

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

BEATRIZ MARIA FERRARI

**Ocorrência e persistência de fragmentos de transgenia
(milho Bt evento MON810) em solos agrícolas brasileiros e
avaliação de sua comunidade microbiana**

Piracicaba

2014

BEATRIZ MARIA FERRARI

**Ocorrência e persistência de fragmentos de transgenia
(milho Bt evento MON810) em solos agrícolas brasileiros e
avaliação de sua comunidade microbiana**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear
na Agricultura da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Biologia na Agricultura

**Orientadora: Dra. Danielle Gregório Gomes
Caldas**

Piracicaba

2014

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Ferrari, Beatriz Maria

Ocorrência e persistência de fragmentos de transgenia (milho Bt evento MON810) em solos agrícolas brasileiros e avaliação de sua comunidade microbiana / Beatriz Maria Ferrari; orientadora Danielle Gregório Gomes Caldas. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.

81 f.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Biodiversidade 2. Biologia molecular 3. Biotecnologia de plantas 4. DNA recombinante 5. Microbiologia agrícola 6. Monitoramento 7. Plantas transgênicas 8. Rastreamento 9. Transgenes I. Título

CDU 631.461 : 577.21

*“Dedico este trabalho aos meus pais,
Valdemar Ferrari e Maria Coral, e
aos meus irmãos Renata, Angela e
Luis Eduardo, e ao MEU AMOR
Clovis Daniel Borges”*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida;

Aos meus pais e irmãos, por sempre estar ao meu lado, me apoiando em todas as decisões e me incentivando a seguir meu próprio caminho;

A professora Dra. Tsai Siu Mui e a Dra. Danielle Gregório Gomes Caldas, pela orientação e pelo suporte para a realização deste trabalho (Muito Obrigada!!!!)

Ao meu amor Clovis, pelo companheirismo excepcional e por toda compreensão e disposição em ajudar;

À CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado;

À bibliotecária Marília Henyei, pela formatação do trabalho e pela amizade (Adorooo);

Aos funcionários Fábio, Daiane e Neuda, por toda a ajuda com os prazos e processos administrativos.

Aos técnicos de laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP: Chiquinho (*in memoriam*), Elias, Fábio e Wagner, por todo o auxílio durante as coletas e com a aquisição dos materiais necessários para a execução deste trabalho e pela amizade construída durante todos esses anos;

Aos colegas do Laboratório: Ana Beraldo, Acácio, Andreza, Carol, Dennis, Fabi, Fernanda Cassieri, Lina, Lucas, Lucas Palma, Mari, Maju, Paula e Letícia.

Aos meus amigos, Enéas, Gustavo, Letícia Mizuhira, Marília, Marina, Marcela, Naissa, Andressa, Aline, Caio, Felipe, Fernandinha e Rosineide pela amizade e por toda a ajuda e por estarem sempre presentes, na alegria e na tristeza.

A todos que de alguma forma contribuíram com a execução deste trabalho. Obrigada!!!

*“Senhor fazei-me um instrumento de vossa paz.....
faizei que eu procure mais consolar do que ser consolado,
compreender do que ser compreendido, amar do que ser amado...”*

São Francisco de Assis

RESUMO

FERRARI, B. M. **Ocorrência e persistência de fragmentos de transgenia (milho Bt evento MON810) em solos agrícolas brasileiros e avaliação de sua comunidade microbiana.** 2014. 81 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

O uso de culturas GM (geneticamente modificadas) tem sido questionado quanto ao destino dos produtos derivados da transgenia no ambiente. Com a liberação de exsudatos das raízes das plantas e a decomposição dos resíduos culturais, aumenta-se a quantidade de DNA transgênico no ambiente, que pode ser adsorvido à superfície ativa das partículas do solo e/ou degradado pela ação de enzimas microbianas. A comunidade microbiana do solo pode entrar em contato direto com estes produtos, aumentando a probabilidade de transferência horizontal de fragmentos de DNA transgênico para os microrganismos. Também, alterações na composição dos exsudatos das plantas GM e mudanças em função das práticas de manejo, podem resultar em alterações na composição funcional e estrutural da comunidade microbiana. Assim, faz-se necessário avaliar a persistência dos produtos derivados da transgenia no solo e seus possíveis efeitos sobre a comunidade microbiana. Os objetivos deste estudo foram: avaliar a persistência dos fragmentos 35S-hsp70, hsp70-*cryIAb* e *cryIAb*-planta da construção gênica do milho Bt (evento MON810) em diferentes tipos de solo e temperaturas, em condições de microcosmo e de campo; e determinar a abundância do número de cópias dos genes 16S rRNA de *Bacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* e *Archaea*, e 18S rRNA de Fungo nas mesmas condições, e avaliar a estrutura da comunidade bacteriana em áreas agrícolas de cultivo de milho Bt. No primeiro estudo, o DNA do milho Bt MON810 foi adicionado em solos arenoso e argiloso. Como controle negativo, apenas água estéril foi misturada ao solo. Amostras de solo foram incubadas a 15 e 25°C. Em campo, os solos foram amostrados em três áreas agrícolas em Fátima do Sul, MS, em dois anos consecutivos. Após extração de DNA, os fragmentos foram quantificados por qPCR. No segundo estudo, foram determinadas a abundância dos genes 16S rRNA de *Bacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* e *Archaea* e 18S rRNA de Fungo e avaliada a estrutura da comunidade bacteriana por T-RLFP. Os resultados mostraram que em condições de microcosmo, os fragmentos hsp70-*cryIAb* e *cryIAb*-planta persistiram até 291 dias, e o fragmento 35S-hsp70 até 180 dias. A temperatura e o tipo de solo não afetaram a persistência dos fragmentos. Em campo, o número de cópias desses fragmentos foi maior na segunda coleta. No segundo estudo, o número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* aumentou com adição de DNA do milho Bt nos microcosmos, e uma redução do número de cópias foi verificada para *Archaea*, *Verrucomicrobia* e Fungo. Para *Firmicutes*, os resultados não foram consistentes. As temperaturas não resultaram em efeito na abundância dos genes, enquanto o tipo de solo teve efeito apenas para *Archaea* e *Verrucomicrobia*. Áreas agrícolas com cinco anos de cultivo de milho Bt apresentaram variações na estrutura da comunidade bacteriana em nível de filo, e maior abundância de Fungos no segundo ano de amostragem, enquanto em área com um ano de cultivo, observou-se uma redução da população de *Firmicutes* e *Verrucomicrobia*. Os maiores efeitos na comunidade microbiana foram verificados entre os anos de amostragem.

Palavras-chave: *cryIAb*. Diversidade. Milho Bt. PCR em tempo real. T-RLFP.

ABSTRACT

FERRARI, B. M. **Occurrence and persistence of transgenic fragments of Bt maize (event MO810) in agricultural soils Brazilian and evaluation of its microbial community.** 2014. 81 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

The use of GM (genetically modified) crops has been questioned about the fate of transgenes and its derived products on the environment. With the release of exudates from roots of GM plants and the decomposition of its residues, the amount of transgenic DNA in the environment increases, which can be adsorbed to the active surface of soil particles and/or be degraded by the action of microbial enzymes. Soil microbial communities can come into direct contact with these products, raising the probability of horizontal transfer of transgenic DNA fragments to soil microorganisms. Moreover, changes in exudates composition of GM plants and changes depending on the management practices may result in structural and functional alterations in the microbial community. Thus, it is necessary to evaluate the persistence of transgenes and its derivatives in the soil and effects on microbial community. The objectives of this study were to assess the persistence of fragments 35S-hsp70, hsp70-*cryIAb* and *cryIAb*-plant from the genetic construct of Bt corn (event MON810) in different soil types and temperatures, in microcosm and field conditions; and to determine the abundance of 16S rRNA copy number of *Bacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* and *Archaea* and 18S rRNA of *Fungi* under the same conditions, and to evaluate the structure of bacterial communities in agricultural areas of Bt corn cultivation. In the first study, DNA from Bt corn MON810 was added to sandy and clay soils. As negative control, only sterile water was mixed with soil. Soil samples were incubated at 15 and 25°C. At the field, soils were sampled in three agricultural areas in Fátima do Sul, MS, in two consecutive years. After DNA extraction, fragments were quantified by qPCR. In the second study, the abundance of 16S rRNA of *Bacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* and *Archaea* and 18S rRNA of *Fungi* were determined and the structure of bacterial communities was evaluated by T-RFLP. The results showed that in microcosm conditions, hsp70-*cryIAb* and *cryIAb*-plants fragments persisted until 291 days and the 35S-hsp70 up to 180 days. The temperature and the type of soil did not affect the persistence of fragments. In field, the copy number of these fragments was greater in the second sampling. In the second study, the copy number of 16S rRNA of *Bacteria* increased with the addition of DNA from Bt corn in microcosm, and a reduction in copy number was observed for *Archaea*, *Verrucomicrobia* and *Fungi*. The results were not consistent for *Firmicutes*. Temperatures resulted in no effect in gene abundance, while the soil was effective only for *Archaea* and *Verrucomicrobia*. Agricultural areas with five years of Bt corn cultivation showed variations in bacterial community structure at the phylum level, and greater abundance of fungi in the second year of sampling, while in the area with a year of cultivation, a reduction in population of *Firmicutes* and *Verrucomicrobia* was observed. The largest effects on the microbial community were observed between the sampled years.

Keywords: *cryIAb*. Diversity. Bt corn. Real-time PCR. T-RFLP.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Revisão da Literatura.....	16
1.1.1 DNA no ambiente.....	16
1.1.2 Destino e persistência do DNA extracelular no solo.....	18
1.1.2.1 Minerais de Argila.....	18
1.1.2.2 Minerais de Areia.....	19
1.1.2.3 Ácidos Húmicos.....	19
1.1.2.4 pH do solo.....	20
1.1.2.5 Degradação do DNA no ambiente.....	20
1.1.2.6 Transformação Natural.....	20
1.1.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
1.1.4 Milho Bt (evento MON810).....	22
1.1.5 Microrganismos do solo e as plantas transgênicas.....	22
1.1.6 Técnicas Moleculares.....	23
1.1.6.1 PCR em tempo real.....	23
1.1.6.2 Terminal Restriction Fragment Length (T-RFLP).....	24
Referências.....	25
2. Persistência dos Fragmentos de Transgenia do Milho Bt (evento MON810) em Solos Agrícolas do Brasil.....	33
2.1 Introdução.....	36
2.2 Objetivos.....	37
2.3 Material e Métodos.....	37
2.3.1 Estudo I: Detecção de fragmentos do evento MON810 em Microcosmos.....	37
2.3.2 Extração de DNA vegetal (milho MON810).....	37
2.3.3 Ensaio em microcosmos.....	38
2.3.4 Extração de DNA de amostras de microcosmos.....	39
2.3.5 Desenho de Iniciadores específicos para qPCR.....	39
2.3.6 Detecção e quantificação dos fragmentos de transgenia por PCR quantitativo.....	40
2.3.7 Estudo II: Detecção de fragmentos do evento MON810 em Campo.....	40
2.3.8 Análise de Dados.....	41
2.4 Resultados.....	42
2.4.1 Estudo I: Detecção de fragmentos do evento MON810 em Microcosmos.....	42
2.4.1.1 Análise físico-química do solo.....	42
2.4.1.2 Análise de PCR quantitativo.....	43

2.4.2 Estudo II: Detecção de fragmentos do evento MON810 em Campo.....	47
2.4.2.1 Análise físico-química do solo.....	47
2.4.2.2 Análise de PCR quantitativo	49
2.5 Conclusões	51
Referências.....	52
3 Avaliação da Estrutura e da Abundância da Comunidade Microbiana em Solos Agrícolas sob cultivo de Milho Transgênico.....	55
3.1 Introdução	58
3.2 Objetivos	59
3.3 Material e Métodos	59
3.3.1 Quantificação dos genes 16S rRNA de <i>Bacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Verrucomicrobia</i> e <i>Archaea</i> e 18S rRNA de Fungo em Solos mantidos em Microcosmos e em Condições de Campo	59
3.3.1.1 Extração de DNA total do solo	60
3.3.1.2 Detecção e quantificação dos genes 16S rRNA e 18S rRNA por PCR quantitativo ..	60
3.3.2. Avaliação da estrutura da comunidade de <i>Bacteria</i> no solos.....	62
3.3.2.1 Amplificação do gene 16S rRNA de <i>Bacteria</i>	62
3.3.2.2 Purificação dos Produtos de PCR	62
3.3.2.3 Reação de Restrição dos Produtos de PCR para Análise de T-RFLP.....	63
3.3.2.4 Precipitação dos Produtos da Restrição	63
3.3.2.5 Análise do Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP).....	63
3.3.2.6 Análise dos Dados.....	64
3.4 Resultados e Discussão	65
3.4.1 Quantificação dos genes 16S rRNA de <i>Bacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Verrucomicrobia</i> e <i>Archaea</i> e 18S rRNA de Fungo em Solos mantidos em Microcosmos	65
3.4.2 Quantificação dos genes 16S rRNA de <i>Bacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Verrucomicrobia</i> e <i>Archaea</i> e 18S rRNA de Fungo em Solos de Campo	69
3.4.3 T-RFLP das comunidades de <i>Bacteria</i>	73
3.5 Conclusões	76
Referências.....	77

1 INTRODUÇÃO

Os avanços no melhoramento genético permitiram a inserção de genes exógenos de *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*) em plantas de importância agrícola, que passaram a expressar, em seus tecidos, proteínas inseticidas denominadas de Cry ou delta-endotoxinas (SOBERÓN et al., 2007). A adoção dessa tecnologia tem auxiliado na redução dos problemas associados com o uso intensivo de pesticidas sintéticos em áreas agrícolas, mas têm levantado questões sobre os possíveis efeitos em *organismos* não-alvos e ao destino dos produtos derivados da transgenia no ambiente.

Desde a introdução das culturas GM (Geneticamente Modificadas) em 1996, a área de cultivo tem aumentado continuamente no mundo, alcançando em 2013 cerca de 175,2 milhões de hectares, sendo os Estados Unidos, Brasil e Argentina os maiores produtores (JAMES, 2013). A produção em larga escala das culturas GM e a incorporação de seus resíduos após a colheita poderá resultar em acúmulo e persistência no solo, não somente das proteínas recombinantes produzidas pelas plantas, mas também dos genes utilizados na engenharia genética das mesmas (SAXENA et al., 2004).

O DNA recombinante liberado das culturas GM, pode ser adsorvido às partículas do solo, ser degradado ou permanecer protegido da ação de DNases (PIETRAMELLARA et al., 2009). No solo, mais especificamente na solução intersticial, o DNA pode mover-se rapidamente (GULDEN et al., 2005) ou ter seu movimento limitado quando adsorvido ao complexo organo-mineral (CRECCHIO et al., 2005).

A compreensão da adsorção e persistência do DNA recombinante e de suas proteínas às partículas do solo é essencial para avaliar os riscos das liberações das culturas GM e os possíveis efeitos sobre sua comunidade microbiana (SAEKI; KUNITO, 2010), as quais desempenham um papel fundamental na degradação de resíduos culturais e nos ciclos biogeoquímicos (GRUBER et al., 2011; WANG et al., 2006).

Atualmente, três cenários são reconhecidos por promoverem possíveis efeitos das plantas transgênicas à comunidade microbiana do solo: diferenças na quantidade e composição dos exsudatos das raízes resultando em mudanças na composição funcional e estrutural da comunidade microbiana; a capacidade dos microrganismos para integrar o DNA transgênico ao seu genoma e as alterações em função das práticas de manejo, que envolvem as aplicações de pesticidas e fertilizantes orgânicos e inorgânicos, bem como a deposição da biomassa no solo após a colheita (MOTAVALLI et al., 2004; LYNCH et al., 2004).

De modo geral, as culturas GM liberam sequências únicas de DNA recombinante no solo, resultando em um “pool” de DNA extracelular no ambiente (GEBHARD; SMALLA, 1999; GULDEN et al., 2005). Para que o monitoramento dos produtos de transgenia seja eficiente, faz-se necessário o conhecimento do momento em que as culturas transgênicas estão presentes em determinado ambiente; e o auxílio das ferramentas moleculares, como a qPCR em tempo real.

Diante deste contexto, os objetivos deste estudo foram:

- a) pela técnica de qPCR em tempo real avaliar a persistência dos fragmentos de transgenia do milho Bt (evento MON810) em:
 - solos brasileiros, sem histórico de cultivo de transgênico, mais especificamente, em solos arenoso e argiloso, que permaneceram incubados em temperaturas de 15 e 25°C com fragmentos do milho Bt (evento MON810), o qual vem sendo utilizado no Brasil desde a sua liberação em 2007;
 - e em solos de áreas agrícolas, manejadas com milho transgênico, no Mato Grosso do Sul;
 - e quantificar a comunidade microbiana nos solos que permaneceram incubados (arenoso e argiloso) e nos solos das áreas agrícolas;
- b) pela técnica T-RFLP – *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*:
 - avaliar a estrutura da comunidade microbiana presente nos solos das áreas agrícolas do Mato Grosso do Sul.

1.1 Revisão da Literatura

1.1.1 DNA extracelular no ambiente

O DNA vegetal entra continuamente no solo, e cada espécie de planta tem um ciclo de vida, uma determinada arquitetura e diferentes mecanismos de liberação de DNA no ambiente (LEVY-BOOTH et al., 2007). Na rizosfera, a entrada do DNA ocorre por meio da descamação das células das raízes da coifa durante o crescimento das raízes (WANG et al., 1996). No estágio V1 de alongamento das raízes do milho, até 10^4 cópias de DNA.ml⁻¹ de água lixiviada podem ser liberados no solo (GULDEN et al., 2005). Esse DNA pode ser clivado em pequenos fragmentos devido à ação de endonucleases (WANG et al., 1996).

Outro processo que ocorre na raiz é a colonização de células por patógenos, liberando

DNA na rizosfera (POLVERARI et al., 2000), o DNA pode permanecer intacto no ambiente e ou disponível às bactérias colonizadoras (BERTOLLA et al., 1999; KAY et al., 2002). Em estudo com batatas transgênicas, o DNA recombinante foi encontrado na rizosfera do solo, e a liberação ocorreu durante o crescimento das raízes e na antese (de VRIES et al., 2003).

A adição de pequenas frações de DNA de pólen no solo tem sido observada, uma vez que o método de polinização de cada planta irá determinar a quantidade de DNA liberado e sua distância percorrida (LEVY-BOOTH et al., 2007). Em espécies transgênicas de batata (*Solanum tuberosum* L.) e canola (*Brassica napus* L.), a distância percorrida pelo pólen foi de 10 m (McPARTLAN; DALE, 1994) e 1,5 km (TIMMONS et al., 1995), respectivamente.

A decomposição de tecido foliar por enzimas microbianas promove a liberação de DNA na rizosfera (WIDMER et al., 1996; DILLY et al., 2001). Segundo Levy-Booth et al. (2007), em clima temperado e em áreas agrícolas, a entrada de DNA de resíduos de plantas no solo parece oscilar de acordo com o crescimento e senescência das plantas, enquanto que em clima tropical parece ser contínua.

Além das plantas, animais e microrganismos podem liberar DNA no solo por meio da lise celular (CECCHERINI et al., 2003; WIDMER et al., 1997). Algumas espécies de bactérias *B. subtilis*, *E. coli*, *Acinetobacter* sp e algumas espécies de *Pseudomonas*, liberam DNA por meio das secreções de DNA plasmidial e cromossomal; essa liberação pode ocorrer em períodos de estresse nutricional, em culturas puras (LORENZ et al., 1991) (PAGET; SIMONET, 1994). O DNA de bactéria pode também ser liberado durante a formação de biofilm (PIETRAMELLARA et al., 2009).

A liberação de DNA de células de fungos tem sido pouco estudada, Herdina et al. (2004) verificaram que a taxa de DNA liberada de células mortas é muito alta, e que a contribuição de DNA de fungo no solo deve ser insignificante. No entanto, outros estudos reportaram que 70% do DNA no solo são de fungos (BORNEMAN; HARTIN, 2000; van ELSAS et al., 2000).

1.1.2 Destino e persistência do DNA extracelular no solo

O destino do DNA extracelular no solo pode ser influenciado pelas propriedades químicas, físicas e biológicas de ambos, DNA e solo, as quais irão determinar a sua persistência ou degradação no ambiente (MEIER; WACKERNAGEL, 2003). A persistência e a taxa de degradação do DNA no ambiente são os processos que completam o ciclo do DNA no solo (LEVY-BOOTH, 2007).

Durante anos, acreditava-se que o DNA extracelular de microrganismos era rapidamente degradado no solo (LORENZ; WACKERNAGEL, 1994). No entanto, observou-se que o DNA liberado de microrganismos e de tecidos de plantas nas partículas do solo têm sua reatividade e suscetibilidade modificada, tornando-se resistente a biodegradação e persistindo por mais tempo no ambiente (SAEKI; KUNITO, 2010).

A adsorção e ligação do DNA no solo dependerá do comprimento, conformação e da concentração da molécula de DNA, bem como da mineralogia, composição iônica, pH do solo, área de superfície e da capacidade hidrofóbica e hidrofílica dos componentes do solo (OGRAM et al., 1988, 1994; KHANNA; STOTZKY, 1992; PAGET et al., 1992, PIETRAMELLARA et al., 2001).

Os sítios de ligação da matrix solo podem promover a persistência do DNA de duas maneiras: protegendo-o da ação de nucleases (CRECCHIO; STOTZKY, 1998) e ou adsorvendo DNases e nucleases, reduzindo o potencial de restrição enzimática do DNA no solo (BLUM et al., 1997).

