



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

SUZANA SOSA COIMBRA

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO ALGODÃO TRANSGÊNICO-  
BOLLGARD I- SOBRE ALGUNS ATRIBUTOS  
MICROBIOLÓGICOS DO SOLO**

SUZANA SOSA COIMBRA

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO ALGODÃO TRANSGÊNICO-  
BOLLGARD I- SOBRE ALGUNS ATRIBUTOS  
MICROBIOLÓGICOS DO SOLO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Microbiologia da Universidade  
Estadual de Londrina como parte dos requisitos para  
a obtenção do título de Mestre em Microbiologia

Orientador: Prof.Dr. Galdino Andrade

Londrina  
2010

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Coimbra, Suzana Sosa.

Avaliação do Impacto do Algodão Transgênico – Bollgard I- Sobre Alguns Atributos Microbiológicos do Solo / Suzana Sosa Coimbra. - Londrina, 2010.  
66 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade Filho.

Coorientador: Marcos Antonio Nogueira.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2010.  
Inclui bibliografia.

1. Algodão Bollgard I - Tese. 2. Fungo micorrízico arbuscular - Tese. 3. Algodão transgênico - Tese. 4. Microbiota do solo - Tese. I. Filho, Galdino Andrade . II. Nogueira, Marcos Antonio . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

SUZANA SOSA COIMBRA

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO ALGODÃO TRANSGÊNICO -  
BOLLGARD I- SOBRE ALGUNS ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS DO  
SOLO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Galdino Andrade Filho  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Diva Andrade  
Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR

---

Prof. Dr. Marcos Antonio Nogueira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 de Março de 2010.

## **DEDICO**

*A Deus, por ser a luz que ilumina minha vida e  
especialmente ao meu pai, Mario Sosa  
Parraga, por ser minha fonte de inspiração e  
perseverança*

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família pelo incentivo, confiança, motivação e principalmente pela compreensão pela minha ausência durante esse período.

Ao Prof. Dr. Galdino Andrade pela orientação, companheirismo, amizade e aprimoramento profissional

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira pela amizade, atenção e pelo apoio constante no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Waldemar Zangaro pelas contribuições realizadas ao longo da dissertação e pelo companheirismo.

A todos colegas do Laboratórios de Ecologia Microbiana pelo suporte e aprendizagem durante esses dois anos de mestrado e em especial a Fernanda, Kellen, Lucilene, Jamile e Nagome pela ajuda nos experimentos, companheirismo, motivação, mas principalmente pela amizade e o carinho.

Ao Prof. Dr Leon Rabinovicht e Sônia Ermelinda da Silva (FioCruz) por serem os principais responsáveis e incentivadores pelos meus primeiros passos no desenvolvimento científico dentro da Microbiologia.

A coordenação do curso de Pós-Graduação em Microbiologia por oferecer suporte e condições para realização da dissertação.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho sobre tudo pela minha formação científica e pessoal.

COIMBRA, Suzana Sosa. **Avaliação do impacto do algodão transgênico – Bollgard I** sobre alguns atributos microbiológicos do solo. 2010. 62f Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

## RESUMO

Quando um ecossistema sofre algum tipo de interferência, a microbiota do solo assim como as reações biogeoquímicas e transformações podem sofrer alterações significativas acarretando em efeitos nocivos a saúde do solo e conseqüentemente no crescimento da planta. Proteínas de plantas transgênicas podem ser liberadas, acumuladas e influenciar seletivamente sobre a comunidade microbiana. O objetivo desse trabalho foi avaliar, em casa de vegetação, a influência do algodão transgênico- Bollgard I sobre grupos funcionais de microrganismos do solo, em comparação com a sua variedade parental. O experimento utilizou o algodão Bollgard I, que apresenta resistência a lagartas de Lepidoptera, e sua variedade parental não geneticamente modificada (Non-GMP), inoculadas ou não com fungo micorrízico arbuscular (MA). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, cinco tempos de avaliação e cinco repetições que totalizam 100 parcelas experimentais, ao longo de 120 dias após a germinação. Foram realizadas análises sobre os atributos microbiológicos: bactérias celulolíticas, proteolíticas e amilolíticas, actinomicetos, pseudomonas fluorescente, fungos totais, bactérias heterotróficas, microrganismos solubilizadores de fosfato, protozoários flagelados e ciliados e colonização micorrízica, respiração basal, biomassa microbiana de carbono e do nitrogênio; bioquímicos: atividades enzimáticas no solo (fosfatase ácida, desidrogenase, urease, celulase e asparaginase) e químicas: pH. Assim como, foi avaliado o peso da massa seca da parte aérea, raiz e o comprimento de raiz. Os resultados revelaram que os tratamentos influenciaram a atividade enzimática ao longo do tempo amostral. O pH foi influenciado em todos os tempos, sendo constatados os maiores valores nas plantas parentais não GMP. A interação entre plantas geneticamente modificadas e micorrizas arbusculares influenciou a maioria dos grupos funcionais ao longo dos tempos analisados, constatando-se um efeito deletério sobre a comunidade de bactérias heterotróficas. A micorrização demonstrou diferenças ao longo dos 120 dias na grande maioria das enzimas analisadas. A interação PGM\*MA se revelou significativa para pelo menos uma das cinco enzimas analisadas ao longo dos 120 dias. Os tratamentos não influenciaram a taxa de desprendimento de CO<sub>2</sub>, os teores de C e de N da biomassa microbiana. A presença da planta transgênica não afetou o estabelecimento das relações simbióticas entre a planta e o fungo, sendo considerados altos os níveis de colonização micorrízica nos dois tratamentos. A inoculação do FMA influenciou no crescimento da planta tanto na variedade parental quanto na GMP. O comprimento específico da raiz por planta foi maior nas plantas micorrizadas durante todos os tempos de avaliação.

