os processos decisórios dos órgãos

de biossegurança, garantindo a segurança das plantas GM no ecossistema do solo.

Neste trabalho, foram avaliadas as comunidades microbianas da rizosfera de seis genótipos comerciais de milho expressando proteínas *Bt* e seus respectivos genótipos isogênicos tratados e não tratados com inseticidas químicos, cultivados em dois ambientes durante três anos, visando o estabelecimento de metodologias para avaliação dos impactos de culturas transgênicas sobre a microbiota do solo.

Material e Métodos

Coleta e Preparo das Amostras de Solo Rizosférico

Por três anos consecutivos (safras 2010/2011, 2011/2012 e 2012/2013), os genótipos comerciais de milho *Bt*, MON 810, *Bt* 11, Herculex, MON 89034, e por dois anos consecutivos (safras 2011/2012 e 2012/2013), os eventos VTPro II e Impacto Viptera e seus respectivos genótipos isogênicos (possuem exatamente os mesmos genes, sendo a única diferença a inserção dos genes para a obtenção dos genótipos transgênicos), tratados e não tratados com inseticidas químicos foram cultivados em triplicatas em Sete Lagoas (MG) e Janaúba (MG). Aos 30 e 60 dias após o plantio, foram coletadas raízes de cinco plantas com o solo aderido e agitadas para separar o solo fracamente ligado a elas. Cinco gramas das raízes com o solo rizosférico aderido 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 por 30 min em homogeneizador horizontal (130 rpm), as raízes foram removidas e 5 mL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo para distribuição nas placas de

Biolog (ver abaixo). O restante da amostra foi transferido para tubos de centrifuga de teflon de 50 mL e centrifugado por 30 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, o pellet (solo) foi ressuspendido em 1,8 mL de água ultrapura autoclavada e transferido para tubos do **FastDNA spin kit for Soil Protocol (MPBiomedicals, Solon, OH, EUA)**, para extração do DNA. Após centrifugação a 14.000 rpm por 4 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C até a extração de DNA.

Diversidade Metabólica

Para determinação da diversidade funcional microbiana foi utilizada a metodologia descrita por Zak et al. (1994) e placas denominadas “Ecoplates”[®] (Biolog, Inc., Hayward, CA, USA), em que cada placa apresenta três grupos iguais de 31 substratos diferentes (ácidos carboxílicos, carboidratos, polímeros, aminoácidos, amidos), cavidades controle sem substrato e violeta tetrazol como corante indicador do potencial redox. Amostras de solo da rizosfera obtidas na etapa anterior (5 mL) foram centrifugadas a 1.800 x g durante 15 min, diluídas 10X em água ultrapura e 120 µL do extrato do solo obtido foram inoculados em cada cavidade das placas e incubadas no escuro durante 5 dias a 28 °C. A leitura das placas, ou seja, o desenvolvimento de cor pela oxidação de substratos durante a respiração dos microrganismos, foi realizada por um espectrofotômetro leitor de placas (Labstems, MultSkán, MS) em 590 nm, nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Os componentes da atividade total e diversidade genética (Índice de Shannon) foram estimados de acordo com Zak et al. (1994). Os valores da atividade total foram transformados utilizando-se AWCD (*Average Well Colour Development* - média

das leituras dos 31 substratos de cada amostra e repetição) de acordo com Garland e Mills (1991). Os valores acima de zero foram considerados reação positiva (evidência de utilização de substrato) e os valores negativos indicaram ausência de uso do substrato.

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento inteiramente casualizado e teste Tukey para detectar diferenças entre as médias. Os dados de atividade total (transformada) e índice de diversidade de Shannon foram utilizados para análise de agrupamento pelo método dos componentes principais (PCA) usando o programa Past versão 3.04 (HAMMER et al., 2001). Para esta última análise foram utilizados os dois últimos anos de coleta.