1.1.2.1 Minerais de argila

O DNA ligado aos minerais de argila (montmorilonita, illita e caulinita) estará protegido da ação de DNases e nucleases, no entanto, se houver uma saturação de enzimas DNases nos locais de ligação das partículas de argila adjacentes ao DNA adsorvido, ocorrerá degradação do DNA (DEMANÈCHE et al., 2001). Apesar de as enzimas estarem no solo, vários estudos tem relatado a detecção de fragmentos de DNA em solos agrícolas (NIELSEN et al., 2007), e a maior parte da atividade das nucleases no solo é de origem bacteriana (BLUM et al., 1997).

Ogram et al. (1998) observou que solos ricos em minerais de argila adsorvem mais DNA do que solos pobres, e que diferentes frações de argilas, com diferentes propriedades termodinâmicas, podem adsorver quantidades variáveis de DNA.

Moléculas de DNA com baixo peso molecular foram mais adsorvidas em montmorilonita e caulinita que moléculas com alto peso molecular (PIETRAMELLARA et al., 2001). Entretanto, Franchi et al. (1999) observou que o DNA cromossomal esteve mais fortemente ligado a superfície do solo argiloso que o DNA plasmidial.

Por meio da microscopia eletrônica e da difratometria de raio-X, verificou-se que o complexo DNA-argila ligou-se primeiramente na extremidade da superfície de argila, e a “cauda” restante do DNA estendeu-se livremente para o exterior (PAGET; SIMONET, 1994; KHANNA et al., 1998; FRANCHI et al., 1998).

1.1.2.2 Minerais de areia

A adsorção de DNA à areia pode ser mediada pela concentração de cátions. Os cátions divalentes são mais efetivos que os monovalentes em formar pontes entre quartzo e a molécula de DNA (LORENZ; WACKERNAGEL, 1987). A concentração de cátions monovalentes necessária para adsorver DNA foi 70 a 100 vezes maior que a concentração de cátions divalentes requerida para a mesma quantidade de DNA plasmidial em areia (ROMANOWSKI et al., 1991).

1.1.2.3 Ácidos Húmicos

Os ácidos húmicos ligam-se ao DNA no ambiente, e 10% do fósforo orgânico do solo são provenientes da associação, DNA e ácido húmico (CRECCHIO; STOTZKY, 1998). O DNA isolado do solo está frequentemente complexado com as substâncias húmicas (TSAI; OLSON, 1992).

Crecchio e Stotzky (1998) verificaram que o DNA de *B. subtilis* foi rapidamente adsorvido e ligado ao complexo montmorilonita dos ácidos húmicos, e esse DNA ligado mostrou-se eficiente no processo de transformação de células *in vitro*, além de permanecer protegido da ação das enzimas do solo.

1.1.2.4 pH do solo

O pH pode interferir na capacidade de ligação do DNA ao solo (LORENZ; WACKERNAGEL, 1987). Em condições ácidas (pH abaixo de 5), o DNA torna-se positivamente carregado por prótons, que ligam-se a adenina e citosina, seguido por guanina e grupos fosfatos. Essa ligação resulta em grupos catiônicos na molécula de DNA que podem ligar-se negativamente aos sítios dos minerais de argila (THENG, 1979; CRECCHIO et al., 2005). Em pH acima de 5, a molécula de DNA e os constituintes do solo tornam-se carregados negativamente e requerem cátions (Mg^{2+} e Ca^{2+}) para mediar a adsorção do DNA ao solo (GREAVES; WILSON, 1969; 1970).

1.1.2.5 Degradação do DNA no ambiente

A degradação do DNA no solo ocorre por meio da restrição enzimática, que promove a clivagem do DNA em pequenos fragmentos (BLUM et al., 1997; DEMANÈCHE et al., 2001). Os produtos da degradação do DNA podem persistir no ambiente e serem utilizados para a síntese *de novo* de nucleotídeos, ou podem servir como fonte de nutriente para os microrganismos do solo (FINKEL; KOLTER et al., 2001; MACFADYEN et al., 2001) e plantas (HIROSE; ASHIHARA, 1984; KATAHIRA; ASHIHARA, 2002).

Demanèche et al. (2001) verificaram que o DNA não adsorvido na solução do solo foi completamente degradado por enzimas em concentrações menores ($1 \mu g \cdot ml^{-1}$) do que aquelas concentrações necessárias para a degradação da molécula que está ligada aos minerais do solo.

1.1.2.6 Transformação Natural

A transformação natural é o mecanismo mais provável de transferência de genes de plantas para bactérias (NIELSEN et al., 1998; BERTOLLA; SIMONET, 1999). Esse processo envolve a aquisição de um DNA de origem vegetal livre no ambiente por uma célula e a expressão desse gene na célula receptora (NIELSEN et al., 1998).

Recentes estudos mostraram que a transformação natural ocorreu em 90 espécies de procariotos incluindo os microrganismos do solo *Bacillus subtilis* e *Acinetobacter* spp. (de VRIES; WACKERNAGEL, 2004). Para que a transformação natural ocorra é necessário o DNA extracelular ligar-se a superfície de células competentes, atravessar a membrana celular

integrar-se ao genoma e, conseqüentemente, ser expresso. Embora as barreiras sejam grandes, há estudos que mostram que a transferência horizontal de DNA para microrganismos é potencialmente possível (LEVY-BOOTH et al., 2007).

No solo, a disponibilidade de DNA para a transformação natural é limitada pelos processos de adsorção, degradação e pela diversidade de espécies de bactérias. As bactérias devem apresentar competência natural para integrar o novo material genético (THOMAS; NIELSEN, 2005).

1.1.3 *Bacillus thuringiensis* e as plantas transgênicas

Bacillus thuringiensis é uma bactéria ubíqua no ambiente e distingue-se de outras espécies pela capacidade de produzir inclusões cristalinas durante a fase de esporulação. Essas inclusões podem conter mais de um tipo de proteínas inseticidas, denominadas Cry ou delta-endotoxinas, e apresentam atividade específica para as ordens de insetos Coleoptera, Diptera, Lepidoptera e Hymenoptera (WHITELEY; SCHNEPF, 1986) e a outros organismos como nematóides (BRAVO et al., 2007).

O modo de ação inseticida das proteínas Cry tem sido caracterizado principalmente para os insetos da ordem Lepidoptera, onde os cristais proteicos são expostos ao ambiente alcalino no intestino médio das lagartas, levando à liberação de fragmentos ativos, as protoxinas. Essas protoxinas ativas interagem com receptores das células epiteliais do intestino médio, promovendo a formação de poros e a destruição da célula por lise osmótica, levando a morte do inseto (SAXENA et al., 2010).

Desde 1960 *B. thuringiensis* vem sendo utilizada na agricultura como ingrediente ativo nas formulações de biopesticidas para o controle de insetos pragas e ácaros (FEITELSON et al., 1992), principalmente na agricultura orgânica. Essas formulações apresentam na sua constituição uma mistura de células, esporos e cristais paraesporais (VETTORI et al., 2004). Os esporos podem ser rapidamente inativados pela radiação solar no ambiente (GRIEGO; SPENCE, 1978).

Considerada como a maior fonte de genes para a expressão em plantas transgênicas resistentes a insetos, *B. thuringiensis* passou a ser um dos organismos mais utilizados no melhoramento genético de plantas, tendo seus genes *cry* modificados e inseridos em espécies de importância agrícola como: milho, algodão, batata, canola e arroz (SAXENA et al., 2010). Além dos genes *cry*, as plantas transgênicas carregam sequências procarióticas, como o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) e genes de resistência a antibióticos

(BERTOLLA et al., 2000), bem como as proteínas de choque térmico, hsp70 (BRODMAN et al., 2002).

1.1.4 Milho Bt (evento MON810)

De acordo com os dados da Comissão Nacional de Biossegurança (2007), a linhagem de milho MON810 foi obtida através da transformação genética, pela metodologia de aceleração de partículas ou biobalística (KLEIN et al., 1987), de plantas de milho do híbrido HI-II, resultado do cruzamento das linhagens públicas de milho A188 e B73, desenvolvidas nos Estados Unidos.

O milho Bt (evento MON810) apresenta integrado em seu genoma, o promotor transcricional 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) e sequências do *intron* proveniente do gene hsp70 do milho, que foram inseridas entre o promotor e o gene *cry1Ab* (van RIE et al., 1989). O evento expressa em seus tecidos foliares a proteína Cry1Ab específica para o controle de insetos da ordem Lepidoptera (ARONSON; SHAI, 2001).

1.1.5. Microrganismos do solo e as plantas transgênicas

A comunidade microbiana do solo é reconhecida como o principal indicador da qualidade do solo (VINEELA et al., 2008; HUSSAIN et al., 2011), e desempenha papel fundamental na decomposição da matéria orgânica, na mineralização ou solubilização de compostos químicos e na transformação da energia no ambiente (OVREAS, 2000; SPOSITO; ZABEL, 2003; ROSCOE et al., 2006).

Alguns estudos avaliam os efeitos do uso do solo na estrutura e na abundância da comunidade microbiana, pois em ambientes manejados essa comunidade se mostra sensível quando se compara aos sistemas naturais adjacentes (TORSVIK et al., 2002). Em estudo recente, Venturini (2014) verificou diferenças na abundância da comunidade bacteriana relacionadas como uso da terra, obtendo maior número de cópias g solo⁻¹ em área de vegetação nativa, seguida pelo canavial com manejo de colheita sem queima e com queima.

Além das práticas de manejo, em áreas com cultivo de plantas transgênicas, a comunidade microbiana do solo pode entrar em contato direto com os produtos derivados do processo de transgenia, por meio dos exsudatos das raízes e durante o processo de decomposição (PALM et al., 1996; SAXENA et al., 2002). Os exsudatos das raízes desempenham um importante papel na seleção da microbiota, e podem influenciar

seletivamente no crescimento microbiano, assim diferenças na qualidade e quantidade dos exsudados das raízes podem promover alterações na estrutura e na diversidade funcional da população da rizosfera (MANSOURI et al., 2002; OGER et al., 2000).

As plantas transgênicas podem apresentar inúmeras modificações na sua composição, como no conteúdo de lignina, onde altos teores de lignina já foram verificados nas linhagens de milho Bt (Bt11, MON810 e 76), que em plantas não transgênicas (SAXENA; STOTZKY, 2001); também foram observadas variações na expressão dos transgenes, dependendo do local de inserção (van LEEUWEN et al., 2001), outro fator que pode ocorrer é o rearranjo do transgene (WINDELS et al., 2001), com potencial para promover alterações na expressão dos genes e no fenótipo da planta (BRUSETTI et al., 2004).

Os efeitos do milho Bt sobre a comunidade microbiana e suas funções no solo têm sido avaliados por vários estudos em áreas com resíduos culturais em decomposição, considerando a importância dos microrganismos na ciclagem de nutrientes (MOCALI, 2011; YANNI et al., 2010).

1.1.6 Técnicas moleculares

As técnicas moleculares são poderosas ferramentas para o monitoramento ambiental e para a caracterização da diversidade microbiana (LACAVA; AZEVEDO, 2008). Atualmente, esses estudos ambientais baseiam-se na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), com a obtenção por amplificação de fragmentos-alvo, os quais são utilizados nas análises de PCR quantitativo em tempo real, bem como a T-RLFP, a qual permite comparar diferentes comunidades de microrganismos derivados de diferentes ambientes (MARSH, 1999).

1.1.6.1 PCR em tempo real

A PCR em tempo real permite a quantificação de ácidos nucléicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, de forma exponencial, em amostras ambientais (HIGUCHI et al., 1993). O processo de amplificação em tempo real ocorre por meio da emissão da fluorescência, a qual é proporcional à quantidade de produtos formados a cada ciclo (ANKLAM et al., 2002). Os valores da fluorescência são registrados a cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004).

Durante o processo, os compostos de fluorescência são intercalados com a fita-dupla de DNA, e com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador a fluorescência

é capturada e os computadores equipados com *softwares* analisam os dados ao final da reação (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004). Essa técnica tem sido muito utilizada para monitoramento de genes proveniente de plantas transgênicas em amostras ambientais (DOUVILLE et al., 2007; ZHU et al., 2009).

1.1.6.2 Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

A análise de T-RFLP determina o polimorfismo no comprimento dos fragmentos terminais de uma reação de restrição, provenientes de um produto de amplificação de PCR, sendo um dos iniciadores marcado com fluorescência. É um método muito sensível, rápido e com grande aplicabilidade, que permite comparar mudanças na estrutura de comunidades microbianas do solo de diferentes ambientes, além de possuir alta capacidade de processamento disponível, permitindo a análise de uma grande quantidade de amostras (LIU et al., 1997; TIEDJE et al., 1999; LUTON et al., 2002; THIES, 2007).

A análise de T-RFLP é realizada a partir da extração de DNA de comunidades de microrganismos de amostras ambientais, seguida pela reação de amplificação por PCR do gene 16S r RNA da comunidade utilizando iniciadores marcados com fluoróforo, específicos do domínio ou grupo, que pode ser detectado por um sequenciador automático ABI. Uma vez que o marcador está na extremidade 5' terminal, somente o fragmento terminal da digestão é detectado, e seu tamanho determinado pelo sequenciador. Após a amplificação por PCR quantitativo o produto é purificado e, em reações individuais, digerido com 2 a 4 enzimas de restrição, endonucleases. Os produtos da digestão são carregados no sequenciador e a corrida é realizada em um modo de varredura com tamanho interno padrão incluído em cada linha de leitura (LIU et al., 1997).

Os tamanhos dos TRFs (fragmentos de restrição terminal) marcados com fluorescência são convertidos em um eletroferograma, em que cada pico representa um T-RF. O processamento do eletroferograma é feito em uma matriz, em que cada linha representa uma amostra e cada coluna representa um TRF da amostra e analisados em softwares que calculam o tamanho do fragmento bem como a intensidade de fluorescência (altura ou área) do pico.

Referências

- ANKLAM, E.; GADANI, F.; HEINZE, P.; PIJNENBURG, H.; VAN DEN EEDE, G. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 214, n. 1, p. 3-26, 2002.
- ARONSON, A. I.; SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 195, p. 1-8, 2001.
- BATES, J. A.; TAYLOR, E. J. A.; KENYON, D. M.; THOMAS, J. E. The application of real-time PCR to the identification, detection and quantification of *Pyrenophora* species in barley seed. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 2, p. 49-57, 2001.
- BERTOLLA, F.; PEPIN, R.; PASSELEGUE-ROBE, E.; PAGET, E.; SIMKIN, A.; NESME, X.; SIMONET, P. Plant genome complexity may be a factor limiting in situ the transfer of transgenic plant genes to the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, p. 4161-4167, 2000.
- BERTOLLA, F.; SIMONET, P. Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms. **Research in Microbiology**, Paris, v. 150, p. 375-384, 1999.
- BLUM, S. A. E.; LORENZ, M. G.; WACKERNAGEL, W. Mechanisms of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soil. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 20, p. 513-521, 1997.
- BORNEMAN, J.; HARTIN, J. R. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, p. 4356-4360, 2000.
- BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt and their potential for insect control. **Toxin**, Basel, v. 49, p. 423-435, 2007.
- BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 30, p. 1-9, 2011.
- BRODMANN, P. D.; ILG, E. C.; BERTHOUD, H.; HERRMANN, A. Real Time quantitative polymerase chain reaction methods for four genetically modified maize varieties and maize DNA content in food. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 85, p. 646-653, 2002.
- BRUSETTI, L.; FRANZIA, P.; BERTOLINI, C.; PAGLIUCA, A.; BORIN, S. Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic counterpart. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, p. 11-21, 2004.

CECCHERINI, M. T.; POTÉ, J.; KAY, E.; VAN, V. T.; MARÉCHAL, J.; PIETRAMELLARA, G.; NANNIPIERI, P.; VOGEL, T. M.; SIMONET, P. Degradation and transformability of DNA from transgenic leaves. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, p. 673–678, 2003.

CRECCHIO, C.; RUGGIERO, P.; CURCI, M.; COLOMBO, C.; PALUMBO, G.; STOTZKY, G. Binding of DNA from *Bacillus subtilis* on montmorillonite-humic acids-aluminum or iron hydroxypolymers: effects on transformation and protection against DNase. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 69, p. 834-841, 2005.

CRECCHIO, C.; STOTZKY, G. Binding of DNA on humic acids: effect on transformation of *Bacillus subtilis* and resistance to DNase. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 1060-1067, 1998.

DE VRIES, J.; HEINE, M.; HARMS, K.; WACKERNAGEL, W. Spread of recombinant DNA by roots and pollen of transgenic potato plants, identified by specific biomonitoring using natural transformation of an *Acinetobacter* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, p. 4455-4462, 2003.

DE VRIES, J.; WACKERNAGEL, W. Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, p. 91-104, 2004.

DEMANÈCHE, S.; JOCTEUR-MONROZIER, L.; QUIQUAMPOIX, H.; SIMONET, P. Evaluation of biological and physical protection against nuclease degradation of clay-bound plasmid DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, p. 293-299, 2001.

DILLY, O.; BARTSCH, S.; ROSENBROCK, P.; BUSCOT, F.; MUNCH, J. C. Shifts in physiological capabilities of the microbiota during the decomposition of leaf litter in a black alder (*Alnus glutinosa* Gaertn. L.) forest. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 921-930, 2001.

DOUVILLE, M.; GAGNÉ, F.; BLAISE, C.; ANDRÉ, C. Occurrence and persistence of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and transgenic Bt corn cry1Ab gene from aquatic environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 66, p. 195-203, 2007.

FEITELSON, J. L.; PAYNE, S. J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insect and beyond. **Nature Biotechnology**, New York, v. 10, p. 271-275, 1992.

FINKEL, S. E.; KOLTER, R. DNA as a nutrient: novel roll for bacterial competence gene homologs. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 183, p. 6288-6293, 2001.

FRANCHI, M.; BRAMANTI, E.; BONZI, L. M.; ORIOLI, P. L.; VETTORI, C.; GALLORI, E. Clay-nucleic acid complexes: characteristics and implications for the preservation of genetic material in primeval habitats. **Origins of Life and Evolution of the Biosphere**, Dordrecht, v. 29, p. 297-315, 1999.

GEBHARD, F.; SMALLA, K. Monitoring field releases of transgenic modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 28, p. 261-272, 1999.

GREAVES, M. P.; WILSON, M. J. The adsorption of nucleic acids by montmorillonite. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 1, p. 317-323, 1969.

GREAVES, M. P.; WILSON, M. J. The degradation of nucleic acids and montmorillonite-nucleic-acid complexes by soil microorganism. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 2, p. 257-268, 1970.

GRIEGO, V. M.; SPENCE, K. D. Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible light. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 35, p. 906-910, 1978.

GRUBER, H.; PAUL, V.; MEYER, H. H. D.; MULLER, M. Determination of insecticidal Cry1Ab protein in soil collected in the final growing seasons of a nine-years field trial of Bt-maize MON810. **Transgenic Research**, London, v. 21, n. 1, p. 77-88, 2011.

GULDEN, R. H.; LERAT, S.; HART, M. M.; POWELL, J. T.; TREVORS, J. T.; PAULS, K. P.; KLIRONOMOS, J. N.; SWANTON, C. J. Quantitation of transgenic plant DNA in leachate water: real-time polymerase chain reaction analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 53, p. 5858-5865, 2005.

HERDINA, S. N.; JABAHI-HARE, S.; OPHEL-KELLER, K. Persistence of DNA of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in soil as measured by a DNA-based assay. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 47, p. 143-152, 2004.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Nature Biotechnology**, New York, v. 11, p. 1026-1030, 1993.

HIROSE, F.; ASHIHARA, H. Interrelationship between the pentose phosphate pathway and nucleotide synthesis in cultured cells of *Catharanthus roseus*. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 35, p. 123-126, 1984.

HUSSAIN, Q.; LIU, Y. Z.; ZHANG, A. F.; PAN, G. X.; LI, L. Q.; ZHANG, X. H.; SONG, X. Y.; CUI, L. Q.; JIN, Z. J. Variation of bacterial and fungal community structures in the rhizosphere of hybrid and standard rice cultivars and linkage to CO₂ flux. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 78, p. 116-128, 2011.

JAMES, C. Executive summary. In: INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS – ISAAA. **Global status of commercialized biotech/GM Crops: 2013**. Ithaca, NY: ISAAA, 2013. (ISAAA Brief, 46). Disponível em: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/>, Acesso: 03 ago. 2014.

KATAHIRA, R.; ASHIHARA, H. Profiles of pyrimidine biosynthesis, salvage and degradation in disks of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. **Planta**, Berlin, v. 215, p. 821-828, 2002.

KAY, E.; VOGEL, T. M.; BERTOLLA, F.; NALIN, R.; SIMONET, P. In situ transfers of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68, p. 3345-3351, 2002.

KHANNA, M.; STOTZKY, G. Transformation of *Bacillus thuringiensis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 58, p. 1930-1939, 1992.

KHANNA, M.; YODER, L.; CALAMI, L.; STOTZKY, G. X-ray diffractometry and electron microscopy of DNA from *Bacillus subtilis* bound on clay minerals. **Science of Soils**, Verlag, v. 3, n. 1, p. 1-10, 1998.

KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANFORD, J. C. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, London, v. 327, p. 70-73, 1987.

