

BIOSSEGURANÇA DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS: EFEITO SOBRE MICRORGANISMOS NÃO-ALVO*

BIOSAFETY OF GENETICALLY MODIFIED PLANTS: EFFECTS OF NON-TARGET MICROORGANISMS

XAVIER, G.R.¹; KNUPP, A.M.^{1,2,3}; DRECHSEL, M.M.^{1,2,3}; JÚNIOR BATISTA, C.B.^{1,2,3}; BOHM, G.⁴; ROMBALDI, C.⁵; FARIA, J.C.⁶; MEISSNER FILHO, P.E.⁷; URQUIAGA, S.¹; BODDEY, R.M.¹; ALVES, B.J.R.¹; CORREIA, M.E.F.¹; RUMJANEK, N.G.¹

¹ Embrapa Agrobiologia, Cx. Postal 74.505, 23890-000, Seropédica, RJ

² Universidade Federal do Rio de Janeiro, Biotecnologia Vegetal, Ilha do Fundão-RJ

³ Professor de Fisiologia Vegetal – Departamento de Ciências Fisiológicas – UFRRJ

⁴ Centro Federal de Educação Tecnológica de Pelotas – Pelotas – RS

⁵ Universidade Federal de Pelotas– Pelotas - RS

⁶ Embrapa Arroz e Feijão – Santo Antônio de Goiás - GO

⁷ Embrapa Mandioca e Fruticultura – Cruz das Almas - BA

* Rede Embrapa Biossegurança – Financiamento FINEP, Embrapa Macroprograma 1

e-mail: gustavo@cnpab.embrapa.br

Resumo

A tecnologia de plantas transgênicas ou geneticamente modificadas (GMs) é fruto da inovação e gestão estratégica em biotecnologia e representa uma nova oportunidade para o controle de pragas e doenças, entre outras possibilidades. Apesar do potencial inerente à biotecnologia, muita preocupação quanto aos aspectos de biossegurança tem sido demonstrada pela população e segmentos da comunidade científica. A avaliação de impacto ambiental decorrente do plantio de plantas GMs é uma questão que tem sido extensamente discutida em vários países. Ao contrário do que é observado para a avaliação da segurança alimentar, não existe ainda consenso sobre como determinar a possibilidade de riscos ao meio ambiente uma vez que o conhecimento científico sobre os processos ambientais e ecológicos é ainda bastante limitado. Em relação ao cultivo de plantas transgênicas, as preocupações ambientais incluem efeitos sobre organismos não-alvo. Alterações nessas populações de organismos que estão estreitamente associados a plantas GMs ou que fazem parte da sua cadeia trófica, podem indicar que a transformação genética promoveu a ocorrência de alterações não esperadas. Neste trabalho são apresentados os avanços nos critérios analíticos e os resultados obtidos pela análise do efeito de plantas GMs sobre microrganismos não-alvos. Para responder ao objetivos foram estudados o efeito em: (1) feijão transgênico para resistência ao vírus mosaico dourado, evento M1-4, (2) mamão para resistência ao vírus da mancha anelar, (3) soja para resistência ao herbicida glifosato e (4), a aplicação da toxina Cry3A do *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ao solo. Os resultados obtidos indicam que a avaliação da comunidade bacteriana do solo e seus processos representam uma importante estratégia para a determinação do efeito de plantas geneticamente modificadas sobre organismos não-alvo, evidenciando a necessidade da avaliação continuada, caso a caso, como forma de precaução e monitoramento de possíveis impactos ambientais.