Extração de DNA do Solo e Amplificação por PCR

O DNA total foi extraído do solo rizosférico utilizando-se o **FastDNA spin kit for Soil Protocol**, de acordo com recomendações do fabricante. Para a amplificação do DNA da população de bactérias foram utilizados os primers F968CG (contendo uma sequência CG-grampo de 40 pares de bases) e R1401 (NÜBEL et al., 1996), que amplificam uma região do gene 16S rRNA de procariotos. Cada reação de PCR foi realizada em microtubo contendo 5 µl do tampão de PCR 10X, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 µM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, 0,5 ul de formamida HiDi, e 1 U de *Taq* DNA polimerase, 5 µl de DNA 10 ng/ul e água ultrapura estéril num volume de 50 µl. O ciclo utilizado foi 1X (2 min 95 °C); 35X (30 seg 94 °C; 30 seg 57 °C e 1 min 72 °C); 1X (5 min 72 °C); 10 °C.

Análise dos Produtos de PCR por Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (DGGE)

Amostras de PCR foram carregadas em gel de 6% de poliacrilamida em tampão TAE 0,5X (Tris-acetato 20 mM e EDTA 0,5 mM), contendo, de 4 a 65% de agentes desnaturantes (ureia e formamida deionizada). A separação dos fragmentos amplificados por PCR foi feita utilizando o equipamento DCode™ Detection Mutation System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) de acordo com o protocolo estabelecido por Muyzer et al. (1998). O gel foi submetido à eletroforese durante 16 horas a 60 °C e 75 V e corado em solução de Gel Red™ (Biotium, Hayward, Califórnia, USA) diluída 3.300 x em 0,1 M NaCl por 30 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Gel Logic 200 (KODAK Company, Rochester, NY, USA). Para a análise dos dados, foi inferida uma matriz de de similaridade entre as amostras a partir da imagem do gel de DGGE usando o programa BioNumerics versão 6.1 (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica) com o método Dice e uma tolerância de posição 1%. Posteriormente foi construído um dendrograma pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group With Mathematical Average*).

Resultados e Discussão

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de plantas GM, o que torna fundamental o monitoramento do impacto dessas plantas sobre a microbiota do solo para o bom equilíbrio do ecossistema agrícola. A maioria dos estudos com transgênicos foi realizada em países de clima temperado que apresentam condições de cultivo (tipo e composição dos solos, época do ano de cultivo, variação de temperatura, regime de chuvas, entre outros) diferentes das encontradas no Brasil.

Atividade Metabólica e Índice de Diversidade

A análise das placas de Biolog mostrou que a utilização dos substratos medida pelo desenvolvimento de cor e cálculo da atividade dos microrganismos foi diferente ao longo do tempo de incubação para cada amostra (dados não mostrados).

A leitura de 72 h foi utilizada para cálculos dos componentes da diversidade funcional por representar o tempo médio entre as leituras realizadas. Os valores do índice de diversidade de Shannon demonstraram um alto nível de diversidade genética das comunidades bacterianas da rizosfera. No entanto, a análise estatística indicou não haver diferenças entre os genótipos transgênicos e os genótipos isogênicos não transgênicos tratados e não tratados com inseticidas químicos. Algumas diferenças foram observadas na atividade dos microrganismos na coleta aos 60 dias do segundo ano em Sete Lagoas e na atividade e índice de diversidade de Shannon também na coleta aos 60 dias do terceiro ano em Janaúba. No entanto, não foi observada nenhuma tendência de separação dos genótipos transgênicos dos respectivos genótipos isogênicos nestas avaliações (Tabelas 1, 2 e 3).

Tabela 1. Atividade e diversidade metabólica (índice de Shannon) de bactérias de amostras de solo rizosférico de quatro genótipos de milho *Bt* e isogênicos cultivados na safra 2010/2011, tratados (Iso+Q) ou não com inseticidas (Iso) coletados aos 30 e 60 dias após o plantio em Sete Lagoas (MG) e Janaúba (MG), conforme a utilização de substratos após 72 h de incubação.

