

Avaliação do Impacto de Milho Transgênico Expressando o Gene de Tolerância ao Alumínio *SbMATE* sobre a Comunidade Bacteriana do Solo

Eliane Aparecida Gomes¹; Claudia Teixeira Guimarães¹; Ubiraci Gomes de Paula Lana²; Ana Laura Verdolin³; Christiane Abreu de Oliveira¹

(¹) Pesquisador; Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas, MG; eliane.a.gomes@embrapa.br, (²) Analista de Pesquisa; Embrapa Milho e Sorgo; (³) Bolsista FAPEMIG.

RESUMO: Mecanismos de tolerância ao Al em plantas atuam na ativação de transportadores de membrana que mediam a exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes formando um complexo quelante não tóxico com o Al no solo. Buscando aumentar a tolerância ao Al, a linhagem-elite de milho L3 da Embrapa foi transformada com o gene *SbMATE* que codifica um transportador de citrato na raiz de sorgo, apresentando elevados níveis de exsudação de citrato em solução nutritiva contendo níveis tóxicos de Al. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do milho transgênico superexpressando o gene *SbMATE* sobre a atividade e a diversidade metabólica da comunidade bacteriana da rizosfera em comparação com os genótipos convencionais cultivados em condições de campo. Estes parâmetros foram avaliados em três fases do desenvolvimento da planta pelo consumo de diferentes fontes de carbono em Ecoplates Biolog, que fornece informações sobre a atividade metabólica dos microrganismos. A atividade e a diversidade microbiana variaram durante o desenvolvimento da cultura, apresentando o pico máximo durante o período de florescimento, sendo mais elevadas nos híbridos do que nas linhagens. A atividade metabólica do solo não rizosférico foi significativamente inferior em relação ao solo rizosférico, sendo essa diferença mais acentuada aos 90 dias, que coincide com a fase de enchimento de grãos. Os parâmetros utilizados para avaliar a atividade e a diversidade metabólica não mostraram diferença significativa entre as comunidades bacterianas dos genótipos transgênicos e não transgênicos, indicando que o citrato exsudado pelas raízes de milho expressando o gene *SbMATE* não altera o metabolismo das comunidades microbianas do solo.

Termos de indexação: Microbiota, rizosfera, diversidade metabólica, Al

INTRODUÇÃO

O principal mecanismo de tolerância ao Al em plantas envolve ativação de transportadores de membrana responsáveis pela exsudação de ácidos orgânicos no ápice radicular, que formam complexos estáveis e não tóxicos com o alumínio (DELHAIZE et al., 2007). O gene *SbMATE* é um membro da família MATE (multidrug and toxic compound extrusion), que codifica um transportador de membrana, responsável pela exsudação de citrato ativada por Al³⁺ nos ápices radiculares de genótipos de sorgo tolerantes ao Al (MAGALHÃES et al., 2007). Buscando aumentar a tolerância ao Al em milho, a Embrapa Milho e Sorgo desenvolveu uma linhagem transgênica que, além de superexpressar o gene *SbMATE* de sorgo, apresenta níveis elevados de exsudação de citrato em solução nutritiva (MITRE, 2014). Como o aumento na exsudação de ácidos orgânicos pelas plantas de milho transgênicas pode levar a uma alteração na biodiversidade e na atividade da comunidade microbiana do solo, e por ser uma exigência dos órgãos regulamentares e da legislação de biossegurança, o desenvolvimento de pesquisas e metodologias para avaliar impacto do cultivo de plantas transgênicas sobre as comunidades microbiológicas no campo torna-se fundamental (VASCONCELOS; CARNEIRO, 2013). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos genótipos de milho transgênicos superexpressando o gene *SbMATE* sobre a atividade e a diversidade metabólica de bactérias da rizosfera.

MATERIAL E MÉTODOS

Genótipos

Os genótipos utilizados foram L3T (linhagem L3 transgênica), L3 (linhagem L3 não transgênica), L3TxL53 (híbrido transgênico) e L3xL53 (híbrido não transgênico). A linhagem transgênica L3 (L3T) foi gerada a partir de um evento transgênico no híbrido Hill (PÔSSA, 2010) introgridido na linhagem elite L3 por retrocruzamento assistido por marcadores.