Abstract

The technology of transgenic or genetic modified (GMs) plants is the result of innovation and strategic management in biotechnology and represents a new opportunity to control pests and diseases, among other possibilities. Despite the inherent potential of biotechnology, much concern about aspects of biosafety has been demonstrated by the segments of the population and scientific community. The evaluation of environmental impact resulting from cultivation of GMs plants is an issue that has been extensively discussed in several countries. Contrary to what is observed for the evaluation of food security, there is still no consensus on how to determine environmental risk assessment because the scientific knowledge on environmental

and ecological processes is still very limited. For the cultivation of transgenic plants, environmental concerns include effects on non-target organisms. Changes in these populations that are closely associated with the GMs plants, may indicate that the genetic transformation promoted the occurrence of changes not expected. This paper presents the advances in analytical criteria and results concerning the effect of GMs plants on non-target organisms. To respond to the goals we studied the effect of: (1) transgenic beans for resistance to golden mosaic virus, event M1-4, (2) papaya for resistance to ring spot virus, (3) soybeans for resistance to the herbicide glyphosate and (4) the application of the toxin Cry3A of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* to the soil. The results indicate that the evaluation of soil bacterial community and their process represent an important strategy for determining the effect of genetically modified plants on non-target organisms, highlighting the need for continued evaluation, case by case, as a precaution and monitoring of environmental impacts.

Introdução

O termo Biossegurança tem uma ampla abrangência, que segundo TEIXEIRA & VALLE (1996) poderia compreender a prevenção, minimização ou eliminação dos riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção e ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, visando à proteção da saúde humana, dos animais, das plantas e a preservação do meio ambiente.

Na década de 1970, quando o termo foi cunhado nos Estados Unidos, relacionava-se com a preocupação com a saúde de trabalhadores diante de possíveis riscos biológicos no ambiente ocupacional, abrangendo, na década seguinte, riscos de natureza química, física, radioativa e ergonômica. Somente na década de 1990 o termo Biossegurança passou a incorporar preocupações relativas à ética na pesquisa, ao meio ambiente, animais e processos envolvendo a tecnologia do DNA recombinante (WHO, 1993).

No Brasil, estudos de biossegurança são necessários para a liberação de um cultivo com plantas geneticamente modificadas, tendo como órgão regulador a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), sob a égide da lei 11.105 de 24 de março de 2005. Essa lei está em consonância com o Protocolo de Biossegurança em Biotecnologia de 29 de janeiro de 2000 (Protocolo de Cartagena), parte da Convenção sobre Biodiversidade, que compete aos países signatários assegurar que as atividades envolvendo OGMs serão conduzidas de forma a não apresentar riscos à biodiversidade, saúde humana e ao meio ambiente (CDB, 2000).

Desde a produção da primeira planta transgênica pela Embrapa em 1986, pesquisadores das diferentes unidades dessa instituição vêm se aprimorando no uso da técnica do DNA recombinante e algumas variedades transgênicas têm sido desenvolvidas. Desde 2003, uma rede de pesquisa envolvendo mais de 130 pesquisadores do Brasil e do mundo (projeto BIOSEG) vem estabelecendo protocolos de análise para estudos de biossegurança de culturas transgênicas.

Neste trabalho são apresentados os avanços nos critérios analíticos e os resultados obtidos pela análise do efeito do cultivo de plantas transgênicas sobre organismos não-alvos, tendo como parâmetro a comunidade bacteriana do solo.

Material e Métodos

Para responder ao objetivos foram estudados o efeito em: (1) feijão transgênico para resistência ao vírus mosaico dourado, evento M1-4, (2) mamão para resistência ao vírus da mancha anelar, (3) soja para resistência ao herbicida glifosato e (4), da toxina Cry3A do *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* conforme descrito abaixo:

(1) Ao longo de três anos (2004-2006), foram implantados experimentos de campo com o feijoeiro transgênico para resistência ao vírus mosaico dourado, evento M1-4, na Embrapa Arroz e Feijão, com 10 repetições do tratamento transgênico e convencional. Desses experimentos, células bacterianas foram obtidas diretamente da rizosfera e do solo e crescidas em meio de cultura. O DNA total foi extraído de acordo com o protocolo descrito por SCHWIEGER & TEBBE (1998). Após a extração, as amostras foram amplificadas com iniciadores universais para o grupo bactéria (NÜBEL et al., 1996), de acordo com GELSOMINO et al. (1999), e iniciadores para o grupo Alfa de proteobactéria (GOMES et al., 2001). Após

esse processo, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel com gradiente de desnaturante (DGGE). Após digitalização, foram gerados perfis de 16S rDNA PCR-DGGE com o método UPGMA e o coeficiente de Jaccard, para comparar a cultivar Olathe M1-4 com a Olathe Pinto convencional.

