



FERTBIO 2012

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

Avaliação do possível impacto de milho geneticamente modificado na ciclagem do nitrogênio em solo de Cerrado

Simone Raposo Cotta⁽¹⁾; **Armando Cavalcante Franco Dias**⁽²⁾; **Ivanildo Evódio Marriel**⁽³⁾; **Eliane Aparecida**⁽⁴⁾; **Jan Dirk van Elsas**⁽⁵⁾; **Lucy Seldin**⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Estudante de doutorado; Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes; UFRJ; Avenida Carlos Chagas Filho 373, Ilha do Fundão; raposo_cotta@yahoo.com.br; ⁽²⁾ Estudante de doutorado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Departamento de Genética, ESALQ, USP, dias147@gmail.com; ⁽³⁾ Pesquisador; Embrapa Sete Lagoas; imarriel@cnpm.br; ⁽⁴⁾ Pesquisadora; Embrapa Sete Lagoas; eliane@cnpm.br; ⁽⁵⁾ Professor; University of Groningen, CEES, Nijenborg 7; j.d.van.elsas@rug.nl; ⁽⁶⁾ Professora, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes; UFRJ; Avenida Carlos Chagas Filho 373, Ilha do Fundão, lseldin@ufrj.br

RESUMO – Na última década, o aumento da área cultivada com plantas geneticamente modificadas foi bastante expressivo, principalmente devido às facilidades apresentadas por esse tipo de cultura, como o aumento da produtividade sem aumento da área cultivada. Porém, até o momento, não há um consenso de quais seriam os possíveis efeitos dessas plantas no ambiente e se processos vitais para manutenção da vida (ciclagem de nutrientes) estariam sendo afetados. O objetivo do trabalho foi avaliar os possíveis efeitos do milho geneticamente modificado em micro-organismos responsáveis por etapas cruciais na ciclagem de nitrogênio (fixação biológica do nitrogênio e oxidação da amônia) associados à rizosfera. Foram utilizados dois genótipos de milho geneticamente modificado (MON810 e TC1507) e um genótipo controle cultivados em solo de Cerrado durante dois períodos do ano (Safrã e Safrinha). A amostragem foi realizada durante três estágios de desenvolvimento do milho (30, 60 e 90 dias após a germinação). Foi realizada a extração de DNA do solo rizosférico dessas amostras e com esse DNA foram realizados PCR-DGGE para *nifH* e *amoA* e PCR quantitativo para *nifH*. Baseado nos resultados obtidos, não foi possível observar diferenças entre os genótipos transgênicos e o genótipo controle. A principal diferença observada está relacionada ao tempo de amostragem (safrã e safrinha) para ambos os genes avaliados. Mais estudos estão sendo realizados com o objetivo de elucidar se outras etapas do ciclo do nitrogênio estão sendo afetadas.

Palavras-chave: planta transgênica, *nifH*, *amoA*

INTRODUÇÃO – Nos últimos anos, o uso de plantas geneticamente modificadas vem aumentando consideravelmente, muito pelas facilidades obtidas com esse tipo de cultura, onde é possível se obter um ganho na produtividade sem a necessidade do aumento da área cultivada e com a menor utilização de pesticidas. Apesar

de todos os seus benefícios, a utilização desse tipo de cultura ainda é alvo de intensos debates, pois ainda não se tem conhecimento se plantas que tiveram o seu código genético alterado poderiam causar algum dano ao ambiente. A literatura é bastante controversa, pois diversos trabalhos mostram alterações em organismos não alvos e outros não mostram efeito algum. Poucos são os trabalhos que avaliam esse impacto em comunidades microbianas e menos ainda nas comunidades microbianas que realizam funções importantes para a manutenção e o equilíbrio do planeta, como a ciclagem dos nutrientes. O nitrogênio é um dos elementos principais para a manutenção da vida, sendo constituinte de proteínas, aminoácidos, bases nitrogenadas da molécula de DNA, entre outros. Seu ciclo é composto por diversas etapas, todas com participação microbiana, sendo a fixação biológica de nitrogênio (transformação do nitrogênio atmosférico em amônia) e a oxidação de amônia em nitrato realizadas exclusivamente por procariotos. Pereira e Silva et al. (2012) comentam que o processo de oxidação de amônia tem sido amplamente utilizado como medida de perturbação ambiental, sendo considerado um indicador de qualidade do solo. Já a fixação de nitrogênio é muitas vezes a principal entrada de nitrogênio no ambiente, sendo também um processo fundamental para a ciclagem de nitrogênio no ambiente. Portanto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar, através de metodologias independentes de cultivo, o possível efeito do cultivo de milho geneticamente modificado plantado em solo de Cerrado nos microrganismos fixadores de nitrogênio e oxidantes de amônia associados à rizosfera.