LEVY-BOOTH, D. J.; CAMPBELL, R. G.; GULDEN, R. H.; HART, M. M.; POWELL, J. R.; KLIRONOMOS, J. N.; PAULS, K. P.; SWANTON, C. J.; TREVORS, J. T.; DUNFIELD, K. E. Cycling of extracellular DNA in the soil environment. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 2977-2991, 2007.

LIU, W. T.; MARSH, T. L.; CHENG, H.; FORNEY, L. J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, p. 4516-4522, 1997.

LORENZ, M. G.; WACKERNAGEL, M. High frequency of natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in soil extract supplemented with a carbon/energy and phosphorus source. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 57, p. 1246-1251, 1991.

LORENZ, M. G.; WACKERNAGEL, W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environmental. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 58, p. 563-602, 1994.

LORENZ, M.; WACKERNAGEL, W. Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 53, p. 2948-2952, 1987.

LUTON, P. E.; WAYNE, J. M.; SHARP, R. J.; RILEY, P. W. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. **Microbiology**, Reading, v. 148, p. 3521-3530, 2002.

LYNCH, J. M.; BENEDETTI, A.; INSAM, H.; NUTI, M. P.; SMALLA, K.; TORSVIK, V.; NANNIPIERI, P. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 40, p. 363-385, 2004.

MACFADYEN, L. P.; CHEN, D.; VO, H. C.; LIAO, D.; SINOTTE, R.; REDFIELD, R. J. Competence development by *Haemophilus influenzae* is regulated by the availability of nucleic acid precursors. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 40, p. 700-707, 2001.

MANSOURI, H.; PETIT, A.; OGER, P.; DESSAUX, Y. Engineered rhizosphere: the trophic bias generated by opine-producing plants is independent of the opine type, the soil origin, and

the plant species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68, p. 2562-2566, 2002.

MARSH, T. L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, p. 323-327, 1999.

MARSH, T. L.; SAXMAN, P.; COLE, J.; TIEDJE, J. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, p. 3616-3620, 2000.

McPARTLAN, H. C.; DALE, P. J. An assessment of gene transfer by pollen from field-grown transgenic potatoes to non-transgenic potatoes and release species. **Transgenic Research**, London, v. 3, p. 216-225, 1994.

MEIER, P.; WACKERNAGEL, W. Monitoring the spread of recombinant DNA from field plots with transgenic sugar beet plants by PCR and natural transformation of *Pseudomonas stutzeri*. **Transgenic Research**, London, v. 12, p. 293-304, 2003.

MOCALI, S. Bt Plants and effects on soil micro-organisms. In: HEMMING, D. (Ed.). **Plant Sciences Reviews**. Wallingford: CAB International, 2011. p. 137-155.

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

NIELSEN, K. M.; BONES, A. M.; SMALLA, K.; VAN ELSAS, J. D. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria a rare event? **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 22, p. 79-103, 1998.

NIELSEN, K. M.; JOHNSEN, P. J.; BENSASSON, D.; DAFFONCHIO, D. Release and persistence of extracellular DNA in environment. **Environmental Biosafety Research**, Les Ulis, France, v. 6, p. 37-53, 2007.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. **Biociência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 33, p. 10-13, 2004.

OGER, P.; MANSOURI, H.; DESSAUX, Y. Effect of crop rotation and soil cover on alteration of the soil microflora generated by the culture of transgenic plants producing opines. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 881-890, 2000.

OGRAM, A. V.; MATHOT, M. L.; HARSH, J. B.; BOYLE, J.; PETTIGREW JUNIOR, C. A. Effects of DNA polymer length on its adsorption to soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 60, p. 393-396, 1994.

OGRAM, A.; SAYLER, G.S.; GUSTIN, D.; LEWIS, R.J. DNA adsorption to soils and sediments. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 22, p. 982-984, 1988.

ØVREÅS, L. Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. **Ecology Letters**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 236–251, 2000.

PAGET, E.; MONROZIER, L. J.; SIMONET, P. Adsorption of DNA on clay minerals: protection against DNase I and influence on gene transfer. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 15, p. 143-152, 2004.

PAGET, E.; SIMONET, P. On track of natural transformation in soil. **FEMS Microbiological Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 109-118, 1994.

PALM, C. J.; SCHALLER, D. L.; DONEGAN, K. K.; SEIDLER, R. J. Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* α -endotoxin. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 1258-1262, 1996.

PIETRAMELLARA, G.; FRANCHI, M.; GALLORI, E.; NANNIPIERI, P. Effect of molecular characteristics of DNA on its adsorption and binding on homoionic montmorillonite and kaolinite. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 33, p. 402-409, 2001.

PIETRAMELLARA, J.; ASCHER, J.; BORGOGNI, F.; CECCHERINI, M. T.; GUERRI, G.; NANNIPIERI, P. Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 45, p. 219-235, 2009.

POLVERARI, A.; BUONAURO, R.; GUIDERDONE, S.; PEZATTI, S.; MARTE, M. Ultrastructural observations and DNA degradation analysis of pepper leaves undergoing a hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* p.v. *vesicatoria*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht; v. 106, p. 423-431, 2000.

ROMANOWSKI, G.; LORENZ, M. G.; WACKERNAGEL, W. Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 57, p. 1057-1061, 1991.

ROSCOE, R.; MADARI, B. E.; MACHADO, P. L. O. A. Fracionamento físico do solo na obtenção de frações mensuráveis para uso em simuladores da dinâmica da matéria orgânica. In: ROSCOE, R.; MERCANTE, F. M.; SALTON, J. S. (Ed.). **Dinâmica da matéria orgânica do solo em sistemas conservacionistas**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. p. 107-132.

SAEKI, K.; KUNITO, T. Adsorptions of DNA molecules by soils and variable-charged soil constituents. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current research, technology and education topics in applied microbiology biotechnology**. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2010. v. 1, p. 188-195.

SAXENA, D.; FLORES, S.; STOTZKY, G. BT toxin is released in root exudate from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. **Soils Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 133-137, 2002.

SAXENA, D.; SMRUTI, P.; STOTZKY, G. Fate and effects in soil of cry proteins from *Bacillus thuringiensis*: influence of physicochemical and biological characteristics of soil. **The Open Toxinology Journal**, Hilversum, v. 3, p. 151-171, 2010.

SAXENA, D.; STEWART, C. N.; ALTOSAAR, I.; SHU, Q.; STOTZKY, G. Larvicidal Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* are released in root exudates of transgenic *B. thuringiensis* corn, potato, and rice but not of *B. thuringiensis* canola, cotton, and tobacco. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 5, p. 383-387, 2004.

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

SOBERÓN, M.; FERNÁNDEZ, L. E.; PÉREZ, C.; GILL, S. S.; BRAVO, A. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxin. **Toxicon**, Oxford, v.49, p. 597-600, 2007.

SPOERING, A. L.; GILMORE, M. S. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 9, p. 133-137, 2006.

SPOSITO, G.; ZABEL, A. The assessment of soil quality. **Geoderma**, Amsterdam, v. 114, n. 3/4, p. 143-144, 2003.

THENG, B.K.G. Formation and Properties of Clay-Polymer. Complexes. Elsevier, Amsterdam, p.3-35, 1979.

THIES, J. E. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 71, p. 579-591, 2007.

THOMAS, C. M.; NIELSEN, K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 711-721, 2005.

TIEDJE, J. M.; ASUMING-BREMPPONG, S.; NUSSLEIN, K.; MARSH, T. L.; FLYNN, S. J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, p. 109-122, 1999.

TIMMONS, A. M.; O'BRIAN, E. T.; CHARTERS, Y. M.; DUBBLES, S. J., WILKINSON, M. J. Assessing the risk of wind pollination from fields of genetically modified *Brassica napus* ssp *oleifera*. **Euphytica**, Dordrecht, v. 85, p. 417-423, 1995.

TORSVIK, V.; ØVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, Washington, DC, v. 296, p. 1064-1066, 2002.

TSAI, Y.-L.; OLSON, B. H. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 58, p. 754-757, 1992.

VAN ELSAS, J. D.; DUARTE, G. F.; KEIJZER-WOLTERS, A.; SMIT, E. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 43, p. 133-151, 2000.

VAN LEEWEN, W.; RUTTIK, T.; BORST-VRENSSEN, A. W.; VANDER PLAS, L. H.; VAN DER KROL, A. R. Characterization of position induced spatial and temporal regulation

of transgene promoter activity in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 949-959, 2001.

Van RIE, J.; JANSSENS, S.; HOFTE, H.; DEGHEELE, D.; MALLAERT, H. V. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 186, p. 239-247, 1989.

VENTURINI, A. M. **Efeito do uso do solo e da rizosfera de cana-de-açúcar na estrutura e abundância de comunidades de Bactéria e do filo Verrucomicrobia**. 2014. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

VETTORI, C.; PAFFETTI, D.; SAXENA, D.; STOTZKY, G.; GIANNINI, R. Persistence of toxins and cells of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* introduced in sprays to Sardinia soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 1635-1642, 2003.

VINEELA, C.; WANI, S. P.; SRINIVASARAO, C.; PADMAJA, B.; VITTAL, K. P. R. Microbial properties of soil as affected by cropping and nutrient management practices in several long-term manorial experiments in the semi-arid tropics of India. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 40, p. 165-173, 2008.

WANG, H. Y.; YE, Q. F.; WANG, W.; WU, L. C.; WU, W. X. Cry1Ab protein from Bt transgenic rice does not residue in rhizosphere soil. **Environmental Pollution**, London, v. 143, p. 449-455, 2006.

WANG, H.; LI, J.; BOSTOCK, R. M.; GILCHRIST, D. G. Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. **Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 375-391, 1996.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 40, p. 549-576, 1986.

WIDMER, F.; SEIDLER, R. J.; DONEGAN, K. K.; REED, G. L. Quantification of transgenic plant marker gene persistence in the field. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, p. 1-7, 1997.

WIDMER, F.; SEIDLER, R. J.; WATRUD, L. S. Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 5, p. 603- 613, 1996.

WINDELS, P.; TAVERNIERS, I.; DEPICKER, A.; VAN BOCKSTAELE, E.; DE LOOSE, M. Characterization of the Roundup Ready soybean insert. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 213, p. 107-112, 2001.

YANNI, S. F.; WHALEN, J. K.; MA, B. L. Crop residue chemistry, decomposition rates, and CO₂ evolution in Bt and non-Bt corn agroecosystems in North America: a review. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, The Hague, v. 87, p. 277-293, 2010.

2 PERSISTÊNCIA DOS FRAGMENTOS DE TRANSGENIA DO MILHO Bt (EVENTO MON810) EM SOLOS AGRÍCOLAS DO BRASIL

Resumo

O impacto ambiental das culturas GM tem sido questionado em relação ao destino dos produtos derivados do processo de transgenia no ambiente. Os genes e as toxinas do milho Bt são liberados no solo pelos exsudatos das raízes das plantas, durante a incorporação de resíduos culturais e por meio do pólen. Após a entrada no solo, os transgenes podem ser adsorvidos as partículas ativas da superfície dos minerais e substâncias húmicas do solo, permanecendo protegido da ação enzimática, aumentando a sua persistência no solo. Assim, faz-se necessário a avaliação da persistência dos produtos derivados da transgenia no solo. Os objetivos do presente estudo foram: avaliar a persistência dos fragmentos 35S-hsp70, hsp70-*cry1Ab* e *cry1Ab*-planta da construção gênica do milho Bt (MON810) em diferentes tipos de solo e temperaturas, em condições de microcosmos, e em condições de campo. O DNA do milho Bt MON810 foi extraído do tecido foliar, misturado em água destilada ultrapura e adicionado em solos arenoso e argiloso a uma concentração de 40 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de solo. Como controle negativo apenas água estéril foi misturada ao solo. As amostras de solo foram incubadas por 291 dias, em 15 e 25°C com fotoperíodo de 16h luz: 8h escuro e umidade ajustada para 60% da capacidade de campo. As amostras de solo foram coletadas a partir dos diferentes tratamentos no tempo inicial (t_0) e para t_1 , t_2 , t_{10} , t_{30} , t_{60} , t_{90} , t_{180} e t_{291} dias. Depois da amostragem, o DNA foi extraído e os fragmentos: 35S-hsp70, hsp70-*cry1Ab* e *cry1Ab*-planta de milho Bt foram detectados e quantificados pela técnica de qPCR. Em campo, os solos foram amostrados em três áreas agrícolas na cidade de Fátima do Sul, MS. A partir das amostras de DNA, os fragmentos também foram quantificados pela qPCR. Os resultados mostraram que em condições de microcosmos, os fragmentos hsp70-*cry1Ab* e *cry1Ab*-planta persistiram até 291 dias nos solos, enquanto o fragmento 35S-hsp70 persistiu até 180 dias. A temperatura e o tipo de solo não afetaram a persistência dos fragmentos. Em condições de campo, o número de cópias desses fragmentos aumentou na segunda amostragem em todas as áreas estudadas.

Palavras-chaves: milho Bt, *cry1Ab*, quantificação, solo, qPCR

PERSISTENCE OF TRANSGENIC FRAGMENTS FROM Bt CORN (EVENT MON810) IN AGRICULTURAL SOILS OF BRAZIL

Abstract

The environmental impact of GM crops has been questioned about the fate of products derived from transgenesis process on the environment. The genes and toxins of Bt corn are released into the soil by root plant exudates, during the incorporation of crop residues and through pollen. Upon entry into the soil, the transgenes can be adsorbed onto the active surface of the mineral particles and humic substances, remaining protected from enzymatic action, increasing its persistence in the soil. Thus, it is necessary to evaluate the persistence of products derived from transgenesis in the soil. Therefore, the objectives of this study were to assess the persistence of 35S-hsp70, hsp70-*cry1Ab* and *cry1Ab*-plant fragments from the genetic construction of Bt corn (MON810) in different soil types and temperatures under microcosm and under field conditions. DNA from Bt corn MON810 was extracted from leaf tissue, mixed in ultrapure distilled water and added to sandy and clay soils at 40 $\mu\text{g. g}^{-1}$ soil. As a negative control, only sterile water was mixed with the soil. Soil samples were incubated for 291 days, at 15 and 25°C with photoperiod 16h light: 8h dark and humidity adjusted to 60% of field capacity. Soil samples were collected from the different treatments at initial point (t_0) and t_1 , t_2 , t_{10} , t_{30} , t_{60} , t_{90} , t_{180} and t_{291} days. After sampling, DNA was extracted and fragments: 35S-hsp70, hsp70-*cry1Ab* and *cry1Ab*-plant from Bt corn were detected and quantified by qPCR technique. At the field, soils were sampled in three agricultural areas in the city of South Fatima, MS. From the DNA samples, the fragments also were quantified by qPCR. The results showed that in microcosm conditions, hsp70-*cry1Ab* and *cry1Ab*-plant persisted until 291 days in soil, while the 35S-hsp70 fragment persisted up to 180 days. The temperature and the type of soil did not affect the persistence of fragments. Under field conditions, the copy number of these fragments increased in the second sampling in all studied areas.

Keywords: Bt corn, *cry1Ab*, quantification, soil, qPCR

2.1 Introdução

A introdução de plantas geneticamente modificadas no ambiente tem levantado questões sobre o destino dos produtos derivados da transgenia no solo, sendo que em altas concentrações, esses produtos poderiam ser mais eficientes no controle de pragas, ou, então, representariam um risco aos organismos não alvos, tais como os insetos benéficos (polinizadores, predadores e parasitóides) e a microbiota do solo (LOSEY et al., 1999; STOTZKY, 2004).

As plantas transgênicas têm sido produzidas para expressar proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* em seus tecidos para o controle de insetos-praga, promovendo assim uma redução dos problemas associados com a utilização de pesticidas (STOTZKY, 2004). Para tanto, o acúmulo e a persistência das toxinas pode levar a seleção de organismos resistentes no ambiente (TABASHNIK et al., 1997).

Inevitavelmente, os genes e as toxinas do milho Bt são liberadas no solo pelos exsudatos das raízes ao longo do crescimento das plantas (SAXENA et al., 1999; SAXENA, STOTZKY, 2000), durante a incorporação dos resíduos culturais, após a colheita (TAPP, STOTZKY, 1998; STOTZKY, 2002) e por deposição de pólen durante o pendramento do milho (LOSEY et al., 1999). Após a entrada no solo, eles podem ser adsorvidos e ligados à superfície ativa das partículas do solo (minerais de areia, argila e substâncias húmicas), e serem protegidos da degradação enzimática pelos microrganismos, aumentando a sua persistência no solo, por meses ou até anos (STOTZKY, 2000).

No Brasil, um dos maiores avanços na agricultura foi à introdução do sistema de plantio direto. Nesse sistema, um aumento notável da biomassa no solo ocorre com o decorrer do tempo, e com o cultivo em larga escala de organismos geneticamente modificados em solos agrícolas há uma grande preocupação em relação à presença e ao destino de seus produtos derivados da transgenia no ambiente. Cabe ainda considerar as diferentes temperaturas e tipos de solo que o país apresenta, os quais são fatores relevantes que podem influenciar na persistência do DNA no ambiente. No presente estudo, para avaliar a persistência dos transgenes em solos do Brasil, utilizou-se como modelo o milho Bt (evento MON810), o qual contém o gene *cryIAb* e outras sequências que compõem a construção gênica.

2.2 Objetivos

Determinar a abundância dos fragmentos, *35S-hsp70*, *hsp70-cry1Ab*, *cry1Ab*-planta, da construção gênica do milho Bt (evento MON810) em solos arenoso e argiloso, mantidos em condições de microcosmos; e em solos de áreas agrícolas do Mato Grosso do Sul, sob cultivo de milho transgênico.

2.3 Material e métodos

2.3.1. Estudo I: Detecção de fragmentos do evento MON810 em Microcosmos

O experimento de microcosmos foi conduzido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP em condições controladas com fotoperíodo de 16h luz: 8h escuro, em duas condições de temperatura (15 e 25°C), dois tipos de solo, arenoso e argiloso, e dois tratamentos (adição de DNA no solo e sem adição de DNA). O solo com textura argilosa foi amostrado na Fazenda Anhembi, no município de Anhembi/SP, e o solo com textura arenosa foi coletado na Fazenda Areão, no município de Piracicaba/SP (Figura 2.1 A e B).

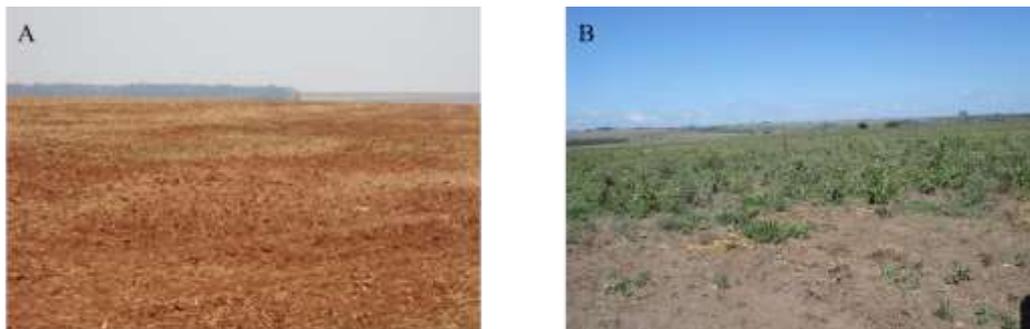


Figura 2.1 - (A) Solo argiloso, coletado na Fazenda Areão, Piracicaba, SP. (B) Solo arenoso, coletado na Fazenda Anhembi, Anhembi, SP

2.3.2 Extração de DNA vegetal (milho MON810)

As extrações de DNA genômico do milho transgênico e da sua linha não-isogênica foram realizadas de acordo com o protocolo Doyle e Doyle (1990) modificado. A qualidade e a quantidade de DNA foram determinadas por absorvância em nanodrop, com razão entre $A_{260}/A_{280} = 1,91$ a 2,2, e recuperação de 800 a 3000 ng/ μ l de DNA.

2.3.3 Ensaio em microcosmos

Em vasos de vidro hermeticamente vedados foram adicionados 200 g de solo não estéril, os quais foram gentilmente passados por peneira de malha de 2 mm, totalizando 24 vasos. Em 12 vasos foram adicionados solo de textura argilosa e nos demais vasos solo de textura arenosa. Em seguida, os vasos contendo os diferentes tipos de solo foram divididos na metade, sendo seis de cada textura para o controle (sem adição de DNA vegetal) e seis com a adição de DNA do milho Bt. Por fim, os vasos foram divididos em mais duas partes: metade foi incubada a 15°C e a outra metade a 25°C, ambos com fotoperíodo de 16h luz e 8h escuro (Figura 2.2 A).

Foram adicionados 40µg de DNA total da planta de milho Bt por grama de solo (DOUVILLE et al., 2007), diluídos em água destilada, sendo que o volume de água foi ajustado de acordo com a capacidade de retenção de água calculada para ambos os solos e corrigidos através do peso de cada vaso. Após a adição de DNA, os vasos foram incubados no escuro por 1h a 15°C para permitir a adsorção do DNA às partículas de solo (FRANCHI et al., 1999). Nos controles negativos (sem adição de DNA) foram adicionadas as mesmas quantidades de água destilada esterilizada.

A primeira coleta foi feita após 1h do período de incubação (t_0), enquanto as demais foram coletadas no primeiro dia (t_1), e posteriormente t_2 , t_{10} , t_{30} , t_{60} , t_{90} , t_{180} e t_{291} . Todas as coletas foram realizadas em câmara de fluxo laminar com assepsia da mesma, onde se flambava as bocas dos frascos na abertura e fechamento no momento da coleta, e todo material utilizado era autoclavado (colheres, ponteiras, pinças). Estes cuidados eram realizados para se evitar contaminação do experimento (Figura 2.2B).