SETE LAGOAS/ ANO 1 (SAFRA 2010-2011)				
Genótipo	Atividade		Índice de Shannon	
	Coleta 1 30 dias	Coleta 2 60 dias	Coleta 1 30 dias	Coleta 2 60 dias
MON 810	17,65 a	30,24 a	3,41 a	3,42 a
Iso MON 810	15,50 a	29,66 a	3,40 a	3,42 a
Iso MON 810+Q	13,94 a	28,87 a	3,40 a	3,42 a
Bt 11	18,51 a	29,39 a	3,41 a	3,42 a
Iso Bt 11	14,53 a	29,97 a	3,39 a	3,42 a
Iso Bt 11+Q	16,24 a	29,43 a	3,39 a	3,42 a
Herculex	17,74 a	30,59 a	3,39 a	3,42 a
Iso Herculex	17,35 a	29,53 a	3,40 a	3,42 a
Iso Herculex+Q	15,08 a	29,22 a	3,38 a	3,42 a
MON 89034	16,08 a	30,10 a	3,38 a	3,42 a
Iso MON 89034	15,94 a	29,29 a	3,38 a	3,42 a
Iso MON 89034+ Q	15,94 a	29,30 a	3,40 a	3,42 a

JANAÚBA/ ANO 1 (SAFRA 2010-2011)				
Genótipo	Atividade		Índice de Shannon	
	Coleta 1 30 dias	Coleta 2 60 dias	Coleta 1 30 dias	Coleta 2 60 dias
MON 810	16,86 a	16,46 a	3,41 a	3,37 a
Iso MON 810	19,84 a	17,45 a	3,42 a	3,41 a
Iso MON 810+Q	18,08 a	15,82 a	3,40 a	3,42 a
Bt 11	18,84 a	23,57 a	3,41 a	3,41 a
Iso Bt 11	19,09 a	16,21 a	3,41 a	3,41 a
Iso Bt 11+Q	18,26 a	17,23 a	3,40 a	3,41 a
Herculex	20,53 a	19,94 a	3,42 a	3,43 a
Iso Herculex	20,60 a	20,06 a	3,42 a	3,42 a
Iso Herculex+Q	19,64 a	17,40 a	3,42 a	3,41 a
MON 89034	18,47 a	17,14 a	3,41 a	3,42 a
Iso MON 89034	20,05 a	19,67 a	3,42 a	3,42 a
Iso MON 89034+ Q	18,83 a	18,25 a	3,42 a	3,41 a

Tabela 2. Atividade e diversidade metabólica (índice de Shannon) de bactérias de amostras de solo rizosférico de seis genótipos de milho *Bt* e isogênicos cultivados na safra 2011/2012, tratados (Iso+Q) ou não com inseticidas (Iso) coletados aos 30 e 60 dias após o plantio em Sete Lagoas (MG) e Janaúba (MG), conforme a utilização de substratos após 72 h de incubação.

SETE LAGOAS/ ANO 2 (SAFRA 2011-2012)				
Genótipo	Atividade		Índice de Shannon	
	Coleta 1 30 dias	Coleta 2 60 dias	Coleta 1 30 dias	Coleta 2 60 dias
MON 810	13,26 a	18,30 b	3,10 a	3,29 a
Iso MON 810	14,52 a	16,72 b	3,18 a	3,31 a
Iso MON 810+Q	15,97 a	17,19 b	3,30 a	3,32 a
Bt 11	12,68 a	18,60 b	3,13 a	3,33 a
Iso Bt 11	16,81 a	15,59 a	3,27 a	3,30 a
Iso Bt 11+Q	14,84 a	18,74 b	3,19 a	3,30 a
Herculex	13,51 a	19,17 b	3,20 a	3,32 a
Iso Herculex	15,53 a	15,38 a	3,23 a	3,34 a
Iso Herculex+Q	15,59 a	18,91 b	3,27 a	3,31 a
MON 89034	12,31 a	17,97 b	3,19 a	3,31 a
Iso MON 89034	17,45 a	19,32 b	3,24 a	3,30 a
Iso MON 89034+ Q	14,19 a	15,77 a	3,15 a	3,34 a
VT Pro II	13,25 a	14,53 a	3,14 a	3,34 a
Iso VT Pro II	14,10 a	13,39 a	3,23 a	3,32 a
Iso VT Pro II+Q	18,23 a	17,70 b	3,31 a	3,33 a
Impacto víptera	16,54 a	13,63 a	3,26 a	3,25 a
Iso Impac VIP	9,93 a	14,13 a	2,91 a	3,30 a
Iso Impac VIP+Q	15,50 a	17,17 b	3,26 a	3,32 a