**Palavras- chaves:** Algodão Bollgard I. Grupos funcionais. Impacto no solo. Comunidade microbiana. Fungo micorrízico.

COIMBRA, Suzana Sosa. **Evaluation of the impact of transgenic cotton - Bollgard I - on some soil microbiological attributes.** 2010. 62p Dissertação de Mestrado (Pós- graduação em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

### ABSTRACT

When an ecosystem suffers some kind of interference, the soil microbiota as well as the biogeochemical reactions and transformations can undergo significant alterations, causing harmful effects on soil health and consequently on plant growth. Transgenic plant proteins can be released, accumulated and selectively influence the microbial community. The objective of this work was to evaluate, in greenhouse, the influence of transgenic cotton- Bollgard I on functional groups of soil microorganisms, in comparison with their parental variety. The experiment used the Bollgard I cotton, which shows resistance to Lepidoptera caterpillars, and its non-genetically modified (Non-GMP) parental variety, inoculated or not with arbuscular mycorrhizal fungus (AM). The experimental design was completely randomized, with four treatments, five evaluation times and five replications totaling 100 experimental plots over 120 days after germination. The microbiological attributes were: cellulolytic, proteolytic and amylolytic bacteria, actinomycetes, fluorescent pseudomonas, total fungi, heterotrophic bacteria, phosphate solubilizing microorganisms, flagellate and ciliary protozoa and mycorrhizal colonization, basal respiration, microbial carbon and nitrogen biomass; biochemical: enzymatic activities in soil (acid phosphatase, dehydrogenase, urease, cellulase and asparaginase) and chemical: pH. As well as, the weight of the dry mass of the aerial part, root and the root length was evaluated. The results showed that the treatments influenced the enzymatic activity throughout the sampling time. The pH was influenced at all times, being verified the highest values in the non-GMP parent plants. The interaction between genetically modified plants and arbuscular mycorrhizas influenced the majority of the functional groups throughout the analyzed times, showing a deleterious effect on the community of heterotrophic bacteria. Mycorrhization showed differences over the 120 days in most of the enzymes analyzed. The PGM \* MA interaction was shown to be significant for at least one of the five enzymes analyzed over the course of 120 days. The treatments did not influence the rate of CO<sub>2</sub> release, the C and N contents of the microbial biomass. The presence of the transgenic plant did not affect the establishment of the symbiotic relationships between the plant and the fungus, being considered high levels of mycorrhizal colonization in both treatments. FMA inoculation influenced plant growth in both parental and GMP varieties. Root length per plant was higher in mycorrhizal plants during all evaluation times.

**Key words:** Bollgard I cotton. Functional groups. Soil impact. Microbial community. Mycorrhizal fungus.

## LISTA DE FIGURA

- Figura 1** - Colonização micorrízica (%) por *Glomus clarum* dentro de cada tratamento e tempo de crescimento do algodão Bolgard. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro de cada tratamento ..... 59
- Figura 2** - Análise em diferentes épocas de avaliação do efeito de organismos PGM (G) e não GM (C), micorrizados (M1) e não micorrizados (M0) no crescimento do algodão. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro de cada tratamento ..... 60
- Figura 3** - Análise em diferentes épocas de avaliação do efeito de organismos PGM (G) e não GM (C), micorrizados (M1) e não micorrizados (M0) no crescimento do algodão. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro de cada tratamento ..... 61
- Figura 4** - Análise em diferentes épocas de avaliação do efeito de organismos PGM (G) e não GM (C), micorrizados (M1) e não micorrizados (M0) no crescimento do algodão. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro de cada tratamento ..... 62