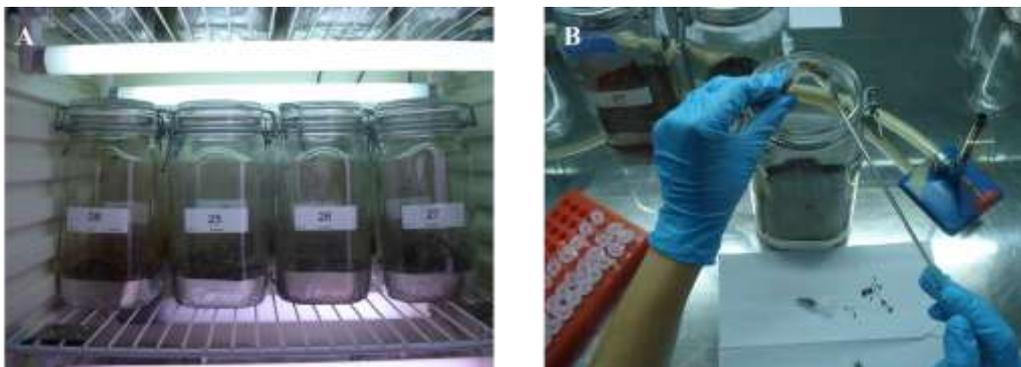


Figura 2.2 - (A) solos argiloso e arenoso, incubados em temperaturas de 15 e 25°C, (B) coleta de solos em câmara de fluxo laminar.

2.3.4 Extração de DNA das amostras de microcosmos

A extração de DNA total das amostras de solo foi realizada usando o *Kit Power Soilyzer DNA ExtractionTM* (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e quantidade aproximada de DNA foram conferidas em gel de agarose 1% (SAMBROOK et al., 1989). Para retirar as impurezas (DNA puro tem uma razão $A_{260}/A_{280}=1,7-2,2$), as amostras de DNA foram purificadas pelo kit comercial UltraCleanSoil até uma pureza satisfatória ser obtida.

2.3.5 Desenho de iniciadores para qPCR

Iniciadores foram desenhados nas junções dos genes, 35S-hsp70 e hsp70-*cryIAb*, da construção gênica do milho *Bt* (Quadro 1) com o auxílio do programa Primer 3, considerando os parâmetros: Tm: mínima = 59° e máxima = 62°C; tamanho do fragmento: entre 100 e 300 pb; tamanho do iniciador: mínimo = 18, ótimo = 20 e máximo = 22; conteúdo de GC: entre 50 e 60% (Tabela 2.1). Já o iniciador específico usado para a junção do gene *cryIAb*-planta foi obtido do trabalho de Hernández et al. (2003). As sequências gênicas utilizadas estão disponíveis no Banco de Dados “GMO Detection Method Database (GMDD)” <http://gmdd.shgmo.org/>.

DNA planta	CaMV 35S	hsp70	<i>cryIAb</i>	DNA planta
------------	----------	-------	---------------	------------

Quadro 1 - Construção gênica do milho Bt (evento MON810)

Tabela 2.1 - Sequência de iniciadores desenhados para o milho Bt evento MON810

Abreviação	Sequência 5'-3' (Forward/Reverse)	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
35S-hsp70	TGACGCACAATCCCACTATC GGCAGTAACAAAGGCAGAGG	147	60
hsp70- <i>cryIAb</i>	ATCTTGCTCGATGCCTTCTC ATGCACTCGTTGATGTTTGG	120	61
<i>cryIAb</i> -planta	CAAGTGTGCCACACAGC GCAAGCAAATTCGGAAATGAA	106	62

2.3.6 Detecção e quantificação dos fragmentos de transgenia por PCR quantitativo

O termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems), existente no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, foi utilizado para a detecção quantitativa por PCR fluorescente em tempo real (qPCR) com SYBR Green I como corante fluorescente. A reação em um volume final de 10 µL, contendo 5 µL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Fermentas), 0,5 µM de iniciadores *forward* e *reverse*, e 1 µL de amostra teste.

As curvas padrões foram obtidas com base nos produtos amplificados diluídos em série (1:10) nos intervalos de 10^6 a 10^1 genes/µL para 35S-hsp70, 10^5 a 10^1 genes/µL para hsp70-*cryIAb* e 10^6 a 10^1 genes/µL para *cryIAb*-planta genes/µL, posteriormente foram purificados utilizando o Kit *GFX*™ (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante, quantificados em *Thermo Scientific NanoDrop 2000*.

As condições de reação para qPCR dos fragmentos do milho Bt (evento MON810) foram: 10 min desnaturação inicial a 95°C, 40 ciclos consistindo dos seguintes passos: 15s de desnaturação a 95°C, 30 s de anelamento, com as temperaturas específicas para cada iniciador (Tabela 2.1), e 20 s de extensão a 72°C com leitura de fluorescência.

Uma análise da curva de *melting* foi feita imediatamente após 40 ciclos, sendo 95°C por 1 min, a temperatura específica de cada iniciador (Tabela 2.1) por 1 min e aumento de temperatura até 95°C com coleta de fluorescência a cada 0,7°C de incremento na temperatura.

2.3.7 Estudo II: Detecção de fragmentos do evento MON810 em Campo

O experimento foi conduzido na cidade de Fátima do Sul, Mato Grosso do Sul, em três áreas agrícolas (A₁, A₂ e A₃), durante os meses de agosto de 2011 e janeiro de 2012 (Figura 2.3). As recomendações de adubação e densidade das plantas foram seguidas de acordo com as recomendações da Embrapa (2007) para a cultura de soja e milho. Adicionalmente foram feitas duas aplicações por cobertura de uréia 60 kg de N na cultura de milho.

Todas as fazendas apresentaram histórico de cultivo de milho transgênico há pelo menos cinco anos, exceto a área A₃. Nessa área, a primeira amostragem coincidiu com o primeiro ano de cultivo, mais especificamente do milho Bt Yieldgard (evento MON810).

As amostras foram coletadas na profundidade de 0-0,10 m de profundidade em três áreas agrícolas compostas por 40 hectares em 2011, no início da pós-colheita do milho, e cinco meses após a colheita, em 2012.

Em cada área, foram amostrados cinco pontos na linha de cultivo a cada 100 metros, e cada ponto composto por cinco subpontos. As amostras foram coletadas com tubos de PVC de 10 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro, fixados verticalmente nos solos. Em seguida, as amostras foram seladas e mantidas em baixa temperatura em caixas térmicas com gelo.

As amostras provenientes dos subpontos de cada ponto foram homogêneas para compor uma amostra, totalizando cinco réplicas experimentais. De cada réplica experimental, três alíquotas foram retiradas e armazenadas em ultrafreezer Glacier Ultra Low Freezer (Nuair Corporation), a -80°C para a extração de DNA. O solo restante foi enviado ao Laboratório de Análises Químicas do Departamento de Ciências do Solo, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP).



Figura 2.3 - Áreas agrícolas da cidade de Fátima do Sul, MS

As extrações de DNA dos solos das áreas agrícolas (A_1 , A_2 e A_3) e a detecção e quantificação dos fragmentos de transgenia por PCR quantitativo foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos nos itens 2.3.3 e 2.3.5.

2.3.8 Análise de Dados

Os dados do qPCR foram obtidos pelo StepOne Software 2.2.2 (Applied Biosystems), deste foram exportados para o programa Excel (Microsoft) onde foram calculados as quantidades de cópias do gene para cada grama de solo. A partir desses dados foram realizadas as análises estatísticas utilizando o pacote ‘agricolae’ no R. Os dados foram submetidos à ANOVA e suas médias contrastadas pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

2.4 Resultados

2.4.1 Estudo I: Detecção de fragmentos do evento MON810 em Microcosmos

2.4.1.1 Análise físico-química do solo

Os teores de pH, alumínio, cálcio, potássio, magnésio, zinco e matéria orgânica do solo não resultaram em diferenças entre os tipos de solo (Tabela 2.2). O valor de fósforo foi incrementado no solo argiloso quando comparado ao solo arenoso, possivelmente por estar envolvido na absorção de fósforo pela argila, processo bem descrito na literatura.

Dentre os micronutrientes, os que chamaram mais atenção foram os teores de ferro, resultando em elevados teores para o solo arenoso. O solo argiloso foi classificado dentro da classe textural muito argiloso e o solo arenoso foi classificado dentro da classe textural franco argiloso arenosa.

Tabela 2.2 - Valores da análise químico-física de um horizonte de 0-20 cm do solo sob dois diferentes tipos de solo

Atributos físico-químicos dos solos					
Parâmetros			Micronutrientes (mg.dm ⁻³)		
	Arenoso	Argiloso	Parâmetros	Arenoso	Argiloso
pH (CaCl ₂)	4,4	4,6	Cu	4	9
P (mg.dm ⁻³)	9	18,3	Fe	200	28
K (mmolc.dm ⁻³)	32,3	27,3	Zn	14	11
Ca (mmolc.dm ⁻³)	15,3	18,3	Mn	41	32
Mg (mmolc.dm ⁻³)	8	7	B	32	28
Al (mmolc.dm ⁻³)	2	1,7	Físicos		
H+Al (mmolc.dm ⁻³)	47	48,7	Parâmetros	Arenoso	Argiloso
SB	26,7	28,3	Argila (<0,002 mm)	206	598
CTC	73,7	77	Silte (0,053-0,002 mm)	64	115
V %	36	36,3	Areia Total (g.kg ⁻¹)	730	287
m %	7	5,7	Areia Grossa (2,00-0,210 mm)	327	120
M.O (gdm-3)	25,7	20,7	Areia Fina (0,210-0,053mm)	403	167
SO ₄ (mg.dm-3)	4,7	5,7			

2.4.1.2. Análise de PCR quantitativo

A alta especificidade e sensibilidade da técnica de qPCR em tempo real permitiu determinar os fragmentos da construção gênica do milho Bt evento (MON810) em amostras de DNA extraídas dos solos de microcosmos e de áreas agrícolas.

A eficiência de amplificação das reações de qPCR, variaram de 90,238 a 103,684%, as curvas-padrão apresentaram coeficientes de correlação (R^2) de 0,99, enquanto as curvas de *melting* referentes aos *amplicons* gerados com os iniciadores específicos apresentaram picos únicos, indicando a existência de um produto específico (Figura 2.4 A, B e C).

As temperaturas de 15 e 25°C e o tipo de solo, arenoso e argiloso, não afetaram significativamente a persistência de nenhum dos fragmentos estudados ($p > 0,05$). No tratamento controle (sem adição de DNA do milho Bt ao solo) nenhum dos fragmentos foi detectado.

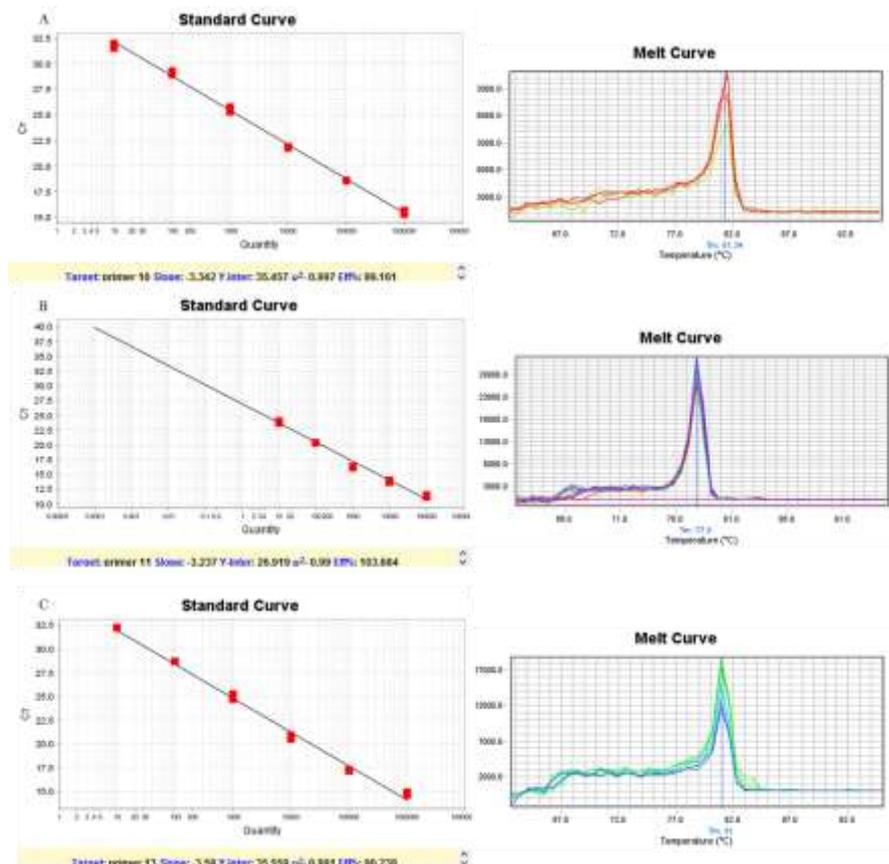


Figura 2.4 – Curvas padrão e de *Melting* dos *amplicons* gerados para os fragmentos 35S-hsp70 (A), hsp70-cryIAb (B) e cryIAb-planta (C)

Altas abundâncias dos fragmentos 35S-hsp70, hsp70-*cryIAb* e *cryIAb*-planta foram observadas em todos os solos com adição de DNA (Figura 2.5 A, B e C). Para tanto, diferenças ($p < 0,05$) foram observadas no número de cópias dos fragmentos em função do tempo de incubação dos experimentos.

A abundância do fragmento 35S-hsp70 foi maior nos tempo t_0 , t_1 , e t_2 para o solo arenoso, e em t_0 , t_1 , t_2 e t_{10} para o argiloso, que nos demais tempos (Figura 2.5 A). Enquanto que, a abundância do fragmento hsp70-*cryIAb* foi maior no tempo t_0 tanto para o solo arenoso como para o solo argiloso, em relação aos demais tempos (Figura 2.5 B). E o fragmento *cryIAb*-planta nos tempos t_0 , t_1 , t_2 e t_{10} para os dois tipos de solo, quando comparado aos demais tempos de amostragem (Figura 2.5 C).

Em solo arenoso, apenas 2,76 e 4,72% da quantidade inicial de cópias do t_0 dos fragmentos hsp70-*cryIAb* e *cryIAb*-planta, respectivamente, foram encontrados no último dia do tempo de incubação t_{291} , enquanto em solo argiloso, obteve-se 0,54 e 3,1%.

Para o fragmento 35S-hsp70, cerca de 0,13 e 0,76% da quantidade inicial de cópias do t_0 foram encontradas no último dia do tempo de incubação t_{180} , em solo arenoso e argiloso, respectivamente.

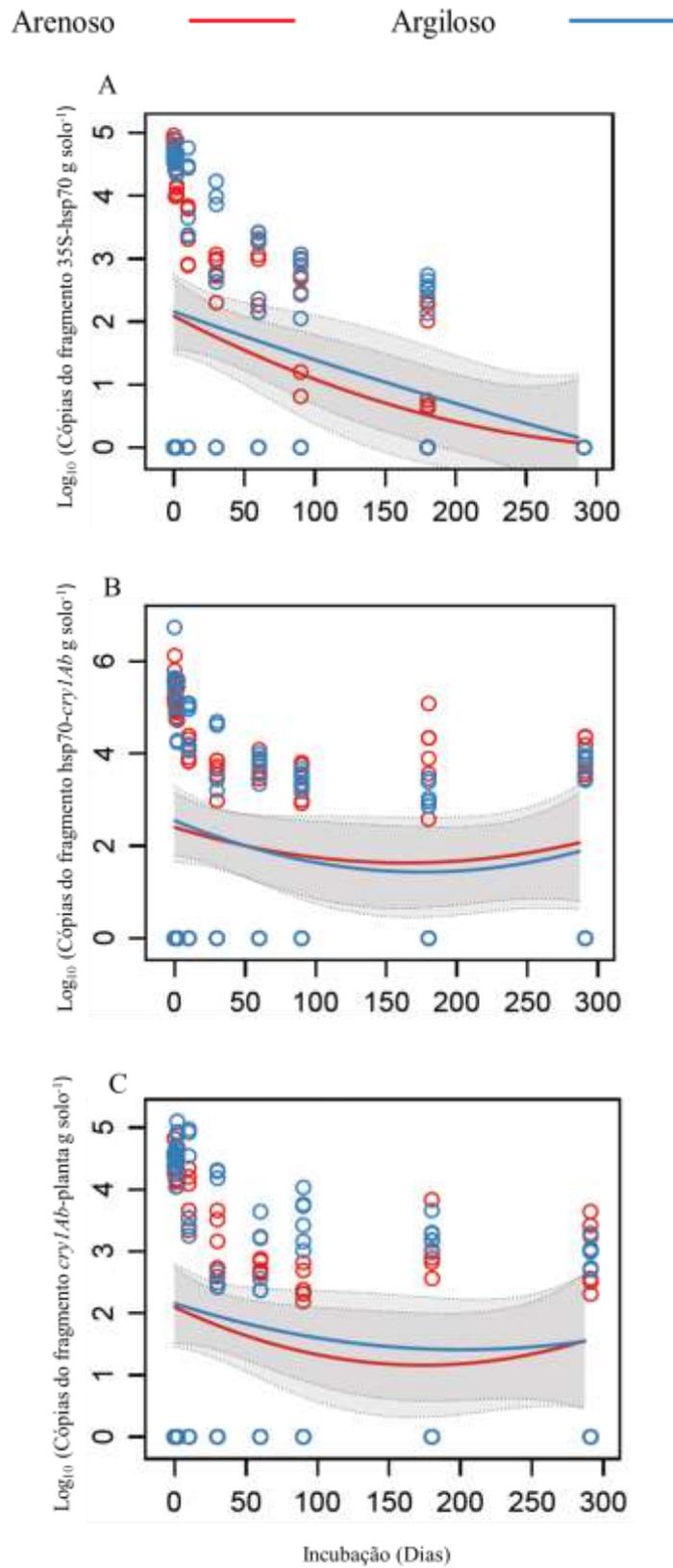


Figura 2.5 - Persistência dos fragmentos 35S-hsp70 (A), hsp70-cry1Ab (B) e cry1Ab-planta (C) da construção gênica do milho *Bt* MON810 em solos agrícolas, mantidos em microcosmos, durante 291 dias. (Regressão Tukey ($p < 0,05$)).

No presente estudo, o fragmento 35S-hsp70 persistiu nos solos arenoso e argiloso por 180 dias, esses resultados corroboram com os encontrados por Gebhard e Smalla (1999), que detectaram sequências da construção específica beterraba (*Beta vulgaris* L.) em solos não estéreis, mantidos em microcosmos, durante 180 dias. Entre os fragmentos encontrados estavam 35S/BNYVV, *bar*/TR1 e TR2/*nptII*.

Em outro estudo, 0,08% das sequências do gene rNPT-II, proveniente de DNA plasmidial, adicionado ao solo e incubado em condições controladas, foram detectadas após 40 dias do período de incubação. No entanto, em experimento de microcosmos com folhas de tabaco transgênico (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi) que contém o gene rNPT-II, incorporadas ao solo, as sequências foram detectadas após 120 dias de incubação (WIDMER et al. 1996).

Chi-Chu Lo et al. (2007) também verificaram que os fragmentos pB1121/NOS-T (398 pb), 35S-P/PRSV-CP (796 pb) e NOS-P/*nptII* (200 pb) persistem por mais tempo em água estéril que em solos não estéreis, indicando que a degradação enzimática e adsorção ao solo desempenharam papéis importantes na persistência de DNA no ambiente.

A razão para que um fragmento persista por mais tempo que outro fragmento no ambiente não está clara, mas o conteúdo de guanina e citosina no fragmento de DNA pode estar envolvido na sua estabilidade (CHI-CHU LO et al., 2007), assim como o comprimento do fragmento em questão. Em nosso estudo, a porcentagem de GC dos genes 35S (327 pb), *hsp 70* (805 pb) e *cryIAb* (2856 pb) é de 48, 38,3 e 60,7%, respectivamente. Assim, foi possível observar uma tendência de queda na detecção do fragmento 35S-*hsp70* mais rápida que para os outros fragmentos, na qual uma quantidade mínima de 10^3 cópias.g solo⁻¹ não pôde mais ser detectada depois de 60 dias de incubação.

Em experimento de microcosmos, o gene *cryIAb* do milho Bt MON810 adicionado em água esterilizada e filtrada, e em sedimentos de areia e argila persistiu por 20 e 40 dias, respectivamente (DOUVILLE et al., 2007). Em outro estudo conduzido com milho Bt MON810, Marchetti et al. (2007) plantaram híbridos em vasos contendo solo arenoso, e incubaram em casa de vegetação até o estágio R6, após a colheita os solos permaneceram por mais seis meses no mesmo local, posteriormente, a análise de qPCR do DNA total extraído do solo não apresentou níveis detectáveis do gene *cryIAb*.

Os experimentos de microcosmos e de casa de vegetação têm sido muito empregados para elucidar a dinâmica do DNA no ambiente (GULDEN et al., 2008). No entanto, a avaliação do risco do DNA no ambiente, sua longevidade e comportamento no ambiente, tem sido conduzida, por alguns autores, em condições campo.

2.4.2 Estudo II: Detecção de fragmentos do evento MON810 em Campo

2.4.2.1 Análise físico-química do solo

Os resultados da análise estatística revelaram diferenças significativas nos teores de pH, fósforo e capacidade de troca catiônica nos solos das áreas agrícolas, as quais estão representadas na Tabela 3.