JANAÚBA/ ANO 2 (SAFRA 2011-2012)				
Genótipo	Atividade		Índice de Shannon	
	Coleta 1 30 dias	Coleta 2 60 dias	Coleta 1 30 dias	Coleta 2 60 dias
MON 810	15,63 a	18,84 a	3,39 a	3,34 a
Iso MON 810	12,09 a	19,70 a	3,32 a	3,38 a
Iso MON 810+Q	17,65 a	18,69 a	3,40 a	3,33 a
Bt 11	13,29 a	15,80 a	3,36 a	3,28 a
Iso Bt 11	14,54 a	14,94 a	3,53 a	3,30 a
Iso Bt 11+Q	14,68 a	18,01 a	3,38 a	3,37 a
Herculex	16,80 a	17,35 a	3,38 a	3,30 a
Iso Herculex	15,24 a	17,35 a	3,35 a	3,33 a
Iso Herculex+Q	14,70 a	18,28 a	3,38 a	3,34 a
MON 89034	14,03 a	16,77 a	3,37 a	3,33 a
Iso MON 89034	14,00 a	21,00 a	3,38 a	3,73 a
Iso MON 89034+ Q	14,33 a	15,81 a	3,37 a	3,32 a
VT Pro II	15,65 a	17,67 a	3,39 a	3,35 a
Iso VT Pro II	13,69 a	18,72 a	3,36 a	3,37 a
Iso VT Pro II+Q	17,06 a	18,35 a	3,38 a	3,34 a
Impacto víptera	17,91 a	17,44 a	3,40 a	3,34 a
Iso Impac VIP	15,68 a	18,79 a	3,38 a	3,37 a
Iso Impac VIP+Q	15,94 a	20,17 a	3,38 a	3,36 a

Tabela 3. Atividade e diversidade metabólica (índice de Shannon) de bactérias de amostras de solo rizosférico de seis genótipos de milho *Bt* e isogênicos cultivados na safra 2012/2013, tratados (Iso+Q) ou não com inseticidas (Iso) coletados aos 30 e 60 dias após o plantio em Sete Lagoas (MG) e Janaúba (MG), conforme a utilização de substratos após 72 h de incubação.

SETE LAGOAS/ ANO 3 (SAFRA 2012-2013)				
Genótipo	Atividade		Índice de Shannon	
	Coleta 1 30 dias	Coleta 2 60 dias	Coleta 1 30 dias	Coleta 2 60 dias
MON 810	21.83 a	23.58 a	3.36 a	3.38 a
Iso MON 810	21.71 a	26.27 a	3.37 a	3.47 a
Iso MON 810+Q	16.84 a	18.73 a	3.29 a	3.35 a
Bt 11	22.11 a	22.96 a	3.38 a	3.38 a
Iso Bt 11	20.81 a	25.01 a	3.35 a	3.41 a
Iso Bt 11+Q	22.34 a	19.78 a	3.36 a	3.37 a
Herculex	-	21.42 a	-	3.33 a
Iso Herculex	17.51 a	25.57 a	3.29 a	3.40 a
Iso Herculex+Q	22.60 a	21.49 a	3.39 a	3.37 a
MON 89034	17.03 a	22.06 a	3.34 a	3.36 a
Iso MON 89034	20.32 a	25.69 a	3.36 a	3.40 a
Iso MON 89034+ Q	21.70 a	23.51 a	3.34 a	3.40 a
VT Pro II	24.68 a	22.31 a	3.40 a	3.35 a
Iso VT Pro II	19.82 a	25.63 a	3.36 a	3.40 a
Iso VT Pro II+Q	23.02 a	26.27 a	3.39 a	3.41 a
Impacto víptera	24.76 a	21.15 a	3.40 a	3.37 a
Iso Impac VIP	20.05 a	24.87 a	3.34 a	3.40 a
Iso Impac VIP+Q	25.55 a	21.69 a	3.40 a	3.35 a