(2) Seis cultivares transformadas de mamoeiro para resistência ao vírus da mancha anelar, foram comparadas com a cultivar convencional, através da técnica de 16S rDNA PCR-DGGE para o grupo bacteriana. Além disso, para a cultivar convencional, foram avaliadas a dinâmica de decomposição de folhas de plantas de mamão pela quantificação da biomassa microbiana do solo (BARTLETT & ROSS, 1988) e da taxa de respiração basal (URQUIAGA et al., 1998).

(3) No caso da soja para resistência ao herbicida glifosato, foram feitos dois estudos de campo em anos consecutivos, sendo avaliados parâmetros agrônômicos, a fixação biológica de nitrogênio, a biomassa microbiana e a respiração do solo. Os tratamentos empregados foram: a) cultivar BRS 244 GM sem aplicação de herbicida e com capina manual, b) cultivar BRS 154 sem aplicação de herbicida e com capina manual, c) cultivar BRS 244 GM com uma aplicação de glifosato a 960 g ia (ingrediente ativo). ha⁻¹, d) com duas aplicações de glifosato a 960 g ia ha⁻¹ e, e) uma aplicação de herbicida Imazetapir a 100 g ia ha⁻¹ (BOHM, 2007). A contribuição da FBN foi quantificada pela técnica de diluição isotópica de ¹⁵N, baseada na abundância natural desse isótopo (SHEARER & KOHL, 1986), o carbono da biomassa microbiana, pelo método de VANCE et al. (1987), e a respiração basal pelo método adaptado por SANTOS et al. (2004).

(4) Foi realizada a extração, purificação e solubilização da toxina Cry3A do *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tenebrionis* (REGEV et al, 1996), e após detecção e quantificação, a toxina foi aplicada em três solos em diferentes concentrações (0,1; 0,5; 2,5 e 12,5 ng . g de solo seco⁻¹), que foram monitorados durante 2, 5, 15, 30, 60 e 90 dias após a aplicação da toxina. A comunidade bacteriana também foi avaliada por DGGE utilizando solo como fonte de nutriente para o cultivo de microrganismos (ZILLI et al. 2003).

Resultados e Discussão

(1) Nos dois primeiros anos de avaliação do feijoeiro resistente ao mosaico dourado, foram amostradas metade das repetições do experimento e os dendogramas comparativos dos perfis de 16S rDNA PCR-DGGE de bacteriana não mostraram distinção entre a cultivar transformada e a convencional quanto as comunidades rizosférica e de solo. No entanto, uma amostragem mais abrangente foi realizada no terceiro ano incluindo bactérias cultivadas e não-cultivadas da rizosfera e do solo de todas as repetições experimentais e com a inclusão da análise do grupo alfa de proteobacteria (KNUPP, 2008). Os resultados obtidos para as diferentes amostragens com iniciadores universais corroboraram com os resultados dos anos anteriores. Porém, quando se analisou o grupo alfa de proteobacteria, uma separação entre os genótipos foi observada indicando a necessidade de se considerar a análise desse e de outros grupos específicos. Segundo HEUER et al. (2002), a análise de grupos específicos permite a observação de bandas não evidentes nos perfis de comunidade bacteriana total.

(2) Dos seis eventos de transformação testados de mamoeiro para resistência ao vírus da mancha anelar, um apresentou os perfis de 16S rDNA PCR-DGGE mais aproximados dos da planta convencional, sendo de fundamental importância para a escolha do evento sobre o qual se desenvolverão os demais estudos visando à adoção do transgênio (DRECHSEL, 2006).

