



FERTBIO 2012

A responsabilidade socioambiental da pesquisa agrícola
17 a 21 de Setembro - Centro de Convenções - Maceió/Alagoas

Impacto do transgene *ahas* e de herbicidas associados à cultura da soja na comunidade microbiana do solo

Letícia Carlos Babujia^{2,3}, Rosinei Aparecida Souza¹, Adriana Pereira Silva^{1,3}, Talita Busulini Martins^{1,3}, Maria de Fátima Guimarães^{1,3}, Carlos Arrabal Arias³, Mariangela Hungria^{3,*}

¹Universidade Estadual de Londrina, Dept. Agronomia, C.P. 6001, 86051-970, Londrina PR; ²Universidade Estadual de Maringá, Dept. Química, Av. Colombo 5790, 87020-900, MaringáPR; ³Embrapa Soja, C.P. 231, 86001-970, Londrina, PR. E-mail: rosysouza@iapar.br; leticiacb_@hotmail.com. drikapera@yahoo.com.br; mfatima@uel.br; carlos.arias@embrapa.br; mariangela.hungria@embrapa.br

RESUMO – O Brasil ocupa a posição de segundo maior produtor mundial de soja geneticamente modificada [*Glycine max* (L.) Merr.]. Apesar da importância da cultura, ainda há poucos estudos sobre os efeitos causados na comunidade microbiana do solo, pelo cultivo de transgênicos, ou pelo uso de herbicidas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do transgene *ahas* (tolerância a herbicidas do grupo das imidazolinonas) e de herbicidas associados à cultura da soja, na microbiota do solo. Vinte experimentos de campo foram realizados durante três safras (verão de 2006/2007, safriinha de 2007 e verão de 2007/2008), em nove municípios localizados em seis estados brasileiros e no Distrito Federal. Os experimentos foram conduzidos em blocos casualizados com quatro repetições e três tratamentos: 1) Cultivar Conquista (convencional), com herbicidas convencionais (bentazona + acifluorfen de sódio); 2) Cultivar Cultivance (transgênica), com herbicidas convencionais; 3) Cultivar Cultivance, com herbicida do grupo imidazolinona (imazapyr). O solo foi amostrado na camada de 0-10 cm na fase de desenvolvimento R2 e na maturação fisiológica R8. Foram avaliados parâmetros quantitativos (C e N da biomassa microbiana - CBM e NBM) e qualitativos (DGGE da região 16S rDNA do domínio Bactéria). Não foram detectadas diferenças que pudessem ser atribuídas ao manejo da soja (Conquista e herbicidas convencionais x Cultivance e imazapyr), ou ao gene *ahas*, ou aos herbicidas. No entanto, diferenças foram observadas no CBM e no NBM entre os diferentes locais e épocas do ano, assim como para os perfis dos genes 16S rDNA. A comunidade microbiana demonstrou-se sensível e viável para o monitoramento de diferentes tecnologias e métodos de manejo da cultura soja, mas não houve diferenças atribuídas ao gene *ahas* por três temporadas consecutivas de cultivo.

Palavras-chave: Biomassa microbiana do solo, DGGE, Soja transgênica, imidazolinona.

INTRODUÇÃO – A Soja (*Glycine max* (L.) Merr.) geneticamente modificada (GM) foi liberada para comercialização pela primeira vez nos Estados Unidos em 1996. Em 1997, foi desenvolvida uma cultivar de soja contendo o gene *ahas*, resistente ao herbicida do grupo

das imidazolinonas, pela transferência do gene *ahas* de *Arabidopsis thaliana*.

A soja RR foi primeiro aprovada no Brasil em 1998 (CTNBIO, 1998), mas liberada para comercialização apenas em 2005, quando a nova Lei de Biossegurança brasileira foi aprovada. Desde então, a intensidade no uso de herbicidas específicos sobre a cultura tornou-se significativa, com a possibilidade de aplicação em pós-emergência (Petter et al., 2007). Os herbicidas mais utilizados para controlar plantas daninhas na cultura são os do grupo imidazolinona.

Atualmente, a avaliação do impacto ambiental das tecnologias transgênicas vem se tornando obrigação social e ambiental, além de ser uma exigência legal. No que diz respeito ao seu impacto na qualidade do solo, sabe-se que a biomassa microbiana é responsável por funções essenciais, incluindo a mineralização e síntese de matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, controle biológico de doenças e degradação de pesticidas.