As três áreas agrícolas apresentaram pH abaixo de 7, entretanto uma redução significativa ($p < 0,05$) no nível da acidez foi observada apenas na área da fazenda 3 entre os anos (2011 e 2012). Em 2012, diferenças significativas foram verificadas entre as áreas agrícolas ($p < 0,05$). O incremento significativo ($p < 0,05$) de fósforo na área da fazenda 2 pode estar relacionado com a adição de fertilizantes no solo (FRANCHINI et al., 2010).

A capacidade de troca catiônica foi significativamente diferente no solo das três fazendas estudadas ($P < 0,05$) em 2012. A CTC é a capacidade do solo em reter cátions permutáveis ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + \text{K}^+ + \text{H}^+ + \text{Al}^{3+}$) à sua superfície (RONQUIM, 2010). Enquanto, a soma de bases de um solo representa a soma desses cátions trocáveis, exceto $\text{H}^+ + \text{Al}^{3+}$, e é um indicativo das condições de fertilidade do solo (RONQUIM, 2010). Em função do índice da soma de bases ($V \geq 50\%$), os solos das áreas agrícolas foram considerados férteis.

De acordo com os teores de areia, silte e argila, os solos das três áreas agrícolas foram classificados como argiloso (35% a 60% de argila) (EMBRAPA, 2006).

Tabela 3 - Valores da análise químico-física de um horizonte de 0-20 cm de solos coletados na região de Fátima do Sul, MS

Amostra		pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V %	M.O	Areia	Silte	Argila	
Ano	Área	KCl	mg.Kg ⁻¹	mmolc.kg ⁻¹				(g.kg-1)								
2011	1	5,2	24,0 ^B	5,0	60,0	22,0	<1	34,0	88,5	122,6 ^{A*}	72,0	33,0	233,1	202,0	561,2	
	2	5,3	32,0 ^A	8,0	67,0	18,0	<1	38,0	91,1	125,5 ^A	68,0	35,0	282,0	256,2	459,0	
	3	5,4 [*]	19,0 ^B	7,5	59,0	21,0	<1	34,0	87,8	124,8 ^A	72,0	31,0	253,2	265,0	483,6	
2012	1	5,1 ^A	11,0 ^B	11,3	43,0	19,0	<1	34,0	76,4	100,0 ^B	69,0	33,0	232,0	202,1	563,0	
	2	5,5 ^B	54,0 ^A	16,6	69,0	21,0	<1	20,0	105,8	128,1 ^A	86,0	37,0	286,2	254,2	455,1	
	3	5,0 ^{AB}	15,0 ^B	9,9	57,0	17,0	<1	34,0	83,5	119,5 ^A	70,0	31,0	251,6	263,0	481,0	

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças por Tukey HSD ($p < 0,05$) entre as áreas.

* indica diferença por Tukey HSD ($p < 0,05$) entre o ano de amostragem

2.4.2.2 Análise de PCR quantitativo

O cultivo crescente das culturas geneticamente modificadas levou a necessidade de monitorar os genes introduzidos no ambiente, especialmente em solos agrícolas manejados com plantio direto.

Após a conversão dos valores obtidos para número de cópias do fragmento por grama de solo, a análise de variância dos fragmentos 35S-hsp70, hsp70-*cryIAb* e *cryIAb*-planta não revelaram diferenças significativas entre as áreas agrícolas estudadas ($p > 0,05$) (Figura 2.6 A). Entretanto, diferenças significativas na abundância dos fragmentos foram observadas entre os diferentes anos de amostragem ($p < 0,05$).

A abundância do fragmento 35S-hsp70 foi maior ($p < 0,05$) nas três áreas estudadas no ano de 2012 (Figura 6 A). Resultados similares foram verificados com o número de cópias do fragmento hsp70-*cryIAb*, exceto na área 1 (A_1), não havendo diferença entre os anos amostrados (Figura 2.6 B).

Quanto a abundância do fragmento *cryIAb*-planta, apenas 100 cópias g solo⁻¹ do fragmento *cryIAb*-planta foi encontrado na área A_1 em 2011, e em 2012 foi abaixo do nível de detecção (Figura 2.6 C).

Dos valores médios entre os anos (2011 e 2012), foi observado um aumento ($p < 0,05$) de 9, 3 e 18 vezes mais cópias g solo⁻¹ dos fragmentos 35S-hsp70, hsp70-*cryIAb* e *cryIAb*-planta, respectivamente, em 2012 (Figura 2.6 A, B, C).

O incremento de cópias.g solo⁻¹ observado em 2012 pode estar relacionado com a grande quantidade de plantas em decomposição no solo, resultado do sistema de plantio direto. Segundo Widmer et al. (1996) a decomposição dos tecidos das plantas transgênicas libera DNA no solo, o material genético pode ser estabilizado na matriz do solo, persistindo por tempo indeterminado no ambiente.

Em ambiente temperado, Gulden et al. (2008) verificaram a importância do monitoramento do DNA de planta liberado no ambiente em três áreas de rotação de culturas. Os solos foram amostrados após plantio, durante o desenvolvimento das culturas e na pós-colheita, em cada área. Os genes alvo do estudo eram *CP4epsps* e *10-kDZein* de milho e *CP4epsps* de soja. Em todos os locais e anos, observaram um distinto padrão no conteúdo de DNA no solo, com elevada quantidade de DNA durante o desenvolvimento da cultura e um decréscimo após a colheita e antes da semeadura.

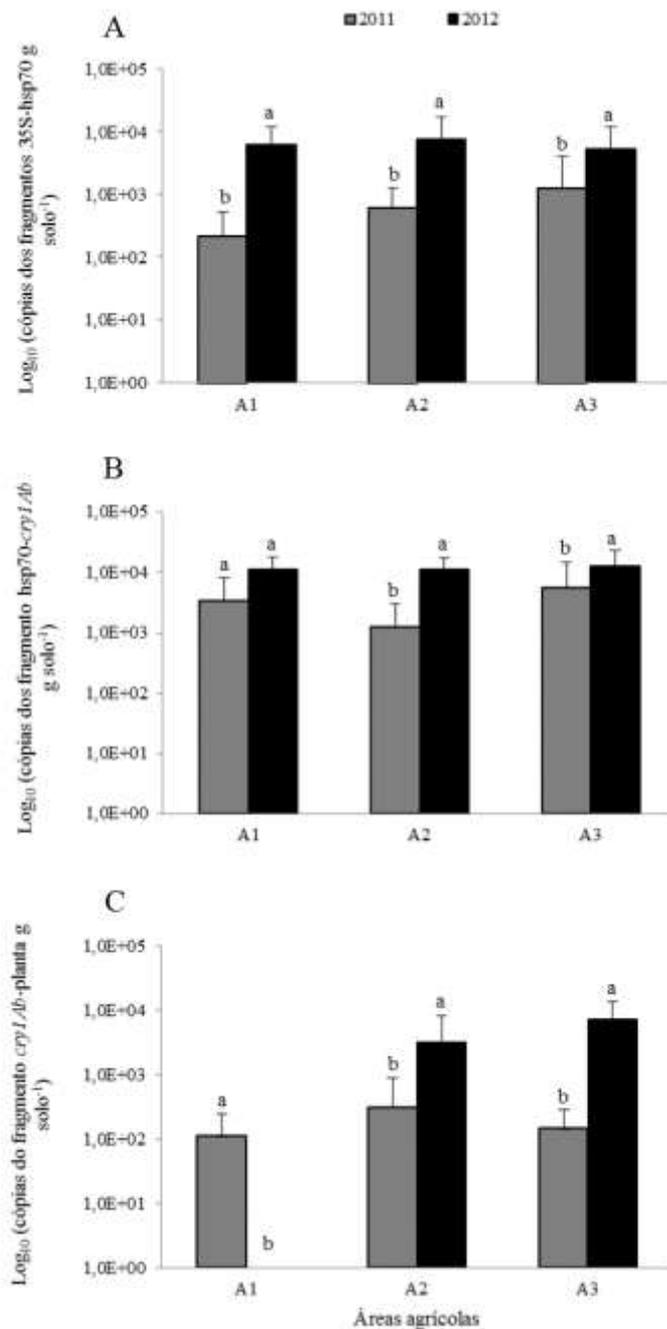


Figura 2.6 - Persistência dos fragmentos 35S-hsp70 (A), hsp70-cry1Ab(B) e cry1Ab-plant (C) da construção gênica do milho Bt evento MON810 em solos de três áreas agrícolas (A₁, A₂ e A₃), no início da pós-colheita de milho transgênico (2011), e 5 meses após esse período (2012) (B). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças por Tukey HSD ($p < 0,05$) entre os anos

O pH do solo é um dos fatores que contribuí com a persistência do DNA no ambiente. Em pH acima de 5,0 os constituintes do solo e o DNA apresentam cargas negativa, assim a adsorção do DNA ao solo argiloso requer a presença de um mediador, cátions (Ca^{2+} e Mg^{2+}) (LEVY-BOOTH et al., 2007). Nesse estudo, verificou-se que o pH das área estava entre

5,0 a 5,5, e que os teores de cálcio e magnésio estavam adequados, o que pode ter contribuído com a longa persistência observada dos fragmentos no solo.

Outro ponto importante para a persistência dos fragmentos é a grande quantidade de palhada no solo, resultado do sistema de manejo adotado nessas áreas agrícolas, o plantio direto. Esse sistema de produção fundamenta-se na ausência de revolvimento do solo, em sua cobertura permanente e na rotação de culturas, além da formação de palha na cobertura do solo, resultando em menor variação da temperatura (HECKLER; SALTON, 2002).

Cabe ainda ressaltar que alguns estudos têm relatado diferenças no conteúdo de lignina em planta transgênica e na sua linha isogênica. Uma vez que a análise de seções transversais do caule por meio de microscopia de fluorescência revelou que os feixes vasculares e as células do esclerênquima, contendo lignina, foram quase duas vezes mais espessos em plantas transgênicas que na sua linha isogênica. Vários estudos com plantas transgênicas como, arroz, tabaco, algodão, milho e batata, relataram sobre o alto conteúdo de lignina (10 a 66% maior do que sua linha isogênica) (VIKTOROV, 2008).

A longa persistência do DNA também foi verificada por outros estudos. Gebhard e Smalla (1999) detectaram fragmentos da construção gênica da beterraba transgênica (*Beta vulgaris* L.) em solos agrícolas até dois anos. Widmer et al. (1997), observaram que o gene rNPT-II pode persistir em áreas agrícolas por vários meses.

Experimentos de campo conduzido por Douville et al. (2007) revelaram que o gene *cryIAb* foi mais abundante em sedimento que na superfície das águas. E que a quantidade de cópias do gene associado ao sedimento tende a diminuir com a distância das áreas de cultivo, mas pode persistir por meses no ambiente.

2.5 Conclusões

Com base nos resultados obtidos conclui-se que em condições controladas e usando iniciadores específicos, foi possível detectar os fragmentos *hsp70-cryIAb* e *cryIAb*-planta, com drásticas reduções, mas persistindo até o período amostrado de 291 dias, em temperaturas de 15 e 25°C, em solos arenoso e argiloso, sem histórico de cultivo de milho Bt.

A persistência dos fragmentos do milho Bt em áreas agrícolas não foi afetadas pelas condições ambientais e pelo sistema de manejo utilizado, entretanto, um aumento da quantidade de cópias.g solo⁻¹ desses fragmentos pôde ser observado na cultura subsequente.

Referências

- DOUVILLE, M.; GAGNÉ, F.; BLAISE, C.; ANDRÉ, C. Occurrence and persistence of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and transgenic Bt corn cry1Ab gene from aquatic environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 66, p. 195-203, 2007.
- DOYLE J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v. 12, p. 13-15, 1990.
- EMBRAPA. Adubação nitrogenada suplementar tardia na soja cultivada em Latossolo do Cerrado. 1. ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 16 p.
- EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306 p.
- FRANCHI, M.; BRAMANTI, E.; BONZI, L.M.; ORIOLI, P.L.; VETTORI, C.; GALLORI, E. Clay-nucleic acid complexes: characteristics and implications for the preservation of genetic material in primeval habitats. **Origins of Life and Evolution of the Biosphere**, Dordrecht, v. 29, p. 297-315, 1999.
- FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; WRUCK, F. J.; SKORUPA, L. A.; WINK, N. N.; GUISSOLPHI, I. J.; CAUMO, A. L.; HATORI, T. **Integração lavoura-pecuária**: alternativa para diversificação e redução do impacto ambiental do sistema produtivo no Vale do Rio Xingu. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 20 p. (Circular Técnica, 77).
- GMO DETECTION LABORATORY. GMO Detection Method Database (GMDD): Disponível em: [www.http://gmdd.shgmo.org/](http://gmdd.shgmo.org/). Acesso: 10 set. 2009.
- GEBHARD, F.; SMALLA, K. Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 28, p. 261-272, 1999.
- GULDEN, R. H.; LERAT, S.; BLACKSHAW, R. E.; POWELL, J. R.; LEVY-BOOTH, D. J.; DUNFIELD, K. E.; TREVORS, J. T.; PAULS, P. K.; KLIRONOMOS, J. N.; SWANTON, C. J. Factors affecting the presence and persistence of plant DNA in the soil environment in corn and soybean rotations. **Weed Science**, Ithaca, v. 56, p. 767-774, 2008.
- HERNÁNDEZ, M.; PLA, M.; ESTEVE, T.; PRAT, S.; PUIGDOMÈNECH, P.; FERRANDO, A. A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard based on the 3'-transgene integration sequence. **Transgenic Research**, London, v. 12, n. 2, p. 179-189, 2003.
- LEVY-BOOTH, D. J.; CAMPBELL, R. G.; GULDEN, R. H.; HART, M. M.; POWELL, J. R.; KLIRONOMOS, J. N.; PAULS, K. P.; SWANTON, C. J.; TREVORS, J. T.; DUNFIELD, K. E. Cycling of extracellular DNA in the soil environment. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 2977-2991, 2007.

LO, C. C.; CHEN, S. C.; YANG, J. Z. Use of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) and transformation assay to monitor the persistence and bioavailability of transgenic genes released from genetically modified papaya expressing *nptII* and PRSV genes in the soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 55, p. 7534-7540, 2007.

LOSEY, J. E.; RAYOR, L. S.; CARTER, M. E. Transgenic pollen harms monarch larvae. **Nature**, London, v. 399, p. 214, 1999.

MARCHETTI, E.; ACCINELLI, C.; TALAMÈ, V.; EPIFANI, R. Persistence of Cry toxin and cry genes from genetically modified plants in two agricultural soils. **Agronomy for Sustainable Development**, Versailles, v. 27, p. 231-236, 2007.

R Development Core Team (2007). R: A Language and Environment for Statistical Computing: Vienna, Austria. (<http://www.R-project.org>)

RONQUIM, C. C. **Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais**. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2010. 26 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 8).

SAMBROOK, J.; FRITSCH, T.; MANIATIS. **Molecular cloning: a Laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p. 1.25- 1.30.

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**, Amsterdam, v. 33, p. 35-39, 2000.

SAXENA, D.; FLORES, S.; STOTZKY, G. Insecticidal toxin in root exudates from *Bt* corn. **Nature**, London, v. 399, p. 214, 1999.

STOTZKY, G. Clays and humic acids affect the persistence and biological activity of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* in soil. **Developments in Soil Science**, Amsterdam, v. 28B, n. 2, p. 1-16, 2002.

STOTZKY, G. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 29, p. 691-705, 2000.

STOTZKY, G. Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, p. 77-89, 2004.

TABASHNIK, B. E.; LIU, Y-B.; FINSON, N.; MASSON, L.; HECKEL, D. G.; One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 94, p. 1640-1644, 1997.

TAPP, H.; STOTZKY, G. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* from soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 4. p. 472-476, 1998.

Van RIE, J.; JANSSENS, S.; HOFTE, H.; DEGHEELE, D.; MALLAERT, H. V. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 186, p. 239-247, 1989.

VIKTOROV, A. G. Influence of Bt plants on soil and pleiotropic effect of α -Endotoxin-Encoding genes. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 55, n.6, p. 823-833, 2008.

WIDMER, F.; SEIDLER, R. J.; DONEGAN, K. K.; REED, G. L. Quantification of transgenic plant marker gene persistence in the field. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, p. 1-7, 1997.

WIDMER, F.; SEIDLER, R. J.; WATRUD, L. S. Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 5, p. 603- 613, 1996.

3 AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA E DA ABUNDÂNCIA DA COMUNIDADE MICROBIANA EM SOLOS AGRÍCOLAS SOB CULTIVO DE MILHO TRANSGÊNICO

Resumo

O cultivo do milho Bt resistente a insetos-pragas aumentou consideravelmente no Brasil desde a sua liberação em 2007, e tem levantado questões sobre os possíveis efeitos aos microrganismos do solo, os quais podem entrar em contato direto com os produtos derivados do processo de transgenia, seja pela liberação dos exsudatos das raízes de plantas ou pela decomposição dos resíduos culturais que permanecem no campo após a colheita. O DNA transgênico liberado no ambiente pode ser adsorvido as partículas ativas da superfície do solo, ser degradado pelas enzimas microbianas e ou incorporado ao genoma de bactérias que apresentam competência natural para adquiri-lo. Por outro lado, alterações na composição dos exsudatos das raízes das plantas GM e as mudanças decorridas em função das práticas de manejo, podem resultar em alterações na composição funcional e estrutural da comunidade microbiana. Os objetivos desse estudo foram avaliar a abundância do número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobria* e *Archaea* e 18S rRNA de Fungo em diferentes tipos de solo e temperaturas, em condições de microcosmos, com e sem adição de DNA genômico do milho Bt MON810, e em condições de campo; e avaliar a estrutura da comunidade microbiana em áreas agrícolas de cultivo de milho Bt. Os ensaios em microcosmos foram conduzidos com a incubação de solos arenoso e argiloso adicionados de DNA do milho Bt MON810 em água destilada ultrapura, incubados por 291 dias em 15 e 25°C. Em campo, os solos foram amostrados em três áreas agrícolas na cidade de Fátima do Sul, MS. A partir das amostras de DNA, foi determinada a abundância (qPCR) dos genes 16S rRNA de *Bacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobria* e *Archaea* e 18S rRNA de Fungo e avaliada a estrutura da comunidade bacteriana (T-RLFP), nas mesmas condições. Os resultados revelaram que o número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* aumentou com adição de DNA genômico do milho Bt MON810 nos solos de microcosmos, no entanto, uma redução do número de cópias foi verificada para *Archaea*, *Verrucomicrobria* e Fungo. Para *Firmicutes* os resultados da abundância não foram consistentes. As temperaturas utilizadas não resultaram em efeito quanto à abundância do número de cópias dos genes, enquanto o tipo de solo teve efeito para *Archaea* e *Verrucomicrobria*. Em áreas agrícolas com histórico de cinco anos de cultivo de milho transgênico observaram-se variações na estrutura da comunidade bacteriana, em nível de filo, e maior abundância de Fungos com aumento da quantidade de palhada no solo, enquanto em área com histórico de cultivo de um ano, observou-se uma redução da população de *Firmicutes* e *Verrucomicrobria*. Os maiores efeitos na comunidade microbiana foram verificados entre os anos de amostragem.

Palavras-chave: comunidade microbiana, milho transgênico, qPCR, T-RFLP

ASSESSMENT OF STRUCTURE AND ABUNDANCE OF MICROBIAL COMMUNITY IN AGRICULTURAL SOILS UNDER Bt CORN CROP

Abstract

The cultivation of the insect resistance Bt corn increased considerably in Brazil since its release in 2007, and this has raised questions about the possible effects on soil microorganisms, which may come into direct contact with transgenesis-derived products either by the release of plant exudates through the roots or by the decomposition of remaining crop residues in the field after harvest. The transgenic DNA released into the environment can be adsorbed to active particles from the soil surface, be degraded by microbial enzymes and or incorporated into the genome of bacteria that have natural power to acquire it. Moreover, changes in exudates composition of GM plants those caused by farming practices may result in structural and functional changes in the microbial community. The objectives of this study were to evaluate the abundance of the 16S rRNA copy number of *Bacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* and *Archaea* and 18S rRNA of *Fungi* in different soil types and temperatures in microcosm conditions, with and without addition of genomic DNA of Bt corn MON810, and under field conditions; and evaluate the structure of microbial communities in agricultural areas of Bt corn. Microcosm assays were conducted with sandy and clay soils added of Bt corn MON810 DNA mixed in ultrapure distilled water, incubated for 291 days at 15 and 25°C. At the field, soils were sampled from three agricultural areas in the city of Fátima do Sul, MS. From the DNA samples the abundance (qPCR) of the 16S rRNA of *Bacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* and *Archaea* and 18Sr RNA of *Fungi* was determined and the structure of bacterial communities (T-RFLP), under the same conditions was evaluated. The results revealed that the 16S rRNA copy number of *Bacteria* increased with the addition of genomic Bt corn DNA into the soil microcosms, however, a reduction in the copy number was checked for *Archaea*, *Verrucomicrobia* and *Fungi*. For *Firmicutes* the results of abundance were not consistent. The temperatures used did not result in effect regarding gene abundances in copy number, while the soil type effective for *Archaea* and *Verrucomicrobia*. In agricultural areas with a five years history of transgenic corn cultivation changes in the bacterial community structure, at phylum-level, as well as a greater abundance of *Fungi* with the increase in residue tillage on the ground was noted, while in the area with one year of cultivation, there was a reduction in the population of *Firmicutes* and *Verrucomicrobia*. The largest effects on the microbial community were observed between the years.