Área Experimental para Liberação Planejada de Plantas Transgênicas

O experimento foi realizado em local de liberação planejada na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais. O plantio das linhagens e dos híbridos foi realizado em subáreas separadas por bordadura de genótipos não transgênicos em alta (40 a 55%) e baixa saturação de AI (0 a 2%), com três repetições. A adubação de plantio seguiu as recomendações da cultura com base na análise de fertilidade do solo. As coletas de solo rizosférico foram realizadas aos 30 (fase vegetativa), 60 (florescimento) e 90 (enchimento de grãos) dias após o plantio. O sistema radicular de três plantas por linha foi coletado, sendo considerado como solo rizosférico aquele aderido às raízes. Após a coleta, 5 g de raízes finas e centrais que continham solo aderido a elas foram agitadas por 30 minutos em solução de pirofosfato de sódio 0,1% (m/v) em homogeneizador horizontal. Como controle, foi coletado na mesma área solo não rizosférico.

Atividade Metabólica dos Microrganismos

Para a determinação da atividade e diversidade metabólica foram utilizadas placas Ecoplates (Biolog, Inc., Hayward, CA, EUA). Um volume de 5 mL da solução de pirofosfato de sódio 0,1% (m/v) contendo solo foi centrifugado por 15 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante obtido foi diluído 50 vezes. Cada poço da placa de Biolog foi inoculado com 120 µL da solução e as placas foram incubadas no escuro durante 5 dias a 28 °C. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Labstems, Multiskan, MS, EUA) com comprimento de onda de 590 nm, nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. Esses dados foram utilizados para estimativa dos valores da atividade total (AWCD) e do índice de diversidade de Shannon (H) de acordo com Zak et al. (1994). Os resultados em AWCD e H foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a 5% de probabilidade e teste de Scott-Knott, a 1% e 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade Metabólica

O índice de atividade metabólica (AWCD) variou ao longo do tempo de incubação, atingindo o pico máximo após 72 horas, para a maioria dos genótipos avaliados (**Figura 1**). Assim, essa leitura foi utilizada para cálculos dos componentes de diversidade metabólica.

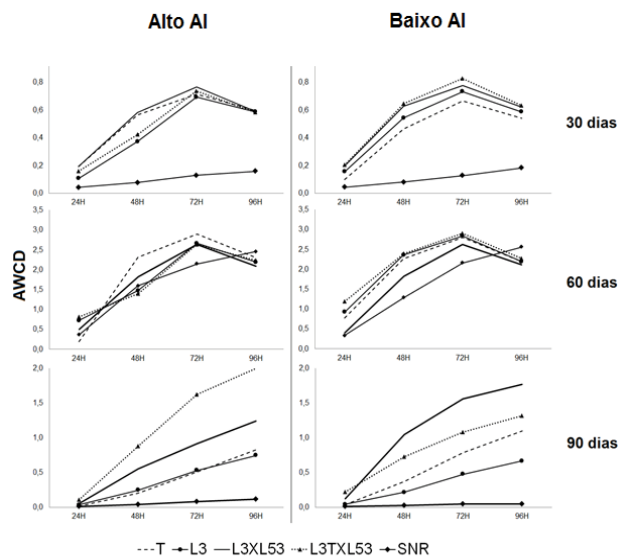


Figura 1. Medida de desenvolvimento de cor (AWCD) baseada no padrão de utilização dos substratos em placas Biolog Ecoplate das comunidades microbianas da rizosfera de milho. (L3T) linhagem L3 transgênica; (L3) linhagem L3 não transgênica; (L3xL53) híbrido não transgênico; (L3TxL53) híbrido transgênico e (SNR) solo não rizosférico.