O objetivo deste estudo foi realizar uma avaliação em larga escala, envolvendo 20 experimentos de campo ao longo de três safras, para avaliar o impacto da soja transgênica contendo o gene *ahas* e de herbicidas usados no manejo convencional e transgênico da soja na comunidade microbiana do solo.

MATERIAL E MÉTODOS – Os experimentos foram conduzidos ao longo de três safras (verão de 2006/2007, safriinha de 2007 e verão de 2007/2008), em nove locais: Santo Antonio da Posse - SP (EEA), Ponta Grossa – PR (SNT), Londrina – PR (CNPSO), Uberaba – MG (CTTP), Sete Lagoas – MG (CNPMS), Santo Antônio de Goiás - GO (CNPAPF), Brasília – DF (CNPB), Teresina – PI (EMN) e Vilhena – RO (ER), localizados em diferentes condições edafoclimáticas recomendadas para a cultivar Conquista (GM e convencional).

Tratamentos e Amostragem

Os experimentos consistiram de três tratamentos: 1) Cultivance CV127 (soja GM), utilizando exclusivamente imazapyr para o controle de plantas invasoras; 2) Cultivance CV127 (soja GM), com herbicidas convencionais; 3) Conquista (soja parental convencional), com herbicidas convencionais.

Os experimentos foram conduzidos com quatro repetições em um delineamento experimental em blocos ao acaso. As avaliações foram realizadas em duas fases de cultivo da soja, na pré-semeadura e no estádio R2. As amostras foram homogeneizadas e peneiradas (4 mm), imediatamente processadas para a biomassa microbiana e armazenadas a -80°C para a análise da diversidade bacteriana.

O carbono da biomassa microbiana (CBM) foi determinado utilizando o método de fumigação-extração (Vance et al., 1987), uma variação do método de fumigação-incubação proposto por Jenkinson e Powlson (1976). O método envolve a eliminação de microrganismos do solo por fumigação com clorofórmio (CHCl_3) (Jenkinson e Powlson, 1976), seguida pela determinação do C liberado das células lisadas por extração química (Vance et al., 1987).

O nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) foi estimado em 20 mL do extrato obtido no procedimento para CBM. Após transferência para tubos de digestão, foram acrescidos 1,5 mL de H_2SO_4 concentrado e catalisador $\text{K}_2\text{SO}_4\text{:CuSO}_4$ (10:1) (Bremner, 1965). Após a digestão, o N resultante (NH_4^+) foi determinado pelo método azul de indofenol (Feije e Anger, 1972).

Avaliação qualitativa da comunidade microbiana por DGGE (eletroforese em gel com gradiente de desnaturação) foi baseada no DNA total extraído das amostras de solo, usando o kit UltraClean™ (Mbio Inc., Solana, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

O gene 16S rRNA foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores fD1 e rD1 descritos por Weisburg et al. (1991). Para a segunda reação, os produtos de PCR foram amplificados com iniciadores, F-968 (CG) e R-1401 (Nübel et al., 1996).

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida a 6% (acrilamida: bisacrilamida, 37,5:1), com gradiente desnaturante de 20% a 75% (solução 100% desnaturante formada pelas soluções de uréia 7 M e de formamida 40%), em um aparelho DCode (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), conforme descrito anteriormente (Hungria et al., 2003; Souza et al., 2008a), por um período de 16 h. O gel foi então corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV e fotografado.

Análise Estatística

Depois de verificar a normalidade, os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) (SAS, 1999) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As imagens dos géis de DGGE foram analisadas no programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.4.6). As semelhanças foram analisadas estatisticamente usando o algoritmo UPGMA (Sneath & Sokal, 1973) e o coeficiente de Jaccard (J) (Jaccard, 1912), com uma tolerância de 5% para criar uma matriz de distância euclidiana.

RESULTADOS – Para as amostras da pré-semeadura e no estádio R2 coletadas no verão de 2006/2007, não

houve diferença estatística entre os tratamentos para CBM e NBM nos sete locais avaliados (Figura 1), indicando nenhum efeito da transgênia, dos herbicidas ou da associação entre ambos. Os valores de CBM foram de aproximadamente 500 mg C g^{-1} , com pouca diferença entre os locais, exceto em Ponta Grossa (SNT), onde os níveis de CBM foram inferiores. Para o NBM, os maiores valores foram encontrados em Ponta Grossa, provavelmente devido ao clima úmido subtropical, que pode influenciar na composição da comunidade microbiana em relação às demais áreas (Tabela 1).