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre a atividade de algumas enzimas relacionadas ao Ciclo do Nitrogênio, Atividade Biológica, Ciclo do Fósforo e Ciclo do Carbono na rizosfera de algodão Bollgard I com 15dias. Média de 20 plantas..... 49
- Tabela 2** - Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre a atividade de algumas enzimas relacionadas ao Ciclo do Nitrogênio, Atividade Biológica, Ciclo do Fósforo e Ciclo do Carbono na rizosfera de algodão Bollgard I com 45dias. Média de 20 plantas..... 50
- Tabela 3** - Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre a atividade de algumas enzimas relacionadas ao Ciclo do Nitrogênio, Atividade Biológica, Ciclo do Fósforo e Ciclo do Carbono na rizosfera de algodão Bollgard I com 60 dias. Média de 20 plantas..... 51
- Tabela 4** - Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre a atividade de algumas enzimas relacionadas ao Ciclo do Nitrogênio, Atividade Biológica, Ciclo do Fósforo e Ciclo do Carbono na rizosfera de algodão Bollgard I com 90 dias. Média de 20 plantas..... 52
- Tabela 5** - Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre a atividade de algumas enzimas relacionadas ao Ciclo do Nitrogênio, Atividade Biológica, Ciclo do Fósforo e Ciclo do Carbono na rizosfera de algodão Bollgard I com 120 dias. Média de 20 plantas..... 53
- Tabela 6** - Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre o pH e alguns grupos funcionais de microrganismos na rizosfera do algodão Bollgard I com 15 dias. Média de 20 plantas..... 54

<b>Tabela 7</b> - Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre o pH e alguns grupos funcionais de microrganismos na rizosfera do algodão Bollgard I com 45 dias. Média de 20 plantas.....	55
<b>Tabela 8</b> - Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre o pH e alguns grupos funcionais de microrganismos na rizosfera do algodão Bollgard I com 60 dias. Média de 20 plantas.....	56
<b>Tabela 9</b> - Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre o pH e alguns grupos funcionais de microrganismos na rizosfera do algodão Bollgard I com 90 dias. Média de 20 plantas.....	57
<b>Tabela 10</b> - Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre o pH e alguns grupos funcionais de microrganismos na rizosfera do algodão Bollgard I com 120 dias. Média de 20 plantas.....	58

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	18
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
4.1	Delineamento Experimental .....	19
4.2	Solo e Condições de Crescimento da Planta .....	19
4.3	Inóculo de Fungo Micorrízico Arbuscular .....	20
4.4	Análises Microbiológicas .....	20
4.4.1	Carbono da Biomassa Microbiana .....	21
4.4.2	Nitrogênio da Biomassa Microbiana .....	22
4.4.3	Respirometria .....	22
4.4.4	Protozoários .....	23
4.5	Colonização Micorrízica .....	23
4.6	Biomassa Seca: Parte Aérea e Raízes .....	24
4.7	Comprimento de Raízes .....	24
4.8	Análises Químicas .....	24
4.8.1	Determinação do Ph .....	24
4.9	Análises Bioquímicas .....	24
4.9.1	Fosfatase Ácida .....	24
4.9.2	Celulase .....	25
4.9.3	Asparaginase .....	26
4.9.4	Urease .....	27
4.9.5	Desidrogenase .....	27
4.10	Análise Estatística .....	28
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	29
5.1	Atividade Enzimática .....	29
5.2	Grupos Funcionais de Microrganismos do solo e Ph .....	30
5.3	Biomassa Microbiana, qCO <sub>2</sub> , Respirometria e relação C/N .....	31

5.4	Colonização Micorrízica .....	31
5.5	Crescimento da Planta .....	32
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
6.1	Atividade Enzimática .....	33
6.2	Grupos Funcionais de Microrganismos do solo e pH .....	34
6.3	Biomassa Microbiana, qCO <sub>2</sub> , Respirometria e relação C/N.....	36
6.4	Colonização Micorrízica .....	37
6.5	Crescimento da Planta .....	37
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>39</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>40</b>
	<b>APÊNDICE</b> .....	<b>48</b>
	APENDICE A .....	49

## 1- INTRODUÇÃO

O algodão (*Gossypium* spp.) é uma das principais culturas utilizadas para a produção de fibras no mundo, sendo uma das cadeias produtivas mais importantes do Brasil. Situa-se entre as dez maiores fontes de riqueza no setor agropecuário brasileiro, ocupando o sexto lugar em superfície cultivada no Brasil. As principais regiões produtoras de algodão do País são os Estados de Mato Grosso, Goiás, Bahia, Mato Grosso do Sul, Ceará, São Paulo, Minas Gerais e Paraná. As espécies de algodão cultivadas comercialmente no Brasil são *G. hirsutum* e, em menor área, *G. barbadense*.

*G. hirsutum* possui maior adaptabilidade, alta produtividade e é predominante no mundo. Sua fibra é utilizada na indústria têxtil, além de produtos não têxteis, sendo fonte de celulose industrial para diversos produtos. Já *G. barbadense* apresenta maior importância econômica, decorrente da qualidade e comprimento de sua fibra, sendo usada na produção de tecidos finos.

Contudo, desde meados da década de 80, o cultivo vem sofrendo sérios problemas de ordem agrícola e conjuntural, passando o Brasil de grande exportador para grande importador de fibras do algodão. Entre os principais fatores de ordem agrícola que contribuíram para o decréscimo na produção do algodão está a grande vulnerabilidade às pragas.