JANAÚBA/ ANO 3 (SAFRA 2012-2013)				
Genótipo	Atividade		Índice de Shannon	
	Coleta 1 30 dias	Coleta 2 60 dias	Coleta 1 30 dias	Coleta 2 60 dias
MON 810	29.21 a	26.28 b	3.42 a	3.40 b
Iso MON 810	27.98 a	23.62 a	3.41 a	3.38 a
Iso MON 810+Q	27.41 a	26.82 b	3.42 a	3.40 b
Bt 11	27.51 a	26.39 b	3.42 a	3.42 b
Iso Bt 11	27.80 a	27.23 b	3.42 a	3.41 b
Iso Bt 11+Q	29.64 a	23.96 a	3.42 a	3.39 b
Herculex	26.57 a	-	3.40 a	-
Iso Herculex	28.57 a	26.04 b	3.42 a	3.40 b
Iso Herculex+Q	28.62 a	22.63 a	3.41 a	3.37 a
MON 89034	28.41 a	25.17 b	3.42 a	3.39 b
Iso MON 89034	28.57 a	28.20 b	3.42 a	3.41 b
Iso MON 89034+ Q	28.20 a	26.10 b	3.42 a	3.41 b
VT Pro II	28.32 a	28.34 b	3.42 a	3.42 b
Iso VT Pro II	28.39 a	23.91 a	3.42 a	3.40 b
Iso VT Pro II+Q	28.39 a	21.32 a	3.42 a	3.38 a
Impacto víptera	29.07 a	24.07 a	3.41 a	3.40 b
Iso Impac VIP	29.69 a	27.01 b	3.42 a	3.42 b
Iso Impac VIP+Q	27.55 a	22.76 a	3.41 a	3.40 b

De forma complementar, utilizando ferramentas estatísticas como o agrupamento pelo método dos componentes principais (PCA) foi possível ratificar as informações geradas a partir dados apresentados acima, indicando não haver nenhum tipo de agrupamento separando os genótipos transgênicos dos genótipos convencionais (Figura 1).