Keywords: microbial community, transgenic corn, qPCR, T-RFLP

3.1 Introdução

As culturas geneticamente modificadas para a resistência a insetos-praga representam uma ferramenta ambientalmente segura para reduzir a quantidade de pesticidas utilizados na agricultura. Para tanto, questões sobre os riscos destas culturas ao meio ambiente são constantes, principalmente em relação aos potenciais efeitos sobre os organismos não alvos, tais como os microrganismos, os quais desempenham papel fundamental na degradação dos resíduos das culturas e nos ciclos biogeoquímicos (CASTALDINI et al., 2005).

Os microrganismos entram em contato direto com os genes e as toxinas das plantas transgênicas quando são liberados no solo pelos exsudatos das raízes ao longo do crescimento das plantas (SAXENA et al., 1999; SAXENA; STOTZKY, 2000), durante a incorporação dos restos culturais, após a colheita (TAPP; STOTZKY, 1998; STOTZKY, 2000; 2002) e por deposição de pólen durante o pendoamento do milho (LOSEY et al., 1999).

As toxinas que não são adsorvidas permanecem livres na solução do solo e, conseqüentemente, podem ter efeito na atividade metabólica da população microbiana (TURRINI et al., 2004; CASTALDINI et al., 2005). Alguns estudos relatam que presença das toxinas de *B. thuringiensis* modifica a composição dos exsudatos das raízes das plantas e adicionalmente pode exercer efeito sobre espécies de microrganismos não alvos no solo (ICOZ; STOTZKY, 2008; LIU et al., 2005; SAXENA; STOTZKY et al., 2000).

Outro fator importante a ser considerado é que com o cultivo em larga escala das plantas transgênicas, aumenta-se a liberação de DNA extracelular no solo, e alguns estudos tem mostrado que células bacterianas competentes naturalmente podem assimilar o DNA exógeno contendo genes de resistência a antibióticos e genes de *B. thuringiensis*, transportados por plantas GM, e incorporar o DNA ao seu genoma via recombinação homóloga (de VRIES et al., 2001), desta forma, torna-se necessário o monitoramento dos níveis populacionais de bactérias durante a experimentação de campo como também ao longo de alguns ciclos da cultura (; STOTZKY et al., 2000).

Diferentes parâmetros e técnicas têm indicado que as plantas transgênicas podem promover mudanças na comunidade microbiana, e essas mudanças são transientes (BLACKWOOD; BUYER, 2004; BRUSETTI et al., 2004; ICOZ et al., 2008). Por outro lado, muitos estudos consideram que essas plantas não têm efeitos prejudiciais sobre os organismos não alvos (SAXENA; STOTZKY, 2001; WU et al., 2004).

Embora haja divergências na literatura sobre os efeitos das plantas transgênicas sobre a comunidade microbiana, deve-se considerar que o impacto dessas plantas pode variar com o evento de transformação genética e/ou com as variações ambientais, bem como com a atividade dos microrganismos, o tipo de solo e as práticas culturais (YANG et al., 2013). Assim quaisquer alterações, ainda que pequenas, na comunidade microbiana do solo devem ser consideradas (TAN et al., 2010).

No Brasil, as áreas de cultivo de organismos geneticamente modificados associadas ao sistema de plantio direto têm aumentado consideravelmente, e com o aumento dos resíduos culturais, existe uma preocupação em relação aos possíveis efeitos dos produtos derivados das plantas transgênicas sobre a comunidade microbiana. Considerando os diferentes tipos de solos e temperaturas que o país apresenta, foram avaliadas alterações na comunidade microbiana em relação à presença do DNA transgênico no solo, em condições controladas; e em áreas agrícolas manejadas com plantio direto. Foram estudados os Domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi*.

3.2 Objetivos

- a) Determinar a abundância de cópias dos genes 16S rRNA de *Bacteria*, *Archaea*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* e 18S rRNA de Fungos:
 - em solos brasileiros, sem histórico de cultivo de transgênico, mais especificamente, em solos arenoso e argiloso, que permaneceram incubados em temperaturas de 15 e 25°C, com e sem (controle) adição de DNA do milho Bt (evento MON810);
 - em solos de áreas agrícolas, manejadas com milho transgênico no Mato Grosso de Sul
- b) Avaliar a estrutura da comunidade microbiana presente nos solos das áreas agrícolas do Mato Grosso do Sul.

3.3 Material e métodos

3.3.1. Quantificação dos genes 16S rRNA de *Bacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* e *Archaea* e 18S rRNA de Fungo em solos mantidos em microcosmos e em condições de campo

O experimento de microcosmos foi conduzido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, de acordo com o

procedimento descrito no item 2.3.1 do capítulo 2. O material para estudo em campo foi coletado na cidade de Fátima do Sul, Mato Grosso do Sul, em três áreas agrícolas (A₁, A₂ e A₃), de acordo com os procedimentos descritos no item 2.3.6 do capítulo 2.

3.3.1.1 Extração de DNA total do solo

A extração de DNA total das amostras de solo foi realizada usando o *Kit Power Soillyzer DNA ExtractionTM* (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e quantidade aproximada de DNA foram conferidas em gel de agarose 1% (SAMBROOK et al., 1989). Para retirar as impurezas (DNA puro tem uma razão $A_{260}/A_{280}=1,7-2,2$), as amostras de DNA foram purificadas pelo kit comercial UltraCleanSoil até uma pureza satisfatória ser obtida, e armazenadas a -20 °C até o momento de uso.

3.3.1.2 Detecção e quantificação dos genes 16S rRNA e 18S rRNA por PCR quantitativo

Todos os genes estudados foram quantificados pela técnica de PCR quantitativo em tempo real utilizando o termociclador StepOnePlusTM (Applied Biosystems, Foster City, USA). As condições utilizadas estão nos respectivos trabalhos de referência apresentados na Tabela 3.1. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em volume de 10 µL, contendo 5 µL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Fermentas), 1,0 µM de cada iniciador (Tabela 3.1), 1 µL da amostra de DNA, completando o restante com água ultrapura (Milli-Q) esterilizada. As amplificações foram realizadas de acordo com os dados apresentados na Tabela 3.1.

As curvas padrões foram obtidas, realizando amplificações com o número de cópias do DNA padrão diluído em série (1:10) nos intervalos de 10^8 a 10^4 genes/µL para *Bacteria*, 10^7 a 10^3 genes/µL para *Firmicutes* e *Verrucomicrobia*, 10^6 a 10^2 genes/µL para *Archaea* e 10^8 a 10^4 genes/µL para Fungo.

Os dados do qPCR foram obtidos pelo StepOne Software 2.2.2 (Applied Biosystems), deste foram exportados para o programa Excel (Microsoft) onde foram calculados as quantidades de cópias do gene para cada grama de solo. A partir desses dados foram realizadas as análises estatísticas utilizando o pacote 'agricolae' no R. Os dados foram submetidos à ANOVA e suas médias constatadas pelo teste de Tukey $p<0,05$.

Tabela 3.1 - *Iniciadores* utilizados para a amplificação dos genes 16S rRNA de *Bacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Archaea* e 18S rRNA de Fungo

Gene alvo	Nome Iniciador	Sequência (5'- 3')	Tamanho fragmento (pb)	Referência	Condições de amplificação
16S <i>Bacteria</i>	U968f 1387r	GCA ACG AGA ACC TTA CGGTGTGTACAAGGCCCGGGA ACG	419	Heuer et al. (1997)	95°C - 10 min; 40 ciclos, 94°C – 15 s, 56°C - 30 s e 72 °C - 45 s
16S <i>Archaea</i>	ARC787f ARC1059r	ATTAGATACCCSBGTAGTCC GCCATGCACCWCCTC T	273	Yu et al. (2005)	95°C - 10 min; 40 ciclos, 95°C - 15 s, 57°C - 20 s e 72°C - 30 s.
16S <i>Firmicutes</i>	Lac353 firmicutes Eub518r	GCAGTAGGGAATCTT CCG ATTACCGCGGCTGCTGG	165	Fierer et al. (2006)	95°C - 10 min; 35 ciclos, 94°C - 30 s, 60°C - 30 s e 72°C - 40 s.
16S <i>Verrucomicrobia</i>	Ver53 Eub518	TGGCGGCGTGGWTAAGA ATTACCGCGGCTGCTGG	465	Stevenson et al. (2004) Muyzer; De Wall; Uitterlinden (1993)	95°C - 15 min; 40 ciclos, 95 °C – 1 min, 60°C - 30 s e 72°C – 1 min e 72° C – 10 min
18S <i>Fungo</i>	EF4f FUNG5r	GGAAGGG[G/A]TGTATTTATTAG GTA AAA GTC CTG GTT CCC	530	Van Elsas et al. (2000)	95°C - 5 min; 40 ciclos, 95 °C – 15 s, 51°C - 30 s e 72°C – 1 min e 72° C – 1 min

3.3.2 Avaliação da estrutura da comunidade de *Bacteria* nos solos

3.3.2.1 Amplificação do gene 16S rRNA de *Bacteria*

A reação de amplificação do gene 16S de *Bacteria* foi realizada com o conjunto de *iniciadores* 27f (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492r (5'ACCTTGTTACTT 3') (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). A extremidade 5' do *iniciador* 27f foi marcada com 6-carboxyfluorescein (FAM) para a detecção de fluorescência na análise de T-RFLP.

A amplificação foi realizada em triplicata em solução contendo 5 µl de tampão de PCR 10X; 2 µl de MgCl₂ 50 mM; 1 µl de dNTPs 10 mM; 0,5 µl de BSA; 0,3 µl de Platinum[®] Taq Polimerase 5 U (Invitrogen); 2 µl de cada *iniciador* a 5 pmol; 1 µl da amostra de DNA total do solo e água ultrapura (Milli-Q), esterilizada para volume final de 25 µl.

O termociclador (GeneAMP PCR System 9700 – Applied Biosystems) foi utilizado para a reação de amplificação, as condições foram: 94°C por 3 min para desnaturação inicial, seguida por 35 ciclos com desnaturação de 94°C por 30 s, anelamento dos *iniciadores* a 59°C por 45 s, extensão a 72°C por 1 min e extensão final de 72°C por 15 min. Uma alíquota de 5 µl do produto amplificado foi verificado em gel de agarose 1% (p/v) corado com GelRed[™] (Uniscience) em tampão SB (BRODY; KERN, 2004). Como padrão molecular utilizou-se 2 µl de *Low mass* DNA Ladder[™] (Invitrogen Technologies). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min.

3.3.2.2 Purificação dos produtos de PCR

Para a purificação dos fragmentos amplificados a serem analisados pela técnica T-RFLP, utilizou-se o kit *GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), e seguiu-se o protocolo de acordo com as instruções do fabricante. Uma alíquota de 5 µl do DNA purificado foi analisado em gel de agarose 1% (p/v) em tampão SB (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrão molecular 2 µl de *Low mass* DNA Ladder[™] (Invitrogen Technologies). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 minutos.

3.3.2.3 Reação de Restrição dos Produtos de PCR para análise de T-RFLP

Os produtos de PCR de *Bacteria* purificados foram utilizados nas reações de restrição com as endonucleases HhaI (GCG[^]C) e MspI (C[^]CGG), por apresentarem os melhores resultados para distinguir comunidades microbianas (MARSH et al., 2000).

As reações foram preparadas utilizando 1,5 µl do Buffer React 10X; 0,15 µl de BSA 1 ng.µl⁻¹; 0,06 µl da endonuclease 10U (Invitrogen); 5 µl do produto purificado e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para um produto final de 15 µl. As reações de restrição foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 37°C por 3 h e 68°C por 10 min para a inativação da endonuclease.

3.3.2.4 Precipitação dos Produtos da Restrição

Após a reação de restrição, os produtos digeridos foram precipitados para a análise de fragmento no sequenciador automático. Para a precipitação, 2 µl de tampão de Acetato de Sódio/EDTA e 60 µl de etanol absoluto foram adicionados em 15 µl do produto da digestão. A mistura foi agitada levemente no vortex e centrifugada a 12.000 × g por 15 minutos, descartando-se o sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 150 µl de etanol 70%, recém preparado e centrifugou-se a 12.000 × g por 5 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi seco em concentrador (Concentrador 5301, Eppendorf) a 45°C por aproximadamente 10 minutos. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até posterior utilização.

3.3.2.5 Análise do Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP)

A determinação do comprimento dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFs) foi realizada no sequenciador capilar automático modelo ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para a análise dos fragmentos no sequenciador, o produto precipitado foi ressuscitado em mistura contendo 9,75 µl de Formamida HiDi e 0,25 µl de padrão de comprimento GeneScanTM – 500 ROXTM Size Standard (Applied Biosystems). Antes do carregamento as amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 min e resfriadas a 0°C por 4 min.

Os dados de T-RFLP gerados pelo sequenciador foram analisados com o programa GeneMapper v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) para verificar a qualidade das corridas. Após a verificação, os dados foram então exportados em uma matriz para o programa Excel (Microsoft) onde foram organizados para a análise multivariada. Para as amostras de *Bacteria*, utilizou-se uma linhade base limite de 50 unidades de fluorescência

para discriminar os “picos verdadeiros” dos ruídos provenientes da técnica, os T-RFs menores que 50 pb e maiores que 500 pb foram eliminados de todos os dados (CULMAN et al., 2008).

Os dados absolutos dos picos foram transformados em dados relativos com valores percentuais de detecção, dividindo cada valor de tamanho de pico pelo valor total dos picos de uma amostra. De acordo com Culman et al. (2008) cada altura de pico é transformado em dados de porcentagem em relação ao total de valores de altura de pico em uma amostra.

Posteriormente, a matriz dos dados foi transformada em uma matriz de distância, usando o índice de Hellinger (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001), recomendado para análises de T-RLFP.

3.3.2.6 Análise de dados

Os resultados das variáveis avaliadas foram submetidos à análise de variância ANOVA, utilizando modelo fatorial e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Além disso, realizou-se a análise de correlação de Pearson. A distribuição normal e homogeneidade da variância foram melhoradas pela transformação dos dados em Log_{10} para satisfazer as necessidades de homogeneidade e variância dos atributos quando necessário. As diferenças da abundância dos genes (Tabelas 3.2 e 3.3) entre os tratamentos foram processadas com auxílio da plataforma R usando os pacotes agricolae, ExpDes, MASS.

As unidades taxonômicas operacionais (UTOs) padronizadas foram transformadas $\log_{10}(x+1)$ (RAMETE et al., 2007). A variabilidade da estrutura das áreas agrícolas foi submetida à análise ANOSIM e análise de SIMPER, a qual foi conduzida usando distância Euclidiana para elucidar a similaridade entre as áreas. A MNDS foi realizada usando índice de distância de Bray-Curtis utilizando os dados ambientais para gerar o biplot (THEIS et al., 2012) o conjunto de análises multivariadas foram conduzidas usando o PAST (HAMMER et al., 2001).

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Quantificação dos genes 16S rRNA de *Bacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* e *Archaea* e 18S rRNA de Fungo em solos mantidos em microcosmos

A eficiência de amplificação das reações de qPCR para 16S rRNA de *Bacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* e *Archaea* e 18S rRNA de Fungo, variaram de 82,758 a 95,991%, as curvas-padrão apresentaram coeficientes de correlação (R^2) de 0,99, enquanto as curvas de *melting* referentes aos *amplicons* gerados com os iniciadores específicos apresentaram picos únicos, indicando a existência de um produto específico (Figura 3.1 e 3.2).

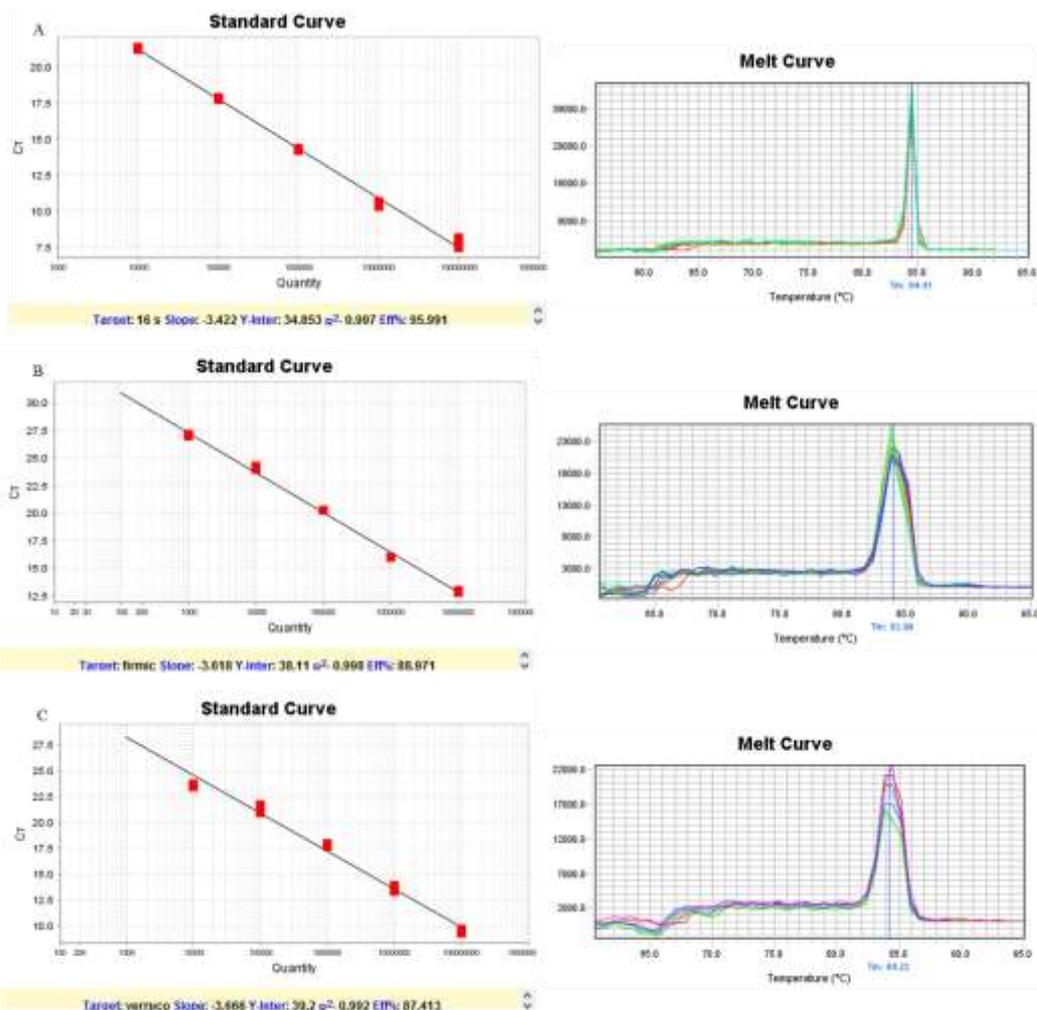


Figura 3.1 – Curvas padrão e de *Melting* dos *amplicons* gerados para 16S rRNA *Bacteria* (A), *Firmicutes* (B) e *Verrucomicrobia* (C)

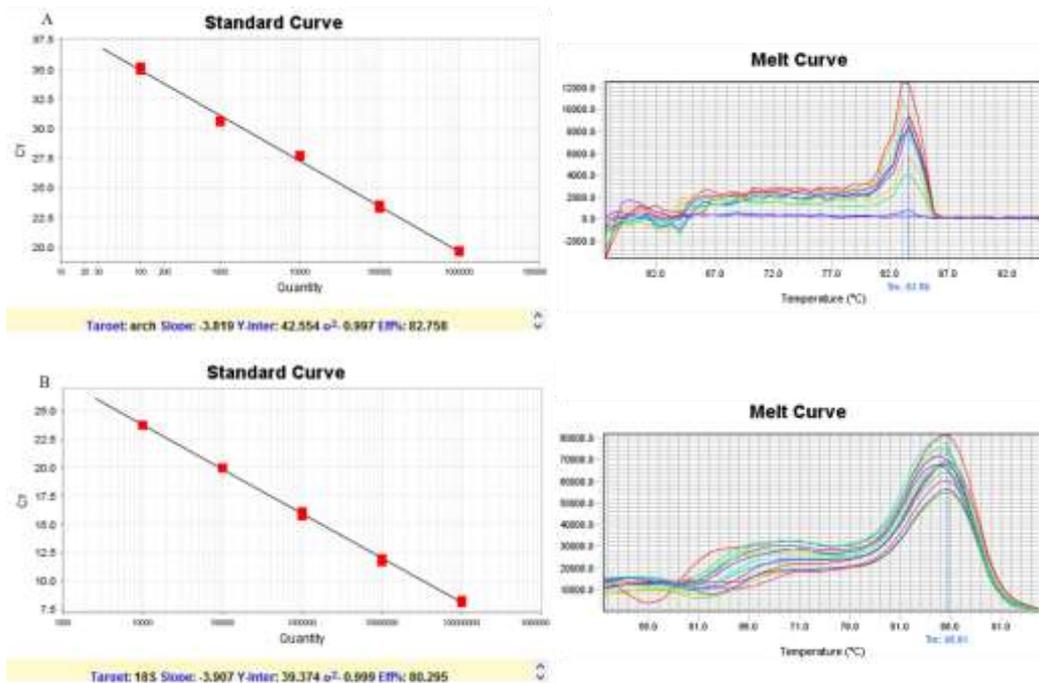


Figura 3.2 – Curvas padrão e de *Melting* dos *amplicons* gerados para 16S rRNA Archaea (A) e Fungo (B)

Quando a abundância dos genes 16S rRNA de *Bacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* e *Archaea* e de 18S de Fungo em solos com adição e sem (controle) de DNA genômico do milho Bt MON810 foi comparada, verificou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) para o fator tempo de incubação. O número de cópias do 16S rRNA de *Bacteria* foi maior ($p < 0,05$) nas amostras de solo arenoso com adição de DNA genômico nos tempos t_1 e t_{60} , e em solo argiloso nos tempos t_1 e t_{10} , quando comparado com as amostras de solo do controle (Figura 3.3).