Entre as principais pragas do algodão no Brasil, destacam-se o curuquerê (*Alabama argillacea*), a lagarta-das-maçãs (*Heliothis virescens*), a lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*), a lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*), o pulgão (*Aphis gossypii*), o percevejo rajado (*Horcias nobillellus*) e o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*). O controle dessas pragas tem sido realizado principalmente com o uso de inseticidas. Desta forma, em todo o mundo, procuram-se alternativas ao controle de pragas que sejam menos prejudiciais ao ser humano e ao ambiente.

Inseticidas à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), têm sido usados em muitas regiões do mundo por mais de 30 anos para eliminar pragas de lepidópteros em hortaliças e culturas, e, mais recentemente, para o controle de besouros e larvas de mosquitos vetores de doenças. O sucesso das formulações com Bt baseia-se na alta eficácia e diversidade de proteínas inseticidas que são ativas contra uma gama de pragas, a toxicidade restrita sobre insetos-alvo, facilidade de produção em massa a um custo relativamente baixo, adaptabilidade à formulação convencional e a tecnologia de aplicação.

O primeiro gene da toxina Bt foi clonado em 1981, o que levou rapidamente para o desenvolvimento das primeiras plantas transgênicas Bt, em meados da década de 1980. Desde então, a maioria das principais culturas que sofrem danos econômicos substanciais por pragas como as lagartas e/ou besouro estão sendo modificadas geneticamente para produzir toxinas Bt para o controle desses insetos-pragas (Federici *et al.*,1998).

A obtenção de algodão transgênico, contendo gene ou genes de resistência às principais pragas da ordem Lepidoptera (curuquerê-do-algodão, lagarta-rosada e a lagarta-das-maçãs), surgiu como uma possibilidade na redução de insumos químicos para o controle dessas pragas.

Neste contexto, o algodão Bollgard foi geneticamente modificado a partir da transformação da variedade comercial Coker 312 com o vetor PV-GHBK04, por meio do sistema mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. A transformação inseriu os genes *cryIAc*, *nptII* e *aad* no genoma dessa variedade de algodão. O gene *cryIAc* é proveniente de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Bt), bactéria gram-positiva capaz de codificar os cristais contendo endotoxinas, proteínas com atividade entomopatogênica contra diferentes ordens de insetos. Essas endotoxinas são compostas por proteínas denominadas delta-endotoxinas ou proteínas Cry. As proteínas Cry apresentam ação extremamente tóxica para larvas de várias ordens como Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera e algumas espécies das ordens Nematoda, Protozoa e Acari.

Formulações comerciais de Bt contendo essas proteínas têm sido utilizadas no Brasil e em outros países para o controle de algumas pragas agrícolas há mais de 40 anos. A proteína Cry1Ac possui ação bastante específica e atua apenas por ingestão em algumas espécies de Lepidoptera. As plantas transgênicas podem liberar essas novas proteínas no ecossistema do solo proporcionando a interação da microbiota do solo com o produto dos transgenes. São poucos os trabalhos que visam avaliar os possíveis impactos da proteína transgênica sobre a funcionalidade da microbiota do solo.

## 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A agricultura é a atividade econômica mais antiga e importante do planeta. Desde seus primórdios, há aproximadamente 10 mil anos, baseia-se na interferência do homem no ecossistema, inicialmente visando à maior extração e coleta de materiais essenciais à sobrevivência e, atualmente, à produção de alimentos e materiais de valor econômico (El Feky, 2000), como o desenvolvimento da cotonicultura brasileira.

O plantio do algodão (*G. hirsutum*) precede o período de descobrimento do Brasil, intensificando durante a colonização portuguesa com a introdução e cultivo de novas espécies (Costa; Bueno, 2004). Já em 1760, o algodão era o principal produto de exportação, tendo sido amplamente cultivado no território brasileiro (Paiva; et al., 1976). A intensificação da exploração econômica ocorreu a partir de 1930, sendo o principal produto tanto em termos de produção quanto como de consumo na cadeia têxtil nacional e mundial. Segundo os últimos dados fornecidos pela Associação Brasileira das Indústrias Têxteis, no período de 1970 a 2001, a produção de algodão representou 60% do total de fibras produzidas no Brasil.

Entretanto, desde meados da década de 80, seu cultivo vem sofrendo sérios problemas (Cruz e Passos, 2002), passando o Brasil ao status de grande importador de fibras do algodão (Santos e Santos, 1997). Entre os principais fatores de ordem agrícola que contribuíram para o decréscimo na produção está a grande vulnerabilidade às pragas, as quais atacam as estruturas reprodutivas, prejudicando as sementes e, por conseguinte, as fibras, aumentando os custos com os insumos químicos utilizados para proteger a lavoura. Dentre as principais pragas destacam-se: a lagarta-rosada, o curuquerê-do-algodão, a lagarta-da-maçã e o bicudo (Gallo *et al.*, 2002). Estima-se que apesar dos 2,5 milhões de toneladas de defensivos agrícolas aplicados na agricultura mundial, mais de 40% do potencial de produção foram perdidos no campo em razão do ataque de insetos, plantas daninhas e patógenos (Paoletti, 2001).