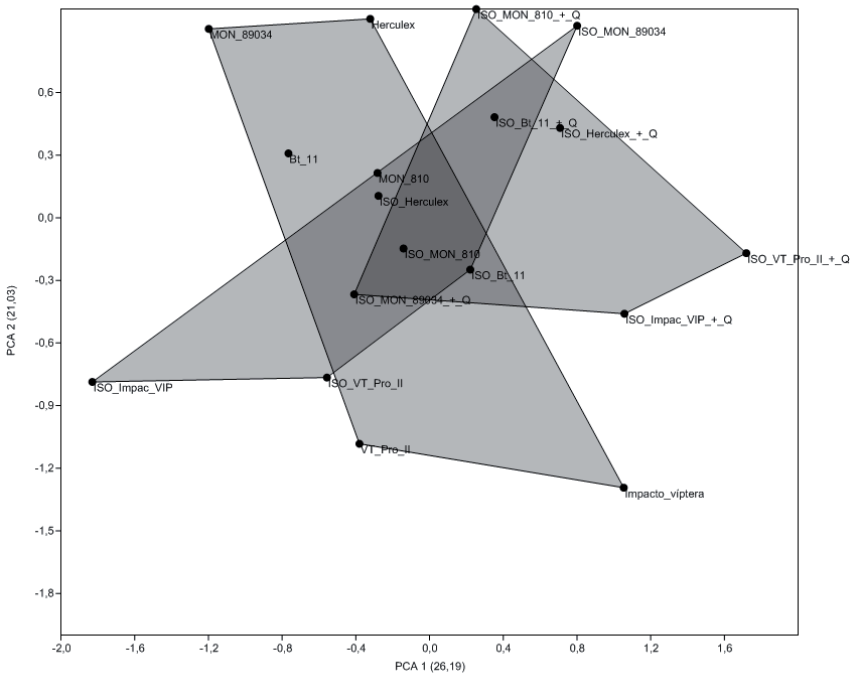


Figura 1. Análise de agrupamento por componentes principais (PCA) da atividade e diversidade metabólica (índice de Shannon) de bactérias de amostras de solo rizosférico de seis genótipos de milho *Bt* e isogênicos tratados (Iso+Q) ou não com inseticidas (Iso).

Análise do Perfil Genético por DGGE

Os procedimentos para extração de DNA e a amplificação dos fragmentos desejados permitiram a recuperação dos amplicons a partir do DNA extraído do solo rizosférico de milho transgênico e convencional. As amostras foram avaliadas em triplicatas para cada local de cultivo, genótipo e estágio de crescimento das plantas, obtendo-se padrões de DGGE dos fragmentos do gene bacteriano 16S rDNA bastante similares entre as repetições em todos os tratamentos avaliados. De uma maneira geral, as comunidades microbianas avaliadas apresentaram um perfil similar na análise de agrupamento hierárquico dos amplicons para todos os genótipos, independentemente da presença do transgene ou do tratamento com inseticidas químicos, ou seja, não foi possível detectar qualquer diferença no padrão de bandas dos géis das comunidades avaliadas que possa ser associada ao genótipo de milho. Ao contrário, é evidente em todos os tratamentos, o agrupamento das amostras por local de cultivo (Sete Lagoas e Janaúba), evidenciando a importância do solo e do local de amostragem como um agente modulador das comunidades microbianas. Como o agrupamento hierárquico em cada ano foi semelhante, a Figura 2 mostra os resultados referentes às amostras coletadas na safra 2012/2013 (Figura 2). Assim como o ambiente, o estágio de desenvolvimento das plantas exerce uma influência significativa na estrutura e organização das comunidades microbianas associadas à rizosfera dos genótipos de milho utilizados no estudo, pois é possível observar uma diferença no perfil de agrupamento das amostras em função do período de coleta das amostras (30 e 60 dias após o plantio).