Na safrinha de 2007 e também no verão de 2007/2008, tanto na pré-semeadura, quanto no estádio R2, não foram detectadas diferenças estatísticas para CBM e NBM entre os tratamentos em qualquer dos locais avaliados (Figuras 2 e 3).

A análise de DGGE foi utilizada para o monitoramento da qualidade de solo (Souza et al., 2008a, b), confirmando a homogeneidade das áreas, com similaridade de 100% entre todas as parcelas (Tabela 1) durante a amostragem de 2006/2007 na avaliação da pré-semeadura e no estádio R2 (Tabela 1).

Na safrinha de 2007, também não foram detectadas diferenças entre os perfis de cada tratamento (pré-semeadura e R2), com 100% de similaridade entre os tratamentos (Tabela 1). Em Teresina (REM) e Vilhena (ER), os experimentos foram realizados pela primeira vez em 2007, indicado homogeneidade da área, enquanto que em outros locais os resultados indicaram ausência de efeitos residuais das culturas anteriores. Apenas em Uberaba (CTPP), houve uma diferença detectável entre os tratamentos, tanto na pré-semeadura como em R2. No entanto, é possível que estas diferenças estejam relacionadas com o efeito da alta umidade observada na região de Uberaba durante a maior parte da estação de cultivo, em que valores mais baixos de CBM também foram detectados. No estádio R2, o não efeito dos tratamentos em cada um destes locais (exceto Uberaba) indica que nenhum dos tratamentos teve efeito qualitativo na comunidade bacteriana do solo (Tabela 1).

Nos experimentos realizadas durante a terceira safra (verão de 2007/2008) não foram encontradas diferenças qualitativas na diversidade bacteriana do solo que pudessem ser atribuídas às cultivares, ou aos herbicidas, confirmando similaridade genética de 100% (Tabela 1) entre os tratamentos. Esses resultados indicam que não houve efeito dos tratamentos nesta safra. Em Sete Lagoas (CNPMS), várias diferenças nos níveis de similaridade genética foram observadas entre os tratamentos na pré-semeadura e, em menor grau, no estádio R2. Antes da semeadura, houve um período de seca nesse local (dados não mostrados), o que pode ter resultado em estresse à comunidade microbiana.

DISCUSSÃO - A avaliação qualitativa não confirmou qualquer efeito relacionado à transgênia na comunidade bacteriana do solo. De fato, neste estudo os perfis da comunidade bacteriana foram diferentes de uma área para

outra e foram também sensíveis a variações edafoclimáticas.

Os resultados confirmam a sensibilidade da biomassa microbiana a alterações edafoclimáticas. Com isso, conclui-se que a utilização desse parâmetro é viável em estudos de monitoramento ambiental, ou como bioindicadores qualidade do solo.

AGRADECIMENTOS – Ao Adolfo Vitório Ulbrich (BASF), pela coordenação dos experimentos, ao Dr. Décio Gazzoni (Embrapa Soja), pelas sugestões sobre o o trabalho. A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de doutorado; M. F. Guimarães e M. Hungria são pesquisadoras do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERÊNCIAS –

Bremner, J.M. Total nitrogen. In: Methods of Soil Analysis. Madison, USA: **American Society of Agronomy**. p.1149-1178. 1965.

CTNBIO.(Comissão Técnica Nacional de Biossegurança). 1998. Comunicado n.º54, de 29 de setembro de 1998. Acesso em <http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0000/326.doc>

Feije, F., Anger, V. Spot test in inorganic analysis. **Analytica Chimica Acta**. v.149, p.363-367. 1972.

Hungria, M., Campo, R. J., Mendes, I. C. Benefits of inoculation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology Fertility Soils**. v. 39, p.88-93. 2003.

Jaccard, P. The distribution of flora in the alpine zone. **New Phytologist**. v.11, p.37-50. 1912.

Jenkinson, D.S., Powelson D.S. The effects of biocide treatment on metabolism in soil method for measuring soil biomass. **Soil Biology Biochemistry**. v.8, p.209-213. 1976.

Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaird, 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**. v.178, p.5636-5643, 1996.

Petter, F. A., Cargnelutti Filho, A. L. L., Barroso, L. P. Manejo de herbicidas na cultura da soja Roundup Ready. **Planta Daninha**. v.25, p.557-566, 2007.

SAS (SAS Institute Inc). 1999. **Proprietary of software**, v. 6, 4ª ed. Cary, NC: SAS Instituto.