Ao longo de décadas, importantes resultados foram obtidos pelos processos de produção agrícola, porém com elevado impacto ambiental em virtude do desmatamento e manejo inadequado do solo, como o superpastejo, salinização, compactação, erosão, perda de fertilidade e a contaminação com agroquímicos (Tilman *et al.*, 2001). Para reverter esse cenário, faz-se necessária a incorporação constante de avanços científicos e tecnológicos na agricultura, assim como mudanças políticas (Huang *et al.*, 2002). Desta forma, buscam-se alternativas que atendam os princípios básicos da sustentabilidade e que, ao mesmo tempo, garantam a produção do ponto de vista econômico, social e ecológico (Tilman *et al.*, 2002).

A descoberta das leis da hereditariedade, bem como a natureza química e a decifração do código genético, foi imprescindível para o advento da biotecnologia moderna. Na esfera agrícola, utiliza-se principalmente a tecnologia do DNA recombinante para a obtenção de plantas geneticamente modificadas (OGM) (Mann, 1999). Esta técnica constitui uma alternativa para as limitações impostas por estresses bióticos e abióticos, especialmente em áreas de baixa produtividade (Herrera-Estrella, 2000), além de ampliar o poder de manipulação dos organismos.

A técnica do DNA recombinante estabeleceu novos horizontes na utilização da variabilidade genética natural, pois incorpora genes de uma espécie no genoma de outra sem a necessidade da reprodução sexual (Paterniani, 2001). Esta metodologia constitui um processo mais rápido e mais preciso que o melhoramento convencional, pois permite a introdução de um único gene e a modificação de uma característica específica (The Royal Society, 2002).

A transgenia vegetal pode ser realizada de forma direta, por processos físico-químicos como eletroporação, microinjeção e bombardeamento com micropartículas, ou indireta, quando o DNA exógeno é inserido no genoma vegetal por meio de um vetor biológico como o plasmídeo das bactérias do solo *A. tumefaciens* ou *A. rhizogenes*. A resistência das plantas transgênicas a insetos, patógenos ou herbicidas (The Royal Society, 2002) possibilitou a redução no uso de defensivos agrícolas e, conseqüentemente, menor gasto de produção por parte do agricultor. Outras vantagens da transgenia incluem: maior variedade de produtos, maior disponibilidade dos mesmos ao longo do ano, menores preços para os consumidores e a produção de culturas enriquecidas com nutrientes. O aumento do rendimento per hectare também pode impedir novas conversões de áreas naturais em campos agrícolas (James, 2003; Stotzky, 2006).

Visando sanar as questões relacionadas aos insetos-pragas e inseticidas, desenvolveu-se o algodão Bollgard I, que apresenta resistência a lagartas de Lepidoptera decorrente da expressão da proteína Cry 1Ac, produzida pelo Bt (Hamilton *et al.*, 2004). Contudo, as proteínas Cry apresentam alta toxicidade a larvas de várias ordens como Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera e algumas espécies das dos grupos Nematoda, Protozoa e Acari (Feitelsen *et al.*, 1994).

Segundo Huang *et al.* (2002), cultivares de algodão Bt apresentam maior produtividade e custo de produção cerca de 25% menor devido à menor necessidade de inseticidas, com redução de até 80%, em relação às cultivares não-Bt. No trabalho de

Williams (2008) verificou-se a redução de 60% nas aplicações de inseticidas em apenas três anos após a introdução do algodão Bt.

No Brasil, frente ao intenso ataque de pragas e conseqüente prejuízo na produção, as culturas Bt têm se mostrado promissoras, especialmente no que se refere aos cultivos de milho e de algodão. O cultivo do algodão em certas regiões do País requer até 18 aplicações de inseticidas (Fontes *et al.*, 2002a), com sérias implicações à saúde ambiental e humana.

Em 2005, a CTNBIO emitiu parecer técnico conclusivo pela liberação comercial do cultivar Bollgard I da Monsanto no Brasil (Guimarães, 2005).

Apesar dos benefícios das culturas transgênicas, inúmeros questionamentos têm sido levantados sobre o risco ambiental de sua utilização em grande escala (Williamson, 1992). Estas preocupações, muitas das quais referentes ao algodão Bt, incluem a seleção de pragas Bt resistentes, impactos sobre organismos não-alvo e/ou de interesse econômico (Head *et al.*, 2002), efeitos negativos sobre a microbiota do solo e o escape dos transgenes para as culturas parentais selvagens (Raybould e Gray, 1994; Burke, 2006; Siqueira *et al.*, 2004).