Aos 30 e 60 dias do desenvolvimento da cultura, as comunidades bacterianas dos genótipos não apresentaram diferenças na atividade metabólica, diferindo apenas em relação ao solo não rizosférico (**Tabela 1**). No entanto, aos 90 dias, na fase de enchimento de grãos, a comunidade microbiana dos híbridos apresentou uma maior atividade metabólica em relação às linhagens, independentemente de os genótipos serem transgênicos ou não. Nota-se que a atividade metabólica do solo não rizosférico foi significativamente inferior ao solo rizosférico em todas as fases do desenvolvimento da cultura.

Tabela 1. Comparação das médias da atividade metabólica (AWCD) de comunidades microbianas da rizosfera de genótipos de milho transgênico e não transgênico pelo teste de Scott-Knott ao longo do desenvolvimento da cultura.

Genótipos	30 dias	60 dias	90 dias
L3TxL53*	0,781 a**	2,775 a	1,353 a
L3xL53	0,771 a	2,632 a	1,240 a
L3	0,771 a	2,754 a	0,507 b
L3T	0,690 a	2,846 a	0,651 b
SNR	0,128 b	2,157 b	0,067 c

*Identificação dos tratamentos de acordo com a Figura 1.

**Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

A análise de regressão possibilitou a visualização

do comportamento das comunidades microbianas ao longo do desenvolvimento da cultura (**Figura 2**). O pico máximo de atividade metabólica das comunidades bacterianas foi aos 60 dias, coincidindo com a fase de florescimento, sendo que as amostras de solo não rizosférico apresentaram atividade inferior ao longo de todo o desenvolvimento da cultura. Adicionalmente, a superioridade dos híbridos quanto à atividade metabólica em relação às linhagens foi observada apenas aos 90 dias após o plantio.

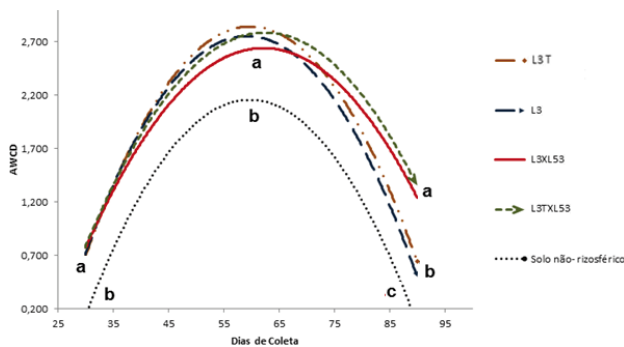


Figura 2. Análise de regressão baseada nos valores de atividade metabólica (AWCD), ao longo das três fases de desenvolvimento da cultura (30, 60 e 90 dias). Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade. Identificação dos tratamentos de acordo com a Figura 1.

Vários trabalhos têm relatado que na fase de florescimento ocorre a maior atividade microbiana, por causa da maior taxa de exsudação e liberação de fontes de carbono pela planta. A principal fonte de carbono para os microrganismos do solo são os exsudatos das raízes, que, no período de florescimento e frutificação das plantas, estão em pleno desenvolvimento e atividade e quando estes estágios vegetais ocorrem simultaneamente com temperatura e umidade favoráveis promovem o crescimento e atividade da biomassa microbiana (LYNCH; PANTING, 1982; PEIFFER; LEY, 2013).

Diversidade Metabólica Avaliada pelo Índice de Shannon

Os valores de AWCD obtidos pelo consumo de diferentes fontes de carbono em placas de Biolog foram convertidos em índice de diversidade de Shannon (H). O teste de média foi semelhante ao obtido com os valores de AWCD, exceto aos 60 dias, cuja diversidade metabólica das amostras de solo rizosférico e não rizosférico não apresentou diferença significativa. Aos 30 dias de desenvolvimento da cultura, as comunidades microbianas da rizosfera diferiram significativamente da amostra de solo não rizosférico. Aos 90 dias, as comunidades de solo rizosférico dos híbridos foram superiores às

linhagens, independentemente de serem ou não transgênicos (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Comparação das médias da diversidade metabólica (Índice de Shannon) de comunidades microbianas da rizosfera de genótipos de milho transgênico e não transgênico pelo teste de Scott-Knott ao longo do desenvolvimento da cultura.