Em solo arenoso com a adição de DNA, a quantificação do número de cópias foi menor ($p < 0,05$) para o gene 16S rRNA de *Archaea* nos tempos t_{60} , t_{180} e t_{291} , *Firmicutes* foi menor nos tempos t_0 , t_2 , t_{90} e t_{180} e em todos os tempos para *Verrucomicrobia*, exceto em t_{10} e t_{30} . O número de cópias do gene 18S rRNA de Fungo foi menor em t_2 , t_{10} , t_{30} e t_{60} (Figura 3.3 e 3.4).

Em solo argiloso com adição de DNA genômico, a quantificação do 16S rRNA foi menor ($p < 0,05$) nos tempos t_2 , t_{60} , t_{90} , t_{180} e t_{291} para *Archaea*, em todos os tempos para *Verrucomicrobia*, e em t_{10} e t_{90} para 18S rRNA de *Fungo*, que nas amostras sem DNA do milho Bt. Apenas para *Firmicutes* não houve diferenças na abundância de genes determinados no solo ($p > 0,05$) (Figura 3.3 e 3.4).

As temperaturas de 15 e 25°C usadas no estudo não apresentaram efeito significativo na quantificação de cópias de 16S rRNA de *Bacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* e *Archaea* 18S rRNA de *Fungo* nos solos estudados ($p > 0,05$).

Verificou-se maior abundância de cópias de 16S rRNA de *Archaea* em solo argiloso, que em arenoso ($p < 0,05$) e maior abundância de 16S rRNA de *Verrucomicrobia* em solo arenoso que em solo argiloso ($p < 0,05$). Entretanto, para os demais genes não foram encontradas diferenças significativas nos tipos de solos estudados ($p > 0,05$) (Tabela 3.2).

Com base nos resultados obtidos, observou-se que a presença de DNA genômico do milho Bt no solo resultou em efeito negativo, durante o tempo, no desenvolvimento da comunidade microbiana de *Firmicutes*, *Verrucomibria*, *Archaea* e *Fungo*, exceto em *Bacteria*. Entretanto, não foi possível elucidar como esse efeito ocorreu nos solos estudados, assim supõe-se que o DNA possa ter sido utilizado como fonte de nutrientes por um grupo de microrganismos, não os abordados nesse estudo, promovendo seu crescimento nos solos avaliados devido ao aumento de *Bacteria* total quando adicionado o DNA.

Recentes estudos na literatura reportaram que o DNA transgênico pode ser adsorvido às partículas ativas da superfície do solo e ou ser degradado pela ação de DNases microbianas, e após a degradação, a informação genética é perdida, mas seus componentes (C, N, O e P) podem persistir no solo e servir como fonte de nutriente para as plantas e para o crescimento de microrganismos (REDFIELD, 1993; FINKER; KOLTER, 2001; LEVY-BOTH et al., 2007).

Blum et al. (1997) observaram que o número de microrganismos viáveis aumentou após 12 h da adição de DNA no solo, e durante esse tempo, cerca de 68% da quantidade de DNA (50 µg) adicionado ao solo foram degradados.

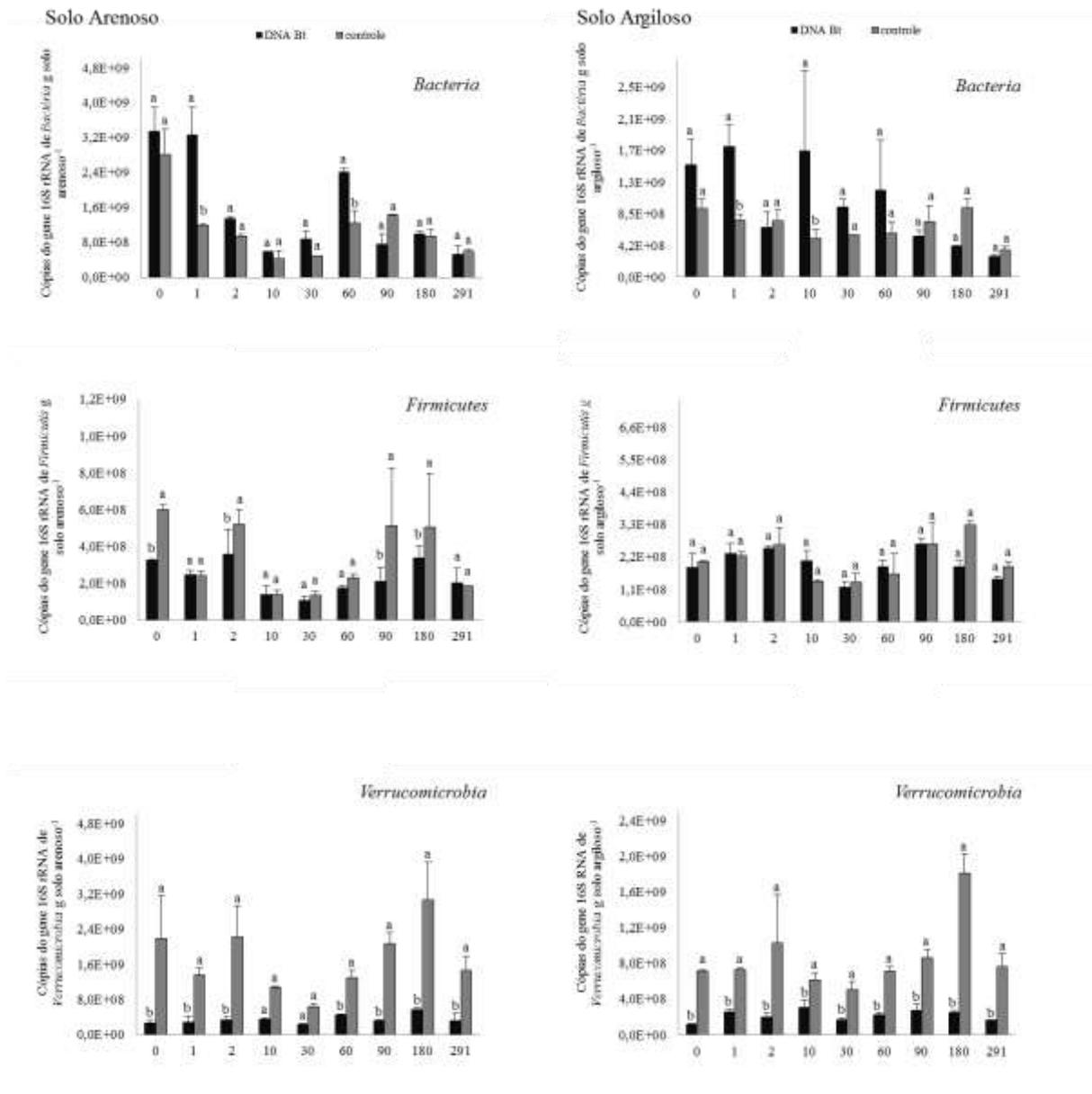


Figura 3.3 - Quantificação dos genes 16S rRNA de *Bacteria*, *Firmicutes* e *Verrucomicrobia* em solos arenoso e argiloso, mantidos em condições controladas, durante 291 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças por Tukey HSD ($p < 0,05$) entre amostras com DNA e controle

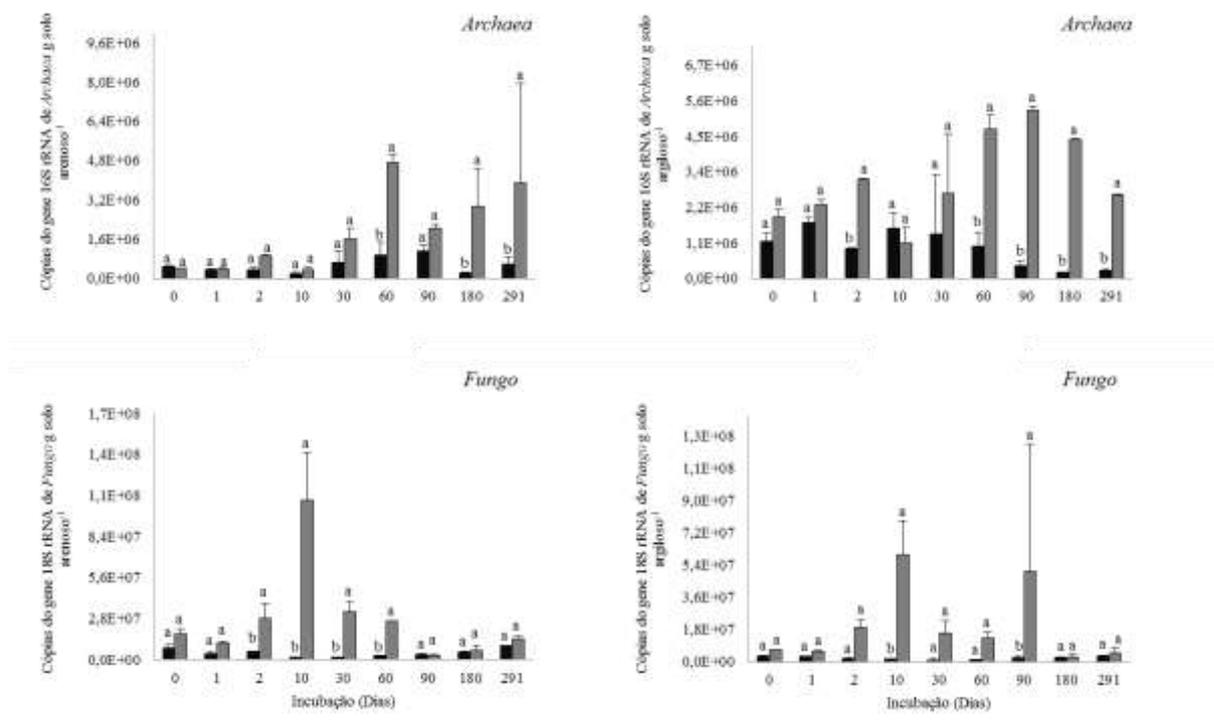


Figura 3.4 - Quantificação dos genes 16S rRNA de *Archaea* e 18S rRNA de Fungo em solos arenoso e argiloso, mantidos em condições controladas, durante 291 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças por Tukey HSD ($p < 0,05$) entre amostras com DNA e controle

Tabela 3.2 - Quantificação dos genes 16S rRNA de *Bacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* e *Archaea*, e de 18S rRNA de *Fungo* em solos arenoso e argiloso, mantidos em temperaturas de 15 e 25°C

Tipo de solo	Temperatura (°C)		16S rRNA				18S rRNA
			<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Verrucomicrobia</i> *	<i>Archaea</i> *	Fungo
Arenoso	15	Controle	$1,83 \times 10^9$	$3,25 \times 10^8$	$1,04 \times 10^9$	$1,81 \times 10^6$	$2,94 \times 10^7$
		DNA	$1,38 \times 10^9$	$2,36 \times 10^8$	$3,53 \times 10^8$	$3,93 \times 10^5$	$4,58 \times 10^6$
	25	Controle	$1,21 \times 10^9$	$3,59 \times 10^8$	$1,07 \times 10^9$	$2,06 \times 10^6$	$2,54 \times 10^7$
		DNA	$1,77 \times 10^9$	$2,30 \times 10^8$	$3,38 \times 10^8$	$7,02 \times 10^5$	$4,22 \times 10^6$
Argiloso	15	Controle	$6,88 \times 10^8$	$2,43 \times 10^8$	$2,61 \times 10^8$	$3,47 \times 10^6$	$3,13 \times 10^7$
		DNA	$9,11 \times 10^8$	$2,16 \times 10^8$	$2,26 \times 10^8$	$1,02 \times 10^6$	$2,46 \times 10^6$
	25	Controle	$7,18 \times 10^8$	$1,98 \times 10^8$	$1,37 \times 10^8$	$2,94 \times 10^6$	$7,61 \times 10^6$
		DNA	$1,07 \times 10^9$	$1,77 \times 10^8$	$2,04 \times 10^8$	$9,30 \times 10^5$	$1,90 \times 10^6$

* indica diferença por TukeyHSD ($p < 0,05$) entre o tipo de solo

3.4.2 Quantificação dos genes 16S rRNA de *Bacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* e *Archaea* e 18S rRNA de Fungo em solos de campo

A abundância do número de cópias das comunidades presentes em solos agrícolas foi determinada pela técnica de *qPCR* no início da pós-colheita de milho transgênico (2011) e 5

meses após esse período (2012), em três áreas com resíduos da cultura de milho parcialmente degradada.

A comparação de dados do número de cópias dos genes 16S rRNA de *Bacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomibria* e *Archaea*, e de 18S rRNA de Fungo, tanto em relação ao tempo (2011 e 2012), como entre as áreas mostrou-se variável.

Para o gene 16S rRNA de *Bacteria*, diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas apenas entre as áreas (Tabela 3.3). Entre os anos, a abundância de *Bacteria* nas três áreas agrícolas não foi significativamente diferente ($p > 0,05$) (Figura 3.5 A, B, C).

Quanto à abundância de cópias de *Archaea*, não foi influenciada pelas áreas em 2011. Já em 2012, *Archaea* apresentou maior ($p < 0,05$) número de cópias por grama de solo na área 2 (Tabela 3.3). Diferenças significativas foram observadas entre os anos, com incremento de cópias no ano de 2012 nas áreas 1 e 2 (Figura 3.5 A e B).

Han et al (2013), avaliaram os efeitos do cultivo de arroz transgênico em relação às emissões de metano e sobre a comunidade de arqueia metanogênica e metanotrófica e de bactéria. Os resultados revelaram que em áreas de cultivo de arroz transgênico houve uma redução na emissão de metano e na abundância e diversidade das comunidades de arqueia e bactéria.

Em 2011, não foram observadas diferenças significativas no número de cópias de *Firmicutes* entre as áreas. Já em 2012, *Firmicutes* resultou em maior ($p < 0,05$) incremento na área 1 (Tabela 3.3). Entre os anos de amostragem foi possível observar uma oscilação entre as áreas com maior número de cópias ($p < 0,05$) em 2012 na área 1, que na área 3 e sem efeito para área 2 (Figura 3.5 A, C e B), assim, supõe-se que o filo esteja relacionado com alterações do solo.

Dohrmann et al. (2013) observou que os Filos *Firmicutes* e *Verrucomicrobia* estão presentes na superfície radicular de milho Bt, e nenhuma alteração significativa foi verificada nesses filios. Em outro estudo, durante quatro anos de monitoramento dos efeitos do milho Bt na comunidade da rizosfera, não foram observados efeitos na comunidade de bactéria, entre os filios estudados estavam *Firmicutes* e *Verrucomicrobia* (Barriuso et al., 2012).

O gene 16S rRNA de *Verrucomicrobia* apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) apenas no tempo de amostragem, havendo uma redução significativa de cópias desse gene em todas as áreas em 2012 (Figura 3.5 A, B e C). Esse efeito pode estar associado ao sistema de manejo, em função das perturbações no ambiente promovidas para o plantio da cultura subsequente, a soja. Venturini (2014) verificou maior abundância de cópias de *Verrucomicrobia* em área nativa, em canavial sem queima e canavial com queima, nessa

ordem. Em outro estudo, Lauber et al. (2013) verificaram maior abundância desse filo em solos de pastagens, que em áreas agrícolas.

No presente estudo, a quantificação de 18S rRNA de *Fungo* nas áreas agrícolas resultou em maior número de cópias na área 2 (Tabela 3.3), sendo também influenciado pela época de amostragem, resultando em maior abundância nas áreas com mais tempo de cultivo de milho Bt em 2012, área 1 e 2 (Figura 3.5 A e B).

Saxena e Stotzky (2001a) avaliariam os efeitos da toxina Cry do milho Bt liberada pelos exsudatos das raízes e pela sua biomassa sobre os microrganismos do solo, e não foram observadas diferenças no número de bactérias e fungos do solo. Verbruggen et al. (2012), utilizando as técnicas de pirosequenciamento e T-RFLP não encontraram efeitos do milho Bt em fungo micorrízico arbuscular.

Tabela 3.3 - Quantificação dos genes 16S de *Bacteria*, *Firmicutes* e *Verrucomicrobia* e *Archaea* e de 18S de *Fungo* em solos de áreas agrícolas

Ano de Amostragem	Áreas agrícolas	16S rRNA				18S rRNA
		<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Archaea</i>	Fungo
2011	A ₁	8,83 × 10 ⁸ a	3,59 × 10 ⁸ a	1,11 × 10 ⁹ a	2,50 × 10 ⁵ a	5,61 × 10 ⁶ a
	A ₂	4,95 × 10 ⁸ b	2,95 × 10 ⁸ a	1,24 × 10 ⁹ a	5,27 × 10 ⁵ a	2,79 × 10 ⁶ a
	A ₃	5,64 × 10 ⁸ b	2,99 × 10 ⁸ a	1,83 × 10 ⁹ a	3,11 × 10 ⁵ a	2,29 × 10 ⁶ a
2012	A ₁	8,83 × 10 ⁸ a	5,49 × 10 ⁸ a	2,41 × 10 ⁸ a	3,50 × 10 ⁷ b	1,82 × 10 ⁷ b
	A ₂	8,85 × 10 ⁸ ab	3,23 × 10 ⁸ b	3,66 × 10 ⁸ a	5,49 × 10 ⁷ a	3,61 × 10 ⁷ a
	A ₃	2,07 × 10 ⁸ b	9,29 × 10 ⁷ c	8,19 × 10 ⁷ a	4,08 × 10 ⁶ c	6,23 × 10 ⁶ c

*Letras minúsculas indicam diferença por TukeyHSD (p<0.05) entre as áreas agrícolas

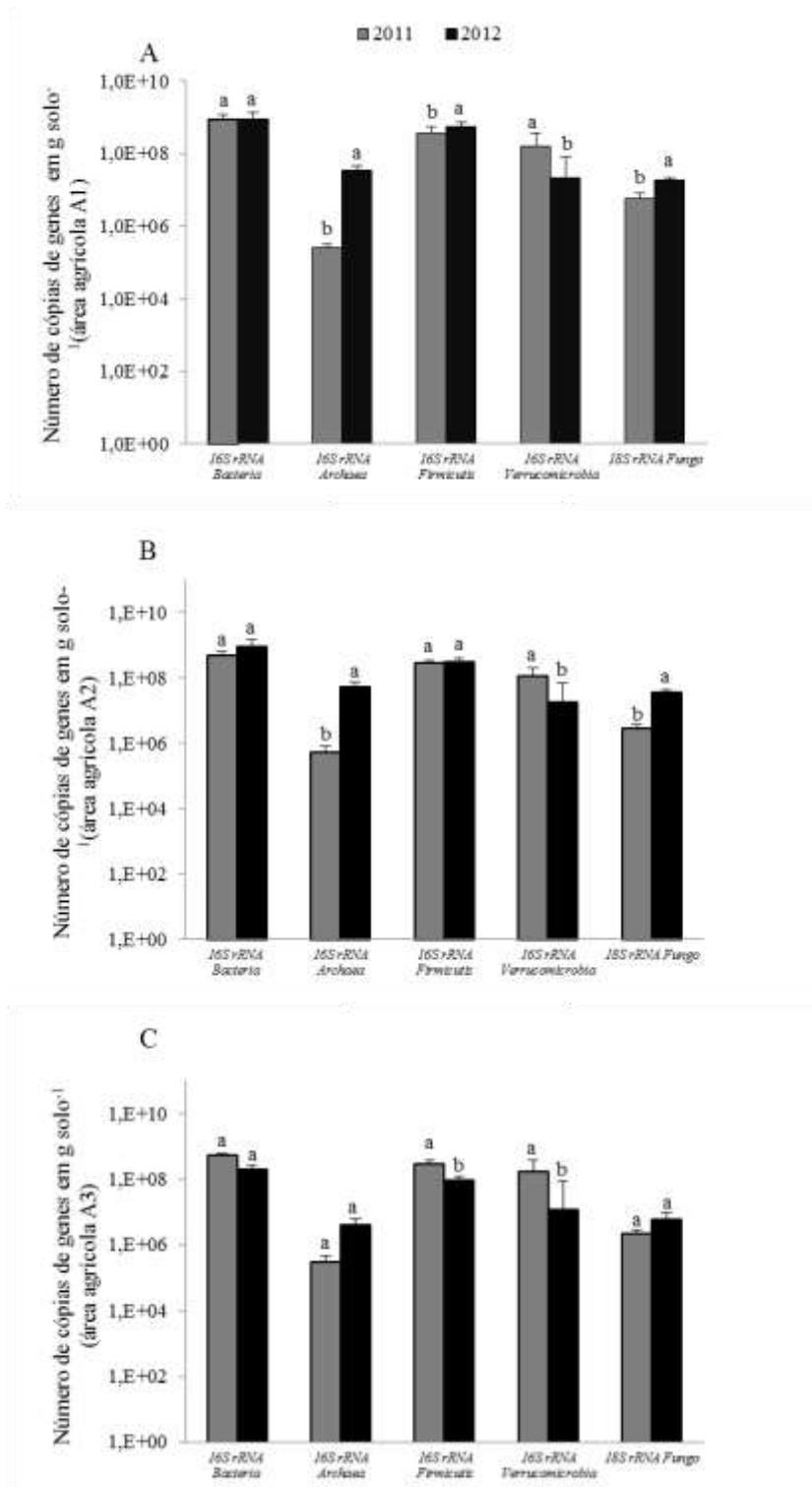


Figura 3.5 - Quantificação dos genes 16S rRNA de *Bacteria*, *Firmicutes* e *Verrucomicrobia* e de 18S rRNA de *Fungo* em solos nas áreas agrícolas A₁ (A), A₂ (B) e A₃ (C), no início da pós-colheita de milho transgênico (2011), e 5 meses após esse período (2012) (B). Letras minúsculas indica diferença por TukeyHSD ($p < 0.05$) entre os anos

3.4.3 T-RFLP das comunidades de *Bacteria*

Com base nos dados obtidos pela T-RFLP, as análises de similaridade ANOSIM e a porcentagem de dissimilaridade SIMPER, foram utilizadas para verificar as relações de diferenças na composição das comunidades entre as áreas agrícolas, em 2011 e 2012.