O solo sustenta uma enorme diversidade de organismos que interagem entre si e exercem funções fundamentais à manutenção da fertilidade do solo, à nutrição e proteção das plantas. Constitui um ambiente heterogêneo, descontínuo e caracterizado por uma vasta e diversa comunidade biológica composta por bactérias, fungos, algas, partículas virais e organismos macroscópicos (Torsvik e Øvreås, 2002), com complexas interações ecológicas essenciais ao funcionamento dos ecossistemas terrestres, sendo a sua preservação uma das principais bases da sustentabilidade ambiental. A quantidade e variedade do número de organismos no solo é variável de acordo com as diferenças regionais, as técnicas de amostragem, microsítios dentro de um mesmo ecossistema e evidentemente pelo tipo de uso do solo. Este complexo emaranhado de relações entre microflora, fauna, condições ambientais, substrato e material orgânico disponível é o que permite a colonização do solo por inúmeros organismos, sendo que a exclusão ou eliminação de um ou outro grupo traz prejuízos a toda a cadeia trófica estabelecida (Moreira *et al.*, 2006).

A comunidade microbiana do solo tem papel essencial na ciclagem de nutrientes, e o estudo dos grupos funcionais busca elucidar os processos biogeoquímicos e sua relação com o desenvolvimento de plantas (Andrade, 2004; Leminth *et al.*, 2005; Thomas e Kevan, 1993). Os microrganismos possuem papel indispensável ao equilíbrio do ecossistema e constituem importantes bioindicadores de qualidade de solo devido à sua capacidade de fornecer informações precisas e imediatas referentes a pequenas alterações impostas ao ambiente (Dick e Tabatabai, 1993, Vargas e Scholles, 2000; Velasquez *et al.*, 2007).

Para Ferreira *et al.* (2006), os bioindicadores microbiológicos devem regular os processos ecológicos do solo e refletir as condições dos manejos atuais, sendo úteis para determinar os efeitos positivos e negativos sobre a qualidade do solo e a sustentabilidade das práticas agrícolas. Por isso, constituem uma importante ferramenta no esclarecimento dos possíveis efeitos das plantas transgênicas sobre o ambiente, estudo necessário para o estabelecimento de práticas menos impactantes à saúde ambiental e humana.

A exploração de ecossistemas, como a atividade agrícola, perturba o equilíbrio estabelecido ao longo do tempo ocasionando mudanças nos ciclos biogeoquímicos (Badiane *et al.*, 2001) e na cadeia trófica resultando no restabelecimento de um novo equilíbrio (Lemenith *et al.*, 2005).

O cultivo de variedades transgênicas pode selecionar a comunidade microbiana, favorecendo ou desfavorecendo o estabelecimento de grupos microbianos de acordo com sua capacidade de metabolizar ou tolerar determinado produto transgênico. Até o momento, os efeitos dos cultivos transgênicos na biodiversidade e na funcionalidade do solo ainda não foram devidamente avaliados ou compreendidos.

A transgenia constitui uma conquista das ciências aplicadas que traz situações jamais previstas pelo homem no que se refere ao mercado, ao meio ambiente e à saúde humana, sendo imprescindível o comprometimento da sociedade na elucidação das incertezas acerca desta tecnologia emergente.

### 3- OBJETIVO

Esse trabalho teve como objetivo principal avaliar, em casa de vegetação, a influência do algodão transgênico e a micorrização sobre alguns atributos os grupos funcionais de microrganismos do solo, em relação a sua variedade parental, Acalla 90.

Foram analisados e comparados os efeitos do algodão transgênico Bollgard I-DP90 e o Acalla 90, utilizando os seguintes atributos:

Microbiológicos:

- Carbono e Nitrogênio da Biomassa microbiana;
- Respiração Basal;
- Microrganismos celulolíticos, proteolíticos, amilolíticos, solubilizadores de fosfato, bactérias heterotróficas, fungos saprofitas, pseudomonas fluorescentes, fungos micorrízicos arbusculares (MA)
- População de protozoários do solo: flagelados e ciliados

Bioquímicos

- Atividade Enzimática: Celulase, Asparaginase, Desidrogenase, Fosfatase ácida e Urease.

Químicos

- pH

Planta

- Peso seco da parte aérea e raízes.
- Comprimento de raiz

## 4- MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação (25° C noite, 28° C dia, umidade relativa de 60%) no Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina.

### 4.1 Delineamento Experimental:

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, cinco tempos de avaliação (15, 45, 60, 90 e 120 dias) e cinco repetições que totalizam 100 parcelas experimentais. Estabeleceram-se os seguintes tratamentos:

- Algodão transgênico Bollgard DP 90 inoculado com fungos micorrízicos arbusculares FMA, (*Glomus clarum*)
- Algodão transgênico Bollgard DP 90 não-inoculado FMA
- Algodão convencional Acalla 90 inoculado FMA
- Algodão convencional Acalla 90 não-inoculado

O experimento foi conduzido por até 120 dias após a emergência das plântulas, em tempos determinados as plantas e o solo foram amostrados para as análises.