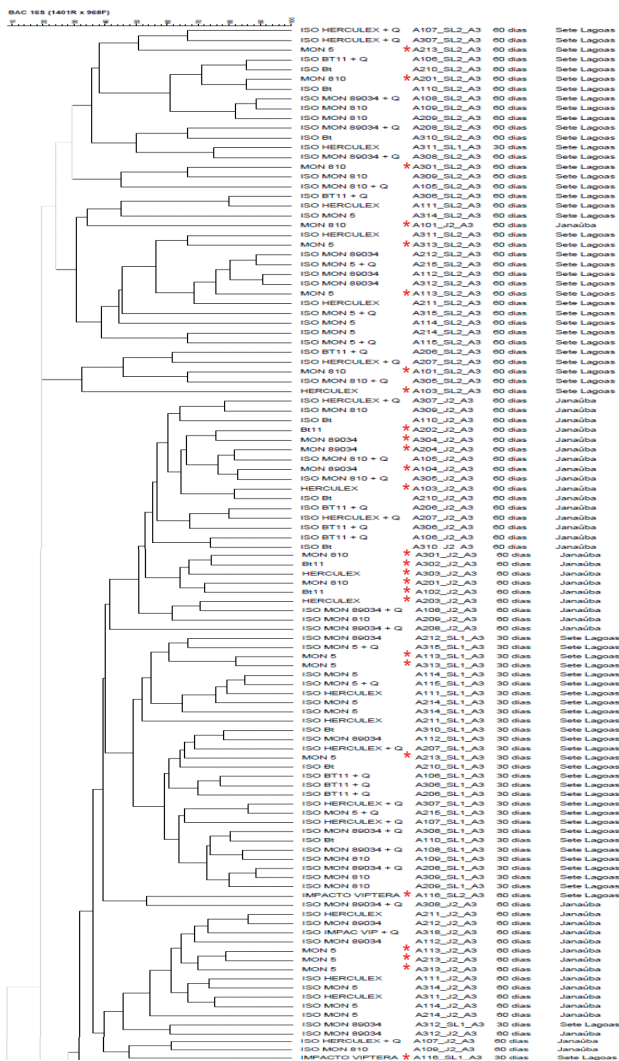


Figura 2. Análise de agrupamento UPGMA baseado nos perfis de DGGE da comunidade bacteriana de amostras de solo rizosférico de seis genótipos de milho *Bt* e isogênicos tratados (Iso+Q) ou não com inseticidas (Iso) no terceiro ano de plantio (safra 2012/2013). Asterisco (*) indica genótipos transgênicos.

Cotta et al. (2013) utilizaram metodologias independentes de cultivo, como DGGE e PCR quantitativo, para avaliar a comunidade microbiana da rizosfera de dois milhos *Bt* (milho Guardian e milho Herculex). Estes autores observaram que, independentemente da técnica utilizada e da comunidade avaliada, não foi possível observar uma variação significativa entre as amostras em função do genótipo do milho, sendo que o tempo de cultivo e o tipo de solo foram mais importantes para a estruturação e organização das comunidades microbianas.

Outros autores, como Zeng et al. (2014), compararam a diversidade e composição da comunidade de fungos micorrízicos entre dois milhos *Bt* (*Bt* 11 e MON 810) e seus isogênicos não convencionais depois de cultivar por dois ciclos e retornar os restos de cultura. Os dados revelam que a diversidade dos fungos micorrízicos não diferiu significativamente nos solos e raízes cultivadas do milho convencional cultivado com os restos da cultura do milho *Bt*. Becker et al. (2014) também não observaram impacto adverso do milho *Bt* multirresistente MON 89034 × MON 88017 que contém três proteínas Cry recombinantes na decomposição da palha e na comunidade microbiana em comparação com os híbridos convencionais isogênicos.

Conclusões

Não foi possível observar uma variação significativa entre os tratamentos em função do genótipo do milho, sendo o tempo de cultivo e o tipo de solo os fatores mais importantes para a estruturação e organização das comunidades microbianas.

A técnica de Biolog foi menos sensível na detecção das diferenças em comparação com o DGGE, uma vez que, de uma maneira geral, a análise de DGGE mostrou uma separação dos grupos com base nos locais e datas de coleta, enquanto no Biolog estas diferenças não foram observadas. Entretanto, são técnicas complementares e deverão ser utilizadas conjuntamente.

Referências

BAUMGARTE, S.; TEBBE, C. C. Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab *Bt*-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p. 2539-2551, 2005.

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.

BOWEN G. D.; ROVIRA, A. D. The rhizosphere, the hidden half of the hidden half. In: WAISEL, Y; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. (Ed.). **Plant roots, the hidden hay**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 641-629.

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. **Applied and**

Environmental Microbiology, Washington, v. 71, p. 6719-6729, 2005.

COTTA, S. R.; DIAS, A. C. F.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; VAN ELSAS, J. D.; SELDIN, L. Temporal dynamics of microbial communities in the rhizosphere of two genetically modified (GM) maize hybrids in tropical agrosystems. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.103, p. 589-601, 2013.

DOHRMANN, A. B.; KÜTING, M.; JÜNEMANN, S.; JAENICK, S.; SCHLÜTER, A.; TEBBE, C. C. Importance of rare taxa for bacterial diversity in the rhizosphere of *Bt*- and conventional maize varieties. **The ISME Journal**, v. 7, p. 37-49, 2013.

DONEGAN, K. K.; PALM, C. J.; FIELAND, V. J.; PORTEOUS, L. A.; GANIO, L. M.; SCHALLER, D. L.; BUCAO, L. Q.; SEIDLER, R. J. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurtaki* endotoxin. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 2, p. 111-124, 1995.