ANOSIM é uma análise estatística multivariada, baseada em permutação não paramétrica, análoga ao teste ANOVA (RAMETTE, 2007; McCUNE; GRACE, 2002). SIMPER é um teste estatístico que avalia a diferença entre grupos expressando os resultados em valores percentuais de similaridade (THEIS et al., 2012).

Nesse estudo, a análise de ANOSIM para enzima *HhaI* revelou diferenças significativas na comunidade bacteriana em 2011 e 2012, sendo que no ano de 2012 as áreas não foram influenciadas ($p < 0,05$), ou seja a similaridade entre as áreas somente aumentou no ano de 2012. No ano de 2012 as áreas 1 e 2, com histórico de cultivo de mais de cinco anos de milho transgênico, não apresentaram diferenças entre si, entretanto, não foram observadas diferenças na área 3 quando comparada com as demais áreas. Supõe-se que quando há diferenças sejam resultado do histórico de manejo do solo, passando de pastagem para cultivo agrícola, e não pela presença das plantas transgênicas (Tabela 3.4). Já os resultados com a enzima *MspI* levaram a menores valores de R para ANOSIM e sem efeito significativo, exceto A2 e A3 que parecem apresentar maior discrepância entre os resultados (Tabela 3.4).

Estes resultados podem ser confirmados pela análise de SIMPER para *HhaI*, apresentando maiores valores de porcentagem em 2011 e menores em 2012. Por outro lado o oposto foi observado com a *MspI* resultando em menores valores de porcentagem em 2011 e maiores valores de similaridade em 2012 (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Índices de similaridade ANOSIM e SIMPER obtidos usando a técnica de T-RFLP, considerando do Domínio Bacteria nas áreas agrícolas

Áreas	<i>Bacteria</i>				
	ANOSIM ^a		SIMPER ^b		
		<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>	<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>
2011	A ₁ vs A ₂	0,404	-0,600	63,66%	91,45%
	A ₁ vs A ₃	0,640*	0,144	97,22%	100%
	A ₂ vs A ₃	0,520*	0,284	95,68%	100%
2012	A ₁ vs A ₂	0,056	0,168	63,33%	100%
	A ₁ vs A ₃	0,076	0,092	67,54%	100%
	A ₂ vs A ₃	0,024	0,656*	72,86%	100%

^aANOSIM testa a diferença entre as amostras. Valores $> 0,75$ são estatisticamente diferentes; $> 0,5$ possuem sobreposição, mas ainda são claramente diferentes; e $< 0,5$ não apresentam diferença estatística.

* Indica diferenças ($p < 0,05$) entre as áreas estudadas para os R observados em ANOSIM.

^bSIMPER, quanto maior a porcentagem maior a dissimilaridade entre as amostras.

A riqueza resultou em efeitos significativos com a enzima *HhaI* somente em 2011 para áreas 1 e 2. Já a *MspI* mostrou similares riquezas entre as áreas estudadas em ambos os anos de estudo. O índice de Shannon resultou nas mesmas tendências da riqueza os maiores ($p < 0,05$) foram observados nas áreas 1 e 2 com a *HhaI* em 2011. Já a *MspI* resultou em similares resultados em ambos os anos (Tabela 3.5).

Também foi calculado o índice de Pielou (J') (PIELOU, 2000) para verificar a equitabilidade das amostras, o qual indica o padrão de distribuição dos indivíduos de cada uma das espécies presentes em uma comunidade em relação ao total de indivíduos desta mesma comunidade de modo que se verifica uma uniformidade de distribuição das mesmas nas áreas estudadas (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Riqueza de UTOs e índices de diversidade derivados de análise do gene 16S rRNA *Bacteria* em três fazendas no Mato Grosso do Sul

Área	Enzima	Riqueza		Shannon		Piellou	
		2011	2012	2011	2012	2011	2012
<i>HhaI</i>							
A ₁		50,8 ±3,90a	21,8 ±3,67a	3,89 ±0,03a	3,01 ±0,18a	0,98 ±0,002ab	0,99 ±0,001a
A ₂		55,6 ±1,02a	24,0 ±2,38a	3,99 ±0,01a	3,14 ±0,10a	0,98 ±0,001b	0,98 ±0,003a
A ₃		30,2 ±6,06b	18,4 ±3,44a	3,31 ±0,19b	2,82 ±0,19a	0,98 ±0,001a	0,98 ±0,005a
<i>MspI</i>							
A ₁		23,4 ±5,57a	29,8 ±9,44a	2,97 ±0,32a	3,08 ±0,42a	0,99 ±0,001a	0,99 ±0,002a
A ₂		34,4 ±3,86a	15,8 ±3,13a	3,55 ±0,11a	2,68 ±0,18a	0,99 ±0,001a	0,99 ±0,001a
A ₃		23,2 ±8,69a	38,2 ±5,06a	2,82 ±0,39a	3,59 ±0,14a	0,99 ±0,004a	0,99 ±0,001a

*Letras diferentes entre as áreas indicam diferença por TukeyHSD ($p < 0,05$) entre as áreas

Os dados de T-RFLP e dados ambientais foram ordenados utilizando a análise de NMDS (*Non-Metric Multidimensional Scaling*). As ordenações espaciais definidas para a comunidade microbiana são apresentadas na Figura 3.6

Em 2011 com a enzima *HhaI*, a análise de NMDS dos perfis de T-RFLP mostrou que comunidades de *Bacteria* apresentam mesmo padrão de ordenação. Há uma maior relação do fragmento *hsp70-cryIAb* com os atributos químicos, matéria orgânica (MO) e magnésio (Mg), na área 1 e 3. O fragmento 35S-*hps70* mostrou-se relacionado com a área A₂, a qual apresentou maior relação com fósforo (P) (Figura 3.6). Por outro lado, os perfis de restrição revelados pela enzima *MspI* não revelaram relações diretas com as áreas estudadas ($p > 0,05$) como expresso pela análise de ANOSIM (Figura 3.6).

Em 2012, a análise de NMDS dos perfis de T-RLFP com a enzima *HhaI* não resultou em significativos efeitos para explorar os atributos ordenados com as áreas. As áreas apresentaram similaridade com a enzima *MspI*. Essa relação pode ter ocorrido em função dos resíduos culturais, onde há um incremento de fertilizantes no solo. Contudo, em solos tropicais, foi relatado que a comunidade microbiana apresentou uma alta relação com os atributos químicos do solo, em profundidade de até 20 cm (FIERER; JACKSON, 2006; CANNAVAN, 2007; JESUS et al., 2009).

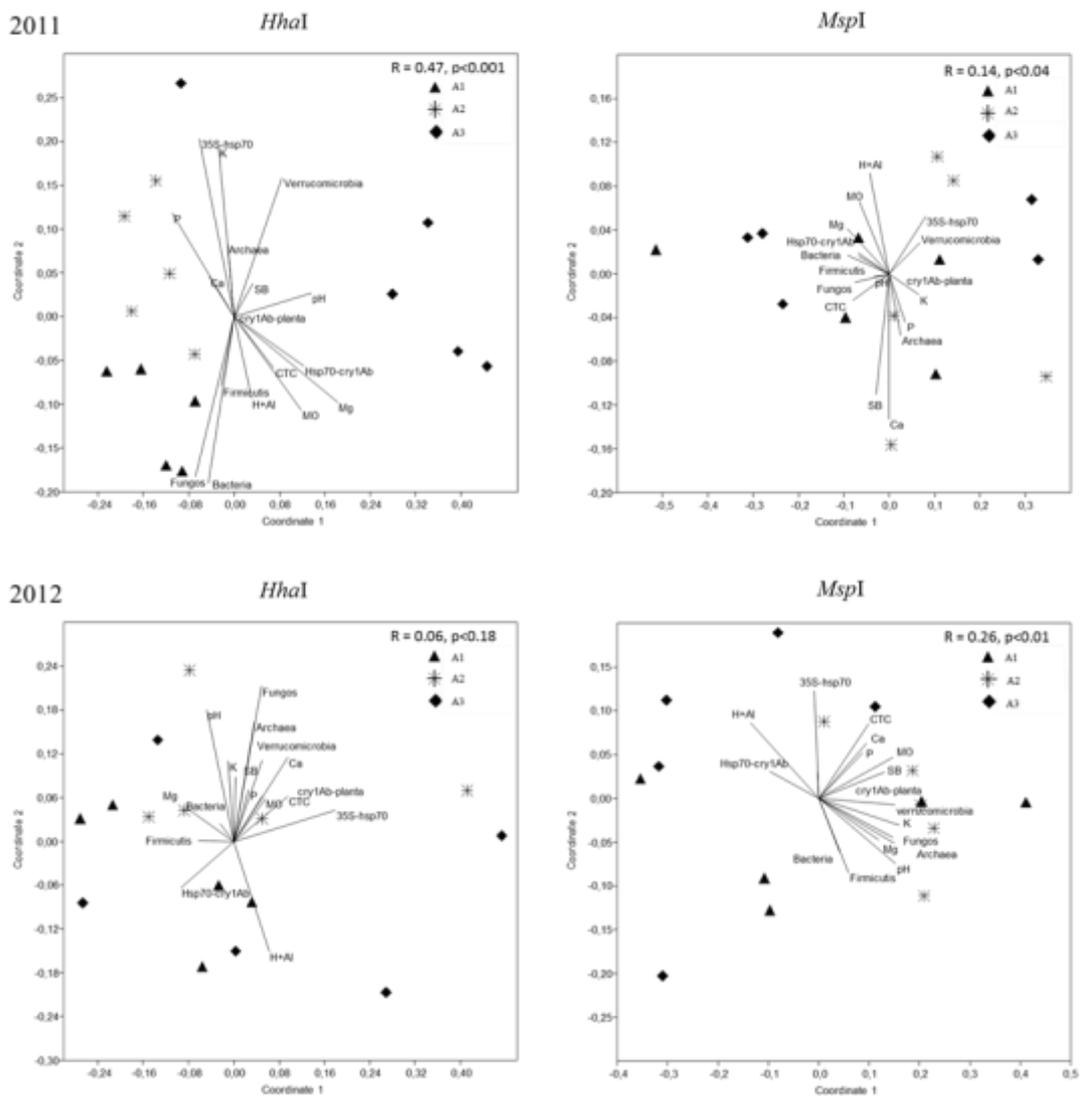


Figura 3.6. - *Non-Metric Multidimensional Scaling* das estruturas da comunidade de *Bacteria* determinadas por T-RLFP com as enzimas *HhaI* e *MspI*, nas áreas agrícolas (A₁, A₂ e A₃) estudadas em 2011 e 2012

Os resultados da análise NMDS indicaram que a comunidade microbiana pode estar relacionada com os atributos químicos do solo, devido a recentes manejos (fertilização, excesso de palha sobre o solo servindo como material orgânico) que podem ter proporcionado menores diferenças entre as áreas de estudo. Nas áreas agrícolas estudadas, a persistência dos fragmentos 35S-hsp70, hsp70-*cryIAb* e *cryIAb*-planta do milho transgênico não teve efeito na comunidade bacteriana do solo.

Becker et al. (2014), verificaram, pela técnica de T-RFLP, que híbridos do milho Bt não causaram impacto na estrutura da comunidade bacteriana e de fungos, após a colheita do milho.

Alguns estudos têm mostrado que a estrutura da comunidade microbiana foi menos afetada pelas plantas transgênicas e suas proteínas quando comparadas com os fatores ambientais, idade da planta e características do local de cultivo (BAUMGARTE; TEBBE, 2005; TAN et al., 2010).

Hu et al. (2009) avaliaram o impacto de cinco anos de cultivo do algodão Bt na população bacteriana da rizosfera do solo, em condições de campo. Os resultados obtidos não mostraram diferenças no número de grupos bacterianos na rizosfera do solo de plantas de algodão Bt e não Bt, em campo, e o cultivo de algodão transgênico não teve influência na população bacteriana da rizosfera do solo.

Icoz et al. (2008) verificaram que após quatro anos de cultivo de milho, não foram observadas diferenças significativas nos diferentes grupos de microrganismos, na atividades das enzimas e no pH dos solos em áreas com milho Bt e não Bt. Similarmente, Saxena e Stotzky (2001) não observaram efeitos em bactérias, fungos, protozoa, nematóides e em minhocas presentes na rizosfera do solo de milho Bt e não Bt.

3.5 Conclusões

Em condições de microcosmos, o número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* aumentou com adição de DNA genômico do milho Bt evento MON810. Entretanto, o número de cópias dos genes ribossomais de *Verrucomicrobia*, *Archaea* e Fungo reduziu quando o DNA genômico do milho Bt (evento MON810) foi incorporado ao solo. Por outro lado, a abundância do número de cópias do gene 16S rRNA de *Firmicutes* não apresentou resultados consistentes com a adição de DNA genômico. As temperaturas utilizadas no estudo não resultaram em efeito quanto à abundância do número de cópias dos genes. Os solos tiveram efeito apenas nos filós *Archaea* e *Verrucomicrobia*.

Em sistema de plantio direto, áreas agrícolas com histórico de mais de cinco anos de cultivo de milho transgênico apresentaram variações na comunidade bacteriana, em nível de filo, e maior abundância de Fungos com aumento da quantidade de palhada no solo. Entretanto, em área com histórico de cultivo de um ano, observou-se uma redução da população de *Firmicutes* e *Verrucomicrobia* com aumento da palhada no solo. Os maiores efeitos na estrutura da comunidade microbiana foram verificados entre os anos de amostragem.

Referências

- AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 59, p. 143-169, 1995.
- 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.
- BLUM, S. A. E.; LORENZ, M. G.; WACKERNAGEL, W. Mechanisms of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soil. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 20, p. 513-521, 1997.
- BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: Atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, Natck, v. 36, n. 2, p. 214-216, 2004.
- BRUSETTI, L.; FRANCIA, P.; BERTOLINI, C.; PAGLIUCA, A.; BORIN, S. Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic counterpart. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, p. 11-21, 2004.
- CANNAVAN, F. S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de terra preta antropogênica da Amazônia Central e Oriental**. 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- 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 microcosmo. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, p. 6719-6729, 2005.

CULMAN, S. W.; GAUCH, H. G.; BLACKWOOD, C. B.; THIES, J. E. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: A comparative study. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, p. 55-63, 2008.

De VRIES, J.; MEIER, P.; WACKERNAGEL, W. The natural transformation of the bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 195, p. 211-215, 2001.

DOHRMANN, M.; KUTING, M.; JUNEMNN, S.; JAENICKE, S.; SCHLUTER, A.; TEBBE, C. C. Importance of rare taxa for bacterial diversity in the rhizosphere of Bt and conventional maize. **The ISME Journal**, London, v. 7, p. 37-49, 2013.

FIERER, N.; JACKSON, J. A.; VILGALYS, R.; JACKSON, R. B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, p. 4117-4120, 2005.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 103, n. 3, p. 626-, 2006.

FINKEL, S. E.; KOLTER, R. DNA as nutrient: novel roll for bacterial competence gene homologs. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 183, p. 6288-6293, 2001.

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

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLILNGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gelelectrophoresis separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

ICOZ, I.; STOTZKY, G. Fate and effects of insect-resistance Bt crops in soil ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 559-586, 2008.

JESUS, E. C.; MARSH, T. L.; TIEDJE, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Changes in land use alter structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME Journal**, London, v. 3, p. 1004-1011, 2009.

LAUBER, C. L.; RAMIREZ, K. S.; AANDERUD, Z.; LENNON, J.; FIERER, N. Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. **The ISME Journal**, London, v. 7, n. 8, p. 1641-1650, 2013.

LEGENDRE, P.; GALLAGHER, E.D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. **Oecologia**, Berlin, v. 129, p. 271-280, 2001.

LEVY-BOOTH, D. J.; CAMPBELL, R. G.; GULDEN, R. H.; HART, M. M.; POWELL, J. R.; KLIRONOMOS, J. N.; PAULS, K. P.; SWANTON, C. J.; TREVORS, J. T.; DUNFIELD, K. E. Cycling of extracellular DNA in the soil environment. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 2977-2991, 2007.

LIU, X. X.; ZHANG, Q. W.; ZHAO, J. Z.; LI, J. C.; XU, B. L.; MA, X. M. Effects of *Bt* transgenic cotton lines on the cotton bollworm parasitoid *Microplitis mediator* in the laboratory. **Biological Control**, Orlando, v. 35, p. 134-141, 2005.

LOSEY, J. E.; RAYOR, L. S.; CARTER, M. E. Transgenic pollen harms monarch larvae. **Nature**, London, v. 399, p. 214, 1999.

MARSH, T. L.; SAXMAN, P.; COLE, J.; TIEDJE, J. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, p. 3616-3620, 2000.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 59, v. 3, p. 695-700, 1993.

PIELOU, E. C. **The interpretation of ecological data** – a primer on classification and ordination. New York: John Wiley & Sons, 2000. 263 p.

R Development Core Team (2007). R: A Language and Environment for Statistical Computing: Vienna, Austria. (<http://www.R-project.org>)

RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 62, n. 2, p. 142-160, 2007.

REDFIELD, R. J. Genes for breakfast: the have-your-cake-and-eat-it-too of bacterial transformation. **Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 84, p. 400-404, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

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**, Amsterdam, v. 33, p. 35-39, 2000.

SAXENA, D.; FLORES, S.; STOTZKY, G. Insecticidal toxin in root exudates from *Bt* corn. **Nature**, London, v. 399, p. 214, 1999.

SAXENA, D.; STOTZKY, G. *Bacillus thuringiensis* 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, 2001a.

SAXENA, D.; STOTZKY, G. *Bt* corn has a higher lignin content than non-*Bt* corn. **American Journal of Botany**, New York, v. 88, p. 1704-1706, 2001.

STEVENSON, B. S.; EICHORST, S. A.; WERTZ, J. T.; SCHMIDT, T. M.; BREZNAK, J. A. New strategies for the cultivation and detection of previously uncultured microbes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n. 8, p. 4748-4755, 2004.

STOTZKY, G. Clays and humic acids affect the persistence and biological activity of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* in soil. **Developments in Soil Science**, Amsterdam, v. 28B, n. 2, p. 1-16, 2002.

STOTZKY, G. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. **Journal Environmental Quality**, Madison, v. 29, p. 691-705, 2000.

TAN, F.; WANG, J.; FENG, Y.; CHI, G.; KONG, H.; QIU, H.; WEI, S. *Bt* corn plants and their straw no apparent impact on soil microbial communities. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 329, p. 349-364, 2010.

TAPP, H.; STOTZKY, G. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* from soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 4. p. 472-476, 1998.

THIES, J. E. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 71, n. 2, p. 579-591, 2007.

THIES, J. E.; RILLIG, M. C.; Characteristics of biochar: biological properties. In: LEHMANN, J.; JOSEPH, S. (Ed.). **Biochar for environmental management: science and technology**. Oxford: Taylor & Francis, 2009. Chap. 6.

TURRINI, A.; SBRANA, C.; NUTI, M. P.; PIETRANGELI, B.; GIOVANNETTI, M. Development of a model system to assess the impact of genetically modified corn and aubergine plants on arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, p. 69-75, 2004.

Van ELSAS, J. D.; DUARTE, G. F.; KEIJZER-WOLTERS, A.; SMIT, E. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 133-151, 2000.

VENTURINI, A. M. **Efeito do uso do solo e da rizosfera de cana-de-açúcar na estrutura e abundância de comunidades de Bacteria e do filo Verrucomicrobia**. 2014. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

VERBRUGGEN, E.; KURAMAE, E.; HILLEKENS, R.; HOLLANDER, M.; KIERS, T.; ROLING, W. F. M.; KOWALCHUK, G. A.; VAN DER HEIJDEN, M. G. A. Testing potential effects of maize expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Endotoxin (Bt Maize) on Mycorrhizal fungal communities via DNA- and RNA-Based pyrosequencing and molecular fingerprinting. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 78, p. 7384-7392, 2012.

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

YANG, B.; LIU, X.; CHEN, H.; GE, F. The specific responses of Acari community to Bt cotton cultivation in agricultural soils in northern China, **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 66, p. 1-7, 2013.

YU, Y.; LEE, C.; HWANG, S. Analysis of community structures in anaerobic processes using quantitative real-time PCR method. **Water Science and Technology**, London, v. 52, p. 85-91, 2005.