### 4.2 Solo e Condições de Crescimento da Planta:

O substrato utilizado foi obtido pela mistura de um solo arenoso (Neossolo Quartzarênico típico da região de São Jerônimo da Serra - PR) com areia de rio lavada. Na proporção de 1:1, esterilizado em autoclave por 1 h em vapor fluente, por três dias consecutivos. A análise do solo foi realizada no laboratório de solos do IAPAR e os resultados estão apresentados no quadro 1.

**Quadro 1-** Resultados da análise química para fins de fertilidade do substrato utilizado no experimento.

P	C	pH	Al	H + Al	Ca	Mg	K	SB	CTC	V	M
mg/dm <sup>3</sup>	g/dm <sup>3</sup>		-----cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> -----							----%---	
2	11,04	4,5	0,57	5,34	1,3	0,78	0,05	2,13	7,47	28,51	21,11

(P,K Mehlich; Ca, Mg, Al KCl M, pH CaCl<sub>2</sub> 0,01M).

Em cada vaso foi adicionado 2 quilogramas de solo esterilizado, e a comunidade microbiana foi restabelecida com 10 mL de extrato do solo original, passado por papel filtro para eliminar propágulos de fungos micorrízicos arbusculares.

Foram utilizadas sementes de algodão Boulgard DP 90 e a parental não transgênica, Acalla 90. Elas foram desinfetadas externamente com solução de hipoclorito a 2% por dois minutos e lavadas três vezes com água destilada estéril. Três sementes foram semeadas em cada vaso, mantendo-se apenas uma plântula após sete dias de emergência.

#### 4.3 Inóculo de Fungo Micorrízico Arbuscular:

A semeadura e a inoculação do fungo micorrízico foram realizadas no mesmo dia. O inóculo foi obtido de vasos de multiplicação em *Brachiaria decumbens* com cultura pura de *Glomus clarum*. Foram acrescentados 2 g de inóculo bruto (raiz colonizada, hifas e esporos) por vaso nos tratamentos micorrizados (Giovanetti e Mosse, 1980).

#### 4.4 Análises Microbiológicas:

Em cada época de avaliação, um grama de solo rizosférico de cada amostra foi diluído serialmente em 9 mL de salina estéril (0,85%) e alíquotas de 50 µL nas diluições 10<sup>-6</sup> para Bactérias Heterotróficas, 10<sup>-4</sup> para Actinomicetos, Pseudomonas, Proteolítico e Solubilizadores de Fosfato, 10<sup>-3</sup> para Amilolítico, Celulolítico e Fungos Saprofíticos foram inoculadas, em duplicatas, nos respectivos meios para crescimento de cada grupo funcional de microrganismos (Zuberer, 1994). As placas foram incubadas em BOD a 28 °C e as colônias foram contadas conforme o período necessário para o seu desenvolvimento (1, 3, 5 e 7 dias de

observação, dependendo do meio avaliado). Para as análises biológicas, foi utilizado solo úmido e os resultados expressos em escala logarítmica do número de unidades formadoras de colônia por grama de solo seco (log UFC/g).

#### 4.4.1 Carbono da Biomassa Microbiana

O carbono da biomassa microbiana foi determinado pelo método de fumigação-extração de Vance *et al.* (1987). Neste método, uma parte do solo foi fumigada com clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) e extraída com sulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) 0,5 M. A outra parte, não fumigada, constitui o controle. Preparou-se também uma amostra sem solo, denominada branco.

A fumigação consiste em expor solo úmido equivalente a 25 g de solo seco a 25 mL de clorofórmio livre de etanol em um dessecador forrado com papel de filtro umedecido, que foi submetido a vácuo no escuro por 24 horas. Após este período, evacua-se o vapor do clorofórmio com vácuo e entrada de ar por 6 vezes. Neste processo, as células foram lisadas, liberando seu conteúdo citoplasmático, cujo carbono orgânico foi então disponibilizado para análise.

Para a extração do carbono, o solo fumigado, o controle e o branco foram transferidos a frascos de extração, onde adicionou-se à solução extratora sulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) 0,5 M e agitados por 30 minutos. A suspensão obtida foi decantada e o sobrenadante, filtrado em papel filtro qualitativo nº. 42.

8 mL do extrato são transferidos a um tubo digestor e adicionados 3 mL de dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) 0,0667 M, 15 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e 4 gotas do indicador ferroína. A solução resultante possui coloração laranja. Nesta etapa, o dicromato oxida o carbono orgânico em meio ácido. Os tubos foram aquecidos em um bloco digestor para acelerar este processo. A solução obtida ao final do aquecimento, de coloração verde, foi então titulada com sulfato ferroso amoniacal ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ) 0,0333 M, passando para azul-claro e chegando ao ponto final vermelho-intenso. Pode-se, assim, quantificar o dicromato remanescente, ou seja, que não oxidou o carbono, o que por sua vez permite estimar a quantidade de carbono presente no extrato.