GENÓTIPOS	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS
L3TXL53*	3,354 a**	3,396 a	2,917 a
L3XL53	3,371 a	3,390 a	2,948 a
L3	3,330 a	3,398 a	2,485 b
L3T	3,326 a	3,407 a	2,610 b
SNR	2,869 b	3,269 a	1,507 c

*Identificação dos tratamentos de acordo com a Figura 1.

**Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

A análise de regressão com base no Índice de Shannon revelou um perfil da diversidade das comunidades microbianas da rizosfera ao longo dos três meses do desenvolvimento da cultura de milho semelhante ao obtido com os valores de AWCD. O pico máximo de diversidade foi aos 60 dias, sem diferença significativa entre as amostras. Aos 90 dias, houve uma diferenciação entre genótipos, em que os híbridos apresentaram maiores índice de diversidade, seguidos das linhagens e do solo não rizosférico (**Figura 3**).

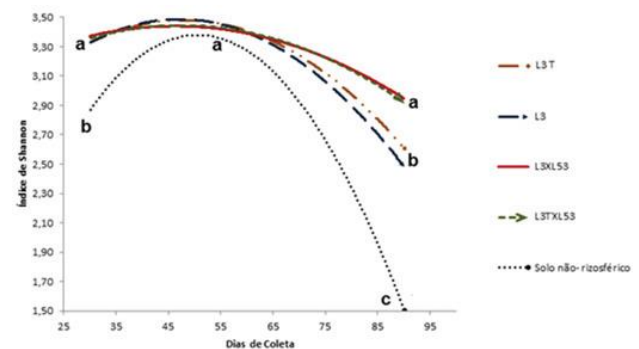


Figura 3. Análise de regressão baseada nos valores do Índice de Shannon ao longo das três fases de desenvolvimento da cultura (30, 60 e 90 dias). Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade. Identificação dos tratamentos de acordo com a Figura 1.

CONCLUSÕES

Os níveis contrastantes de AI no solo, a fase desenvolvimento da cultura e a presença de híbridos e de linhagens influenciaram a estrutura e a composição das comunidades bacterianas do solo.

As comunidades bacterianas coletadas em solo

rizosférico apresentaram maior atividade e diversidade metabólica que as comunidades do solo não rizosférico.

A atividade e a diversidade metabólica das comunidades bacterianas da rizosfera de linhagens e híbridos de milho não foram afetadas em função da expressão do transgene *SbMATE*.

ZAK, J. C.; WILLIG, M. R.; MORRHEAD, D. L.; WILDMAN, H. G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 26, p. 1101-1108, 1994.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Embrapa, Fapemig e ao Generation Challenge Program pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

DELHAIZE, E.; GRUBER, B. D.; RYAN, P. R. The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, p. 2255-2262, 2007.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

LYNCH, J. M.; PANTING, L. M. Effects of season, cultivation and nitrogen fertilizer on the size of the soil microbial biomass. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 33, p.249-252, 1982.

MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y. H.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, p. 1156-1161, 2007.

MITRE, L. K. **Caracterização genética e morfofisiológica de linhagens e híbridos transgênicos de milho expressando o gene SbMATE de sorgo**. 2014. 42 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Ciência Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PÔSSA, K. F. **Superexpressão em plantas transgênicas de milho do gene SbMATE, que confere tolerância ao alumínio em sorgo**. 2010. 108 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PEIFFER, J. A.; LEY, R. E. Exploring the maize rhizosphere microbiome in the field: a glimpse into a highly complex system. **Communicative and Integrative Biology**, v. 6, n. 5, p. e25177, 2013.

VASCONCELOS, M. J. V. de; CARNEIRO, A. A. **Metodologia de análise de biossegurança: análise de risco de milho geneticamente modificado**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 201).



XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

"Milho e Sorgo: inovações,
mercados e segurança alimentar"
