

## AVALIAÇÃO DE BIOSSEGURANÇA DE TRANSGÊNICO POR DGGE: ESTUDO DE CASO DO FEIJÃO VMDF, EVENTO M1-4

BIOSAFETY ASSESSMENT OF TRANSGENIC WITH DGGE: CASE STUDY OF BEAN  
BMGV, M1-4 EVENT

KNUPP, A.M.<sup>1 2 3</sup>; FARIA, J.C.<sup>4</sup>; RUMJANEK, N.G.<sup>1</sup>; XAVIER, G.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Agrobiologia, Cx. Postal 74.505, 23890-000, Seropédica, RJ

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Pós- Graduação em Biotecnologia Vegetal -RJ

<sup>3</sup>Professor de Fisiologia Vegetal – Departamento de Ciências Fisiológicas - UFRRJ

<sup>4</sup>Embrapa Arroz e Feijão – Santo Antônio de Goiás - GO

<sup>1 2 4</sup>Rede Embrapa Biossegurança – Financiamento FINEP

e-mail: adrianoknupp@yahoo.com.br.

### Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar possíveis efeitos da modificação genética, evento M1-4, sobre organismos não-alvos, estudando a comunidade bacteriana rizosférica. Em um experimento implantado no campo, com delineamento inteiramente casualizado e dez repetições para cada tratamento, foram realizadas coletas em três estádios de desenvolvimento da cultura: V4, R6 e R7. Das plantas coletadas obtiveram-se células não-cultivadas da rizosfera para as quais se procedeu a extração de DNA total por processo fenólico. A região V6-V8 do 16S rDNA foram amplificadas utilizando-se iniciadores universais para bactéria e específicos para alfa-proteobactéria. Dendrogramas comparativos entre as variedades Olathe M1-4 (transgênicas) e Olathe Pinto (convencional) foram obtidos utilizando-se o coeficiente de Jaccard e o método pela associação média (UPGMA). Os agrupamentos obtidos com os perfis de 16S rDNA PCR-DGGE, para a comunidade bacteriana da rizosfera associada ao feijoeiro apresentaram separações entre os genótipos (transgênico e convencional), com diminuição ao longo do desenvolvimento da planta e separações mais evidentes foram observadas nos perfis obtidos para alfa-proteobactéria.

### Abstract

The purpose of this study was to evaluate possible effects of the genetic modification, M1-4 event, on non-target organisms, evaluating the rhizospheric bacterial community. In a field experiment, in a completely randomized design with ten repetitions for each treatment, samples were collected in three stages of culture development (V4, R6 and R7). It was obtained from the collected plants bacterial cells non-cultivated from the rhizosphere. For the extraction of total DNA from rhizospheric bacterial community it was used a phenolic process. The V6-V8 region of the 16S rDNA was amplified by PCR using universal primers for the bacterium and specific primers for alfa-proteobacterium groups. Comparative dendrograms between Olathe M1-4 (transgenic) and Olathe Pinto (conventional) varieties were obtained using the Jaccard coefficient and by the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA). The obtained groupings indicate that the profiles of 16S rDNA PCR-DGGE showed separations between genotypes (transgenic and conventional) for the non-cultivated rhizospheric bacterial community, with a reduction during the growth of plant, and most obvious separations were observed on profiles obtained for alpha-proteobactéria.

### Introdução

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos principais alimentos da culinária brasileira, possui alto teor protéico (20 a 33%) além de ser boa fonte de fibras, vitaminas hidrossolúveis e minerais (COSTA & VIEIRA, 2000).