MATERIAL E MÉTODOS

Genótipos utilizados, condições de cultivo e amostragens

Foram utilizados dois genótipos de milhos geneticamente modificados Guardian (evento MON810) e Herculex

(evento TC1507) e um genótipo controle. Os ensaios foram conduzidos em solo de Cerrado com os tratamentos distribuídos em um delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições. Cada parcela experimental foi constituída de quatro fileiras de 5 metros de comprimento com espaçamento de 80 cm entre as fileiras e 20 cm entre as plantas, sendo a área útil de 6,4 m² (duas linhas centrais com 4 m de comprimento). Foram efetuadas três amostragens durante o ciclo da planta, aos 30, 60 e 90 dias após a germinação, utilizando-se amostras compostas de três sub-amostras. Cada sub-amostra foi constituída do solo rizosférico de três plantas/repetição. Os milhos foram cultivados em duas épocas do ano distintas: durante o período de safra (época tradicional de cultivo/Agosto) e durante o período de safrinha (época não tradicional de cultivo/Fevereiro). Para obtenção do solo rizosférico, as plantas foram retiradas do solo com o sistema radicular intacto e as raízes sacudidas, de forma a se retirar o solo frouxamente aderido. O solo aderido às raízes (rizosfera) foi então mantido estocado a -20°C.

PCR em tempo real e DGGE

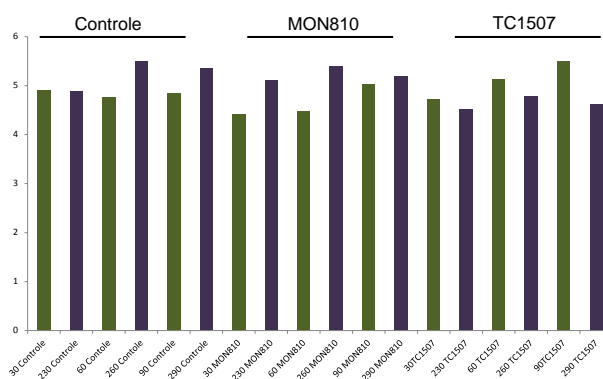
As análises de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas para quantificação do gene *nifH*. As reações foram realizadas no equipamento ABI Prism 7300 Cyclor (Applied Biosystems, Germany) utilizando o sistema SYBR Green I. Todas as reações foram realizadas em volume de 25 µl, contendo 12,5 µl do kit Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Brasil) e 0,2µM dos iniciadores FGPH19 (Simonet et al., 1991) e PolR (Poly et al., 2001).

O DNA extraído foi utilizado para a amplificação do gene *nifH* como descrito por Monteiro et al. (2011) e para a amplificação do gene *amoA* como descrito por Pereira e Silva et al. (2012). As análises das estruturas das comunidades fixadoras de nitrogênio e oxidantes amônia foram realizadas por PCR-DGGE. Através dos perfis gerados no PCR-DGGE foram construídos dendrogramas pela presença e ausência de bandas e utilizando o coeficiente de similaridade de Pearson através do software Bionumerics. Foi realizada uma análise do componente principal para avaliar o padrão de distribuição das espécies, como descrito em Dias et al. (2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO – Através da avaliação do PCR em tempo real não foi possível observar qualquer alteração no perfil de abundância das comunidades responsáveis pela fixação biológica do nitrogênio em relação aos genótipos transgênicos quando comparados ao genótipo controle, como pode ser observado no gráfico 1. São observadas flutuações na comunidade diazotrófica em função do estágio de crescimento da planta, onde nos estágios mais tardios o número de diazotróficos é maior quando comparado aos estágios iniciais do desenvolvimento da planta. Além disso, a época do ano mostrou-se o fator importante na determinação da comunidade diazotrófica, visto que flutuações importantes podem ser fortemente associadas à época do ano que o milho foi cultivado. O mesmo efeito pode ser observado quando a comunidade total foi avaliada, onde o estágio de

crescimento da planta e o período do ano do cultivo foram determinantes para a estruturação da comunidade (Cotta et al., submetido).

Gráfico 1 – PCR quantitativo do gene *nifH*



^ Barras verde referentes às amostras do período de safra e barras roxas referentes ao período de safrinha.

A estrutura das comunidades avaliadas por PCR-DGGE apresentou alterações em função principalmente ao período do ano que os milhos foram cultivados. Não foram observadas alterações na estrutura de ambas as comunidades em função do genótipo avaliado (Figura 1 e Figura 2). Esses resultados indicam que não está ocorrendo modificações consideráveis na estrutura e abundância da comunidade fixadora de nitrogênio e oxidante de amônia relativas à modificação genética do milho. Por ser a comunidade oxidante de amônia sensível a alterações ambientais e ser constantemente utilizada como indicador da qualidade do solo e essa comunidade não ter apresentado diferentes perfis de respostas em função do genótipo avaliados, é possível sugerir que os milhos geneticamente modificados não possuem qualquer efeito sobre as comunidades microbianas funcionais do solo, sendo os fatores ambientais, como temperatura, regime de chuvas e tipo do solo, mais determinante que a transgenia do milho. Porém, mais estudos estão sendo realizados para detalhar melhor esses possíveis efeitos nas outras etapas da ciclagem do nitrogênio.

CONCLUSÕES – Não foi possível detectar efeitos da transgenia do milho nas comunidades diazotróficas e oxidantes de amônia associadas à rizosfera.

AGRADECIMENTOS – A CAPES e ao CNPq

REFERÊNCIAS

- 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 hybrids in tropical agrosystems**. *Submetido a Plant and Soil*
- DIAS, A.C.F., DINI-ANDREOTE, F., TAKETANI, R.G., TSAI, S.M., AZEVEDO, J.L., MELO, I.S. AND ANDREOTE, F.D. **Archaeal communities in the sediments of the three contrasting mangroves**. 2011. *Journal of Soils Sediments*, 8: 1466-1476, 2011.