DUNFIELD, K. E.; GERMIDA, J. J. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7310-7318, 2003.

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

GIOVANNI, G. D.; WATRUD, L. S.; SEIDLER, R. J.; WIDMER, F. Comparison of parental and transgenic alfalfa rhizosphere bacterial communities using Biolog GN metabolic fingerprinting and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR). **Microbiology Ecology**, v. 37, p. 129-139, 1999.

GRIFFITHS, B. S.; GEOGHEGAN, I.; ROBERTSON, W. M. Testing genetically engineered potato, producing the lectins GNA and ConA, on non-target soil organisms and processes. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 37, p. 159-170, 2000.

GRANSEE, A. Effects of root exudates on nutrient availability in the rhizosphere. **Plant Nutrition. Developments in Plant and Soil Sciences**, v. 92, p. 626-627, 2001.

GYAMFI, S.; PFEIFER, U.; STIERSCHNEIDER, M.; SESSITISCH, A. Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Haren, v. 41, p. 181-190, 2002.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 2001. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em: 20 set. 2014.

HEUER, H.; KROPPESTEDT, R. M.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p.1325-1335, 2002.

HUANG, X.-F.; CHAPARRO, J. M.; REARDON, K. F.; ZHANG, R.; SHEN, Q.; VIVANCO, J. M. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. **Botany**, v. 92, p. 267-275, 2014.

LEADBETTER, J. R. Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 274-281, 2003.

MOTAVALLI, P. P.; KREMER, R. J.; FANG, M.; MEANS, N. E. Impact of genetically modified crops and their management on soil microbial mediated plant nutrient transformation. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, p. 816-824, 2004.

MULDER, C.; WOUTERSE, M.; RAUBUCH, M.; ROELOFS, W.; RUTGERS, M. Can transgenic maize affect soil microbial communities? **PLoS Computational Biology**, v. 2, n. 9, p. 1165-1172, 2006.

MUYZER, G.; BRINKHOFF, T.; NUBEL, U.; SANTEGOEDS, C.; SCHAFER, H.; WAWER, C. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: HARDARSON, G.; BROUGHTON, W. J. **Molecular microbial ecology of the soil**. Dordrecht: Kluwer, 1998.

NÜBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 5636-5643, 1996.

PHAM, V. H. T.; KIM, J. Cultivation of unculturable soil bacteria. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 30, n. 9, p. 474-484, 2012.

SAXENA, D.; FLORES, S.; STOTZKY, G. *Bt* toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 133-137, 2002a.

SAXENA, D.; FLORES, S.; STOTZKY, G. Vertical movement in soil of insecticidal Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 111-120, 2002b.

SAXENA, D.; STOTZKY, G. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxin released from root exudates and biomass of *Bt* corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1225-1230, 2001.

SAXENA, D.; STOTZKY, G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic *Bt* corn in vitro and in situ. **FEMS Microbiology Ecology**, Haren, v. 33, p. 35-39, 2000.

SCHMALENBERGER, A.; TEBBE, C. C. Genetic profiling of noncultivated bacteria from the rhizospheres of sugar beet (*Beta vulgaris*) reveal field and annual variability but no effect of a transgenic herbicide resistance. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 49, p. 1-8, 2003.

TESFAYEA, M.; DUFAULT, N. S.; DORNBUSCH, M. R.; ALLAN, D. L.; VANCE, C. P.; SAMAC, D. A. Influence of enhanced

malate dehydrogenase expression by alfalfa on diversity of rhizobacteria and soil nutrient availability. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 1103-1113, 2003.

VASCONCELOS, M. J. V. de; CARNEIRO, A. A. **Biossegurança de plantas geneticamente modificadas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. 10 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 200).

WU, W. X.; YE, Z. F.; MIN, H.; DUAN, X. J.; JIN, W. M. *Bt*-transgenic rice straw affects the culturable microbiota and dehydrogenase and phosphatase activities in a flooded paddy soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 289-295, 2004.

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 on 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.