(3) No caso da soja para resistência ao herbicida glifosato os resultados encontrados indicaram que a presença da planta modificada não afetou o carbono da biomassa microbiana e o quociente metabólico do solo, tampouco observaram-se efeitos sobre a nodulação, FBN, produtividade de grãos e teor de isoflavonas dos grãos. No entanto, um dos estudos mostrou que a soja GM desenvolvida para ser manejada com o uso do herbicida glifosato aumenta a respiração basal do solo, reduz a massa de nódulos e a contribuição da FBN (BOHM, 2007).

(4) Para os resultados relacionados à toxina Cry3A do *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tenebrionis*, foi observado que o perfil da comunidade bacteriana varia em relação a concentração da toxina, o tipo de solo e o período de incubação. A concentração de 12,5 ng de Cry3A por grama de solo seco foi a que mais alterou a estrutura da comunidade bacteriana nos

três solos estudados. Particularmente no caso de solo sob vegetação de cerrado o perfil da comunidade bacteriana foi mais susceptível à toxina Cry3A na concentração de 12,5 ng por grama de solo seco. O efeito da toxina Cry3A sobre a comunidade bacteriana pode persistir por períodos de até noventa dias.

Conclusões

Os resultados obtidos indicam que a avaliação da comunidade bacteriana do solo e seus processos representam uma importante estratégia para a determinação do efeito de plantas geneticamente modificadas sobre organismos não-alvo, evidenciando a necessidade da avaliação continuada, caso a caso, como forma de precaução e monitoramento de possíveis impactos ambientais.

Referências

BARTLETT, R. J. & ROSS, D. S. Colorimetric determination of oxidizable carbon in acid soil solutions. **Soil Science Society of America Journal**, 52:1191-1192, 1988.

DRECHSEL, M. M.. **Metodologias para Avaliação do Impacto Ambiental causado pelo Mamão Geneticamente Modificado com Resistência a Mancha Anelar na Comunidade Microbiana do Solo**. Dissertação Mestrado em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2006, 119p

GELSOMINO, A.; KEIJZER-WOLTERS, A. C.; CACCO, G.; VAN ELSAS, J.J. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 1-15, 1999.

KNUPP, A. M. **Análise da comunidade bacteriana rizosférica e não-rizosférica do feijoeiro transgênico para resistência ao vírus do mosaico dourado, evento M1-4**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008, 116p

NÜBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, I. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polynyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, n. 19, p. 5636-5643, 1996.

REGEV, A.; KELLER, M.; STRIZHOV, N.; SNEH, B.; PRUDOVSKY, E.; CHET, I.; GINZBERG, I.; KONCZ-KALMAN, Z.; KONCZ, C.; SCHELL, J.; ZILBERSTEIN, A. (1996) Sinergistic activity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* Larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.3581-3586.

SANTOS, V.B.; CASTILHOS, D.D.; CASTILHOS, R.M.V.; PAULETTO, E.A.; GOMES, A.S.; SILVA, D.G. Biomassa, atividade microbiana e teores de carbono e nitrogênio totais de um planossolo sob diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10, n.3, p. 333-338, 2004.

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

SHEARER, G.B.; KOHL, D.H. N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, p.699-756, 1986.

TEIXEIRA, P. & VALLE, S. **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1996.

URQUIAGA, S.; CADISCH, G.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; GILLER, K. Influence of the decomposition of roots of tropical forage species on the availability of soil nitrogen. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 14, p. 2099-2106, 1998.

WHO. **Laboratory Biosafety Manual**. Geneve: 2^a Edition, 1993.

ZILLI, J. E.; SANTOS, E. L.; HAGLER, L. M.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. (2003) Desenvolvimento de meio de cultivo para microrganismos do solo utilizando solo como fonte de nutrientes. In: **XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Florianópolis. (Resumos)...Florianópolis, SC: Sociedade Brasileira de Microbiologia, p. 130.