Das doenças que limitam esta cultura, uma das mais agressivas é o mosaico dourado encontrada em todas as regiões de cultivo do feijoeiro, podendo levar a perdas de 40 a 100% da lavoura (BONFIM et al., 2007). A obtenção de um feijoeiro geneticamente modificado (evento M1-4), para resistência ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF) (ARAGÃO et al., 2001) poderia dar uma importante contribuição para o cultivo dessa leguminosa no país, uma vez que o impedimento da replicação viral significaria alternativa eficiente e mais barata de controlar a doença; no entanto, um dos receios gerados pela tecnologia do DNA

recombinante reside nos possíveis efeitos que a inserção de um gene pode causar sobre organismos não-alvos da transformação. Deste modo, em virtude da íntima interação entre os microrganismos associados às raízes das plantas fazem-se necessários estudos de possíveis efeitos sobre esses microrganismos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do evento M1-4 de feijoeiro transgênico para resistência ao VMDF sobre a comunidade bacteriana rizosférica.

### Material e Métodos

As plantas foram cultivadas no campo experimental da Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás, GO, sob sistema de plantio convencional, em delineamento inteiramente casualizado com 20 parcelas (dois tratamentos e dez repetições), sendo avaliadas a variedade Olathe Pinto e o evento elite Olathe M1-4. As coletas ocorreram aos 26, 40 e 54 dias após plantio (DAP), estádios V4, R6 e R7 (FERNANDÉS et al., 1986). Imediatamente após a coleta procedeu-se a obtenção de células representativas da comunidade bacteriana rizosférica e extraiu-se o DNA total de acordo com SCHWIEGER & TEBBE (1998). Do DNA obtido procedeu-se a amplificação por PCR utilizando-se os iniciadores F203 e R1494 para o grupo alfa de proteobacteria (estádios V4 e R6), de acordo com GOMES et al. (2001) e para o grupo bacteria (estádios V4, R6 e R7) foram utilizados os iniciadores F968 com grampo GC, e o R1401, para a região V6-V8 do 16S rDNA (NÜBEL et al., 1996).

A eletroforese em gel com gradiente de desnaturante (DGGE) foi realizada a partir da aplicação de 15 µl de cada amostra do material amplificado no gel, com gradiente de 45-60%, no sistema *Dcode*<sup>TM</sup> (Bio-Rad) sob voltagem constante (120 V – 70 mA; 60°C; 16 horas) e ao final, o gel foi corado com uma solução de nitrato de prata (CRESTE et al., 2001)

As imagens dos géis foram digitalizadas e, com o auxílio do programa Gel Compar II (Applied Maths v.3). Foram gerados dendrogramas de similaridade entre os tratamentos utilizando-se o coeficiente Jaccard e o método de agrupamento pela associação média (UPGMA). Dos dendrogramas gerados comparou-se os agrupamentos formados com similaridades acima de 60% e 80% para verificação de grupos exclusivos para um ou outro genótipo ou mistos.

### Resultados e Discussão

O quadro 1 apresenta os percentuais de agrupamentos formados com genótipos exclusivos ou mistos. Pode-se observar que, para a comunidade bacteriana total, não houve separação que pudesse indicar expressivo efeito dos transgenes inseridos sobre o grupo bacteria. Houve formação de grupos separando os genótipos que foi diminuído ao longo das coletas (figura 1A); entretanto, para o grupo alfa de proteobacteria (figura 1B) a separação entre genótipos foi mais evidente, pois foram formados grupos exclusivos para ambas as coletas com alta representação percentual de amostras agrupadas com 60% de similaridade ou superior, sendo bem representativa também a separação quando se restringiu a observação aos grupos formados com similaridades superiores a 80%.

Quadro 1. Grupos formados com similaridades iguais ou superiores a 60% (S 60) e 80% (S 80).