Sneath, P. H. A., Sokal, R. R. **Numerical taxonomy**. San Francisco, USA: Freeman, 573p. 1973.

Souza, R. A., Hungria, M., Franchini, J. C., Chueire, L. M. O., Barcellos, F. G., Campo, R. J. Avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.43, p.71-82. 2008a.

Souza, R. A., Hungria, M., Franchini, J. C., Maciel, C. D., Campo, R. J., Zaia, D. A. M. Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.43, p.83-91, 2008b.

Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology Biochemistry**. v.19, p.703-707, 1987.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology** 173, 697-703. 1991.

Tabela 1. Nivel de similaridade genética (%) na análise de agrupamento dos perfis de DGGE-16SrDNA em cada local e estação de cultivo. T1) Soja Cultivance (GM) e herbicida imazapyr, T2) Cultivance (GM) com herbicidas convencionais; T3) Conquista (soja convencional parental) com herbicidas convencionais.

Tratamentos	T1	T2	T3
verão 2006/2007			
Pre-sowing and R2			
EEA (SP), SNT (PR), CNPSo (PR), CTTT (MG), CNPMS (MG), CNPAF (GO), CNPH (DF)			
T1	100		
T2	100	100	
T3	100	100	100
Safrinha 2007			
Pre-sowing and R2			
EMN (PI), ER (RO), CNPMS (MG), CNPAF (GO), CNPH (DF)			
T1	100		
T2	100	100	
T3	100	100	100
CTTP (MG)			
Pré-Semeadura			
T1	100		
T2	69,2	100	
T3	71,4	81,8	100
R2			
T1	100		
T2	88,9	100	
T3	80	90	100
verão 2007/2008			
Pré-Semeadura e R2			
EEA (SP), ER (RO), CNPSo (PR), CTTT (MG), CNPAF (GO), CNPH (DF)			
T1	100		
T2	100	100	
T3	100	100	100
CNPMS (MG)			
Pré-Semeadura			
T1	100		
T2	72,7	100	
T3	90,9	80	100
R2			
T1	100		
T2	81,8	100	
T3	90	90,9	100

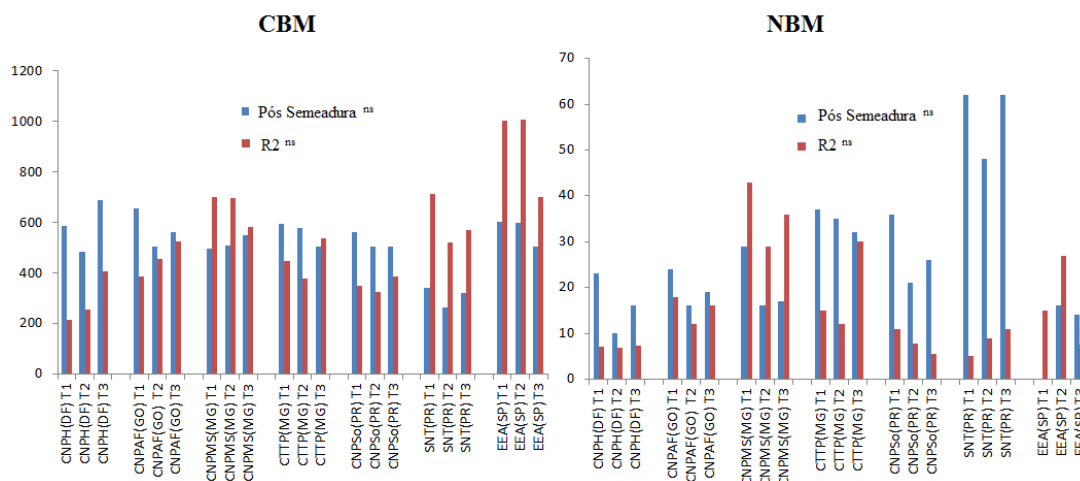


Figura 1. Carbono da biomassa microbiana (CBM) e nitrogênio (NBM) (mg C e N g⁻¹ de solo seco) na pré-semeadura de soja e no estádio R2. Experimento realizado durante o verão de 2006/2007. T1) soja Cultivance (GM) e imazapyr; 2) Cultivance (GM) com herbicidas convencionais; 3) Conquista (soja convencional parental), com herbicidas convencionais. ^{ns}: indica ausência de diferença estatística entre os tratamentos de cada local e cada colheita (Tukey. P < 0,05).