Grupo Bacteria										
S 60%						S 80				
	Grupos	% Amostras	T	C	M	Grupos	% Amostras	T	C	M
C1	7	90%	3	2	2	3	30%	1	1	1
C2	6	90%	2	1	3	3	30%	1	2	0
C3	3	30%	2	1	0	1	10%	1	0	0
Grupo Alfa-proteobacteria										
S 60						S 80				
	Grupos	% Amostras	T	C	M	Grupos	% Amostras	T	C	M
C1	6	75%	3	3	0	4	45%	2	2	0
C2	6	70%	4	2	0	5	55%	4	1	0

#### Legenda:

C1 = primeira coleta; C2 = segunda coleta; C3 = terceira coleta

% Amostras = percentual de amostras totais agrupadas nas faixas de similaridade indicadas

T = grupos formados exclusivamente com amostras transgênicas (Olathe M1-4)

C = grupos formados exclusivamente com amostras convencionais (Olathe Pinto)

M = grupos mistos, compostos por amostras transgênicas e convencionais

Apesar de alguns autores relatarem tendência em ocorrer comportamento similar entre os perfis de comunidade bacteriana total e grupos específicos (GOMES et al., 2001; MILLING et al., 2004; COSTA et al., 2006), no presente estudo a diminuição do efeito ao longo das coletas não foi observada para alfa-proteobacteria. Segundo HEUER et al. (2002), a amplificação de grupos específicos aumenta a sensibilidade da análise pelo aparecimento de bandas não evidentes nos perfis de comunidade bacteriana total.

### Conclusões

As amostras representativas da comunidade bacteriana rizosférica, a partir de amplificação com iniciadores universais para bactéria, apresentaram grupos discriminando os genótipos, porém tal discriminação diminuiu ao longo do desenvolvimento da planta. Os agrupamentos obtidos para alfa-proteobacteria foram mais evidentes na separação dos genótipos.

### Referências

- ARAGÃO, F. J. L.; VIANNA, G. R.; ALBINO, M. das M. C.; DIAS, B. B. A.; FARIA, J. C. Transgênico resistente a geminivirus. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 19, p. 22-26, 2001.
- BONFIM, K.; FARIA, J. C.; NOGUREIRA, E. O. P. L.; MENDES, E. A.; ARAGÃO, F. J. L. RNAi-mediated resistance to *bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 20, n. 6, p. 717-726, 2007.
- COSTA, R.; GOTZ, M.; MROTZEK, N.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. **Fems Microbiology Ecology**, Oxon, v. 56, n. 2, p. 236-249, 2006.
- COSTA, J. G. C. da; VIEIRA, N. R. de A. Qualidade, classificação comercial e manejo pós-colheita. In: YOKOYAMA, L. P.; STONE, L. F. (Ed.) **Cultura do feijoeiro no Brasil: características da produção**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000, 75p.
- CRESTE, S.; NETO, A. T.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.19, n. 4, p. 299-306, 2001.
- FERNÁNDES, F.; GEPTS, P.; LÓPEZ, M. **Etapas de desarrollo de la planta de frijol común** (*Phaseolus vulgaris* L.). Cali. Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1986, 34 p.
- GELSOMINO, A.; KEIJZER-WOLTERS, A. C.; CACCO, G.; VAN ELSAS, J.J. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 1-15, 1999.
- GOMES, N.C. M.; HEUER, H.; SCHONFELD, J.; COSTA, R.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 232 n. 1-2, p. 167-180, 2001.
- HEUER, H.; KROPPESTEDT, R.M.; LOTTMANN, J.; BERG, G., SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere relative to communities are negligible relative to natural factors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3 p. 1325–1335, 2002.
- MILLING, A.; SMALLA, K.; MAIDL, F. X.; SCHLOTTER, M.; MUNCH, J. C. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, n. 1-2, p. 23-39, 2004.
- NÜBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, I. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polynyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, n. 19, p. 5636-5643, 1996.

SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. A new approach to utilize PCR-single strand conformation polymorphism for 16S rDNA gene-based microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64. 12, p. 4870-4876, 1998.

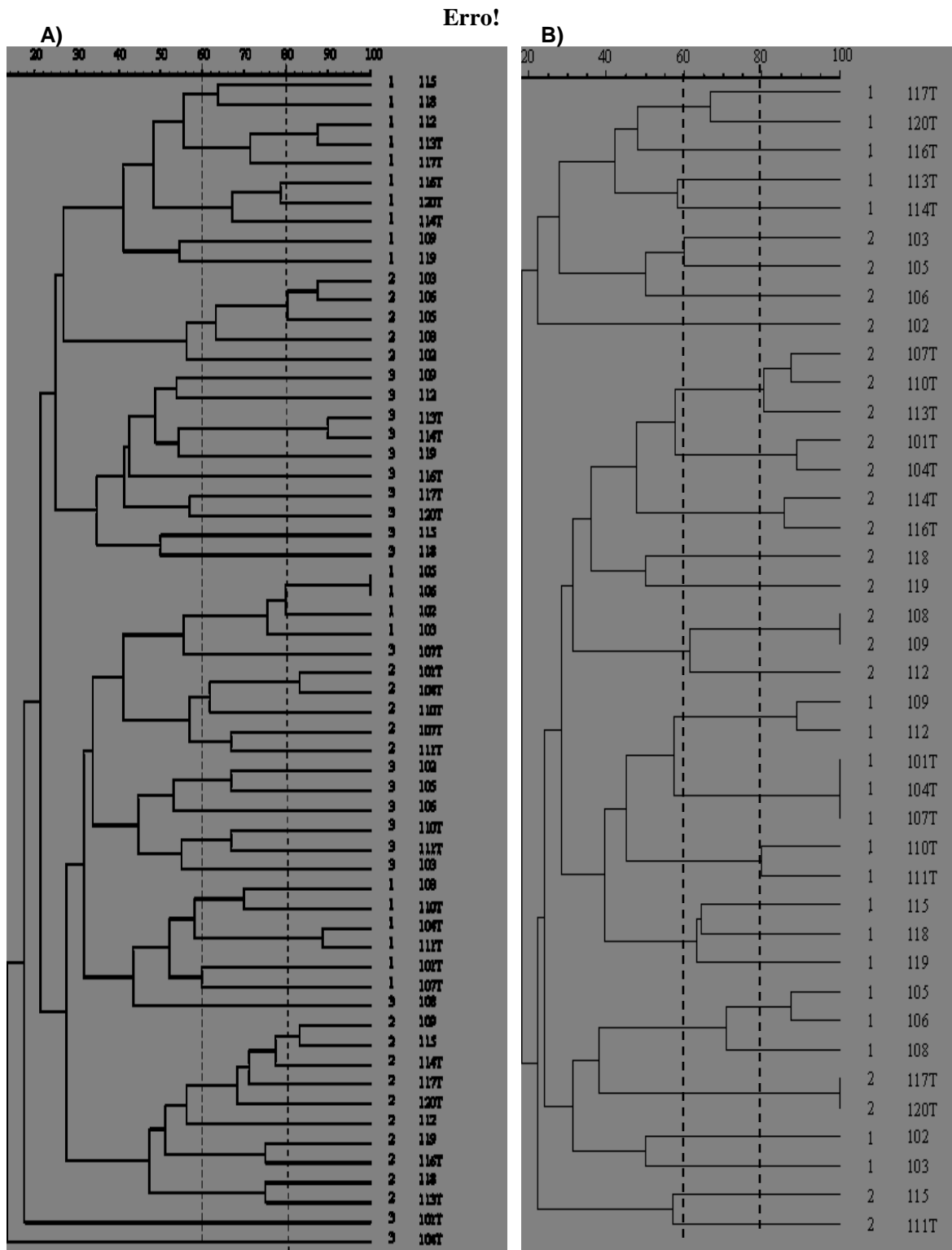


Figura 1. Dendrogramas de similaridade gerados pelo método UPGMA com o coeficiente Jaccard. Os números de 1 a 3 referem-se às coletas. As amostras receberam o número relativo à parcela de origem e aquelas seguidas pela letra T referem-se às transgênicas.

**A)** Grupo Bacteria (3 coletas); **B)** Grupo Alfa-proteobacteria (2 coletas).