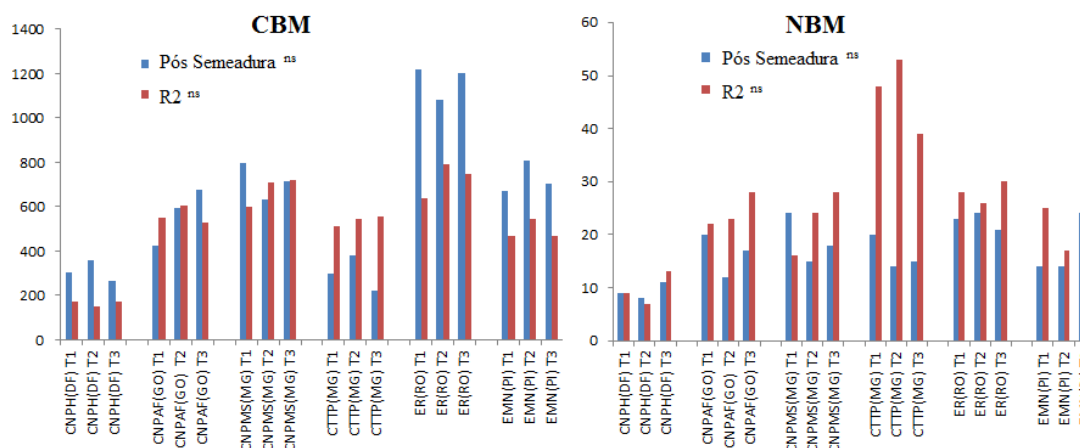


Figura 2. Carbono da biomassa microbiana (CBM) e nitrogênio (NBM) (mg C e N g⁻¹ de solo seco) na pré-semeadura de soja e no estádio R2. Experimento realizado durante a safrinha de 2007. T1) soja Cultivance (GM) e imazapyr; 2) Cultivance (GM) com herbicidas convencionais; 3) Conquista (soja convencional parental), com herbicidas convencionais. ^{ns}: indica ausência de diferença estatística entre os tratamentos de cada local e cada colheita (Tukey. P < 0,05).

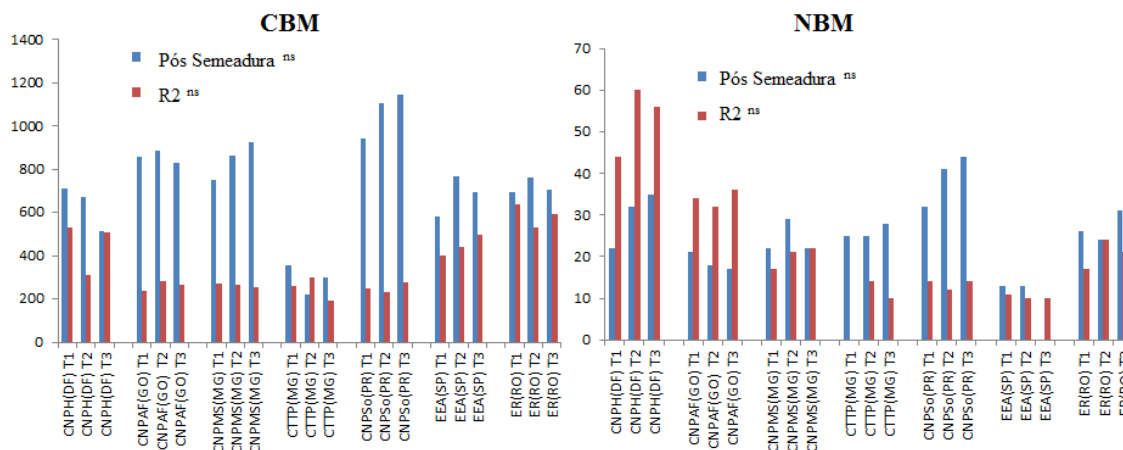


Figura 3. Carbono da biomassa microbiana (CBM) e nitrogênio (NBM) (mg C e N g⁻¹ de solo seco) na pré-semeadura de soja e no estádio R2. Experimento realizado durante o verão de 2007/2008. T1) soja Cultivance (GM) e imazapyr; 2) Cultivance (GM) com herbicidas convencionais; 3) Conquista (soja convencional parental), com herbicidas convencionais. ^{ns}: indica ausência de diferença estatística entre os tratamentos de cada local e cada colheita (Tukey. P < 0,05).