O carbono orgânico extraído de cada amostra foi determinado pela fórmula  $\text{CBM} = (\text{F} - \text{NF}) / \text{Kc}$ , em que  $\text{CBM}$  = carbono da biomassa microbiana;  $\text{F}$  = amostras fumigadas;  $\text{NF}$  = amostras não fumigadas;  $\text{Kc}$  = coeficiente de correção 0,33 (Vance et al.1987).

Assim, a biomassa microbiana de carbono foi estimada pela diferença entre os teores de carbono entre as amostras fumigadas e não-fumigadas, que correspondem à diferença dos teores de carbono encontrados em células microbianas intactas e em células cujo conteúdo citoplasmático foi extravasado. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g C.g}^{-1}$  de solo.

#### 4.4.2 Nitrogênio da Biomassa Microbiana

O nitrogênio da biomassa microbiana foi determinado pelo método de fumigação-extração de Vance et al. (1987).

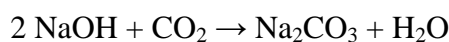
Obtém-se o extrato pelos mesmos procedimentos descritos para o carbono da biomassa microbiana. 20 mL deste extrato foram transferidos a tubos de digestão, aos quais foram adicionados 5 mL de solução digestora sulfúrica como catalisadores. Os tubos foram então aquecidos, gradativamente, a 350 °C em bloco digestor.

Após a digestão, realizou-se a destilação a vapor do nitrogênio, neutralizando a solução sulfúrica com hidróxido de sódio (NaOH) 18 N. Utilizou-se uma solução de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) para captar o íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). Em seguida, realizou-se uma titulação com ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) diluído.

Calcula-se o nitrogênio da biomassa microbiana com fator  $\text{Kn} = 0,68$  (Brookes *et al.* 1985). Assim como o carbono, a biomassa microbiana de nitrogênio foi estimada pela diferença entre os teores de nitrogênio das amostras fumigadas e não-fumigadas.

#### 4.4.3 Respirometria

Este dado foi determinado pelo método de Alef (1995). Onde 100 g de amostras de solo submetidas aos diferentes tratamentos foram acondicionados em frascos respirométricos, com umidade corrigida para 60% da capacidade máxima de retenção de água. Em cada frasco foi colocado um béquer com 10 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,25 M trocada periodicamente nas épocas de avaliação durante o período de incubação.



O carbonato resultante da reação do dióxido de carbono com o hidróxido de sódio foi precipitado com solução de cloreto de bário 4 M. O carbono liberado na forma de dióxido de carbono foi quantificado por titulação do hidróxido de sódio dos béqueres com solução

padronizada de ácido clorídrico 0,5 M com o indicador fenolftaleína. Na titulação, ocorre a passagem da coloração rósea à transparente. Isto permite quantificar o hidróxido de sódio remanescente, ou seja, que não reagiu com o dióxido de carbono.

A razão entre a respiração microbiana diária e a biomassa microbiana de carbono fornece a taxa de respiração específica, também denominada coeficiente metabólico ou  $qCO_2$ , expressa em  $mg CO_2 / g$  de biomassa microbiana (Anderson e Domsch, 1993).

#### **4.4.4 Protozoários**

Pesou-se 1 g de solo rizosférico das amostras e diluídos em 2 mL de água destilada estéril, onde uma alíquota de 1,8 ml de extrato de solo foi colocado em mini-poços até a diluição  $10^{-5}$ . Incubados por quatro dias em BOD a 28 °C no escuro. A leitura foi realizada observando-se a presença de ciliados e flagelos (Woomer, 1994).

#### **4.5 Colonização Micorrízica**

A colonização micorrízica foi determinada pelo método de Phillips e Hayman (1970). As raízes coletadas foram lavadas em água corrente e peneiradas. Em seguida, foram distribuídas sob grades, cobertas com hidróxido de potássio 10% e deixadas em vapor fluente na autoclave por 50 minutos. Após este tempo, o hidróxido de potássio foi removido e as raízes, lavadas três vezes em água, colocadas em ácido clorídrico 0,1 N, agitadas e novamente lavadas com água por três 3 vezes. As raízes foram então coradas com azul de tripan 0,05% e aquecidas vapor fluente por 10 minutos para estimar as taxas de colonização micorrízica pela presença ou pela ausência de estruturas micorrízicas como hifas, arbúsculos e vesículas ao longo das raízes. Utilizou-se a placa quadriculada para estimar o número de colonizações através da contagem de intersecções das raízes com as linhas da placa sob a lupa (100x). A porcentagem de colonização micorrízica foi estimada através do método de intersecções em grid-line (Giovanetti & Mosse, 1980).

#### **4.6 Biomassa Seca: Parte Aérea e Raízes**

No momento do desmonte dos vasos, foi feito um corte rente ao solo para a retirada da parte aérea e para a obtenção das raízes, retirou-se o solo. A parte aérea e as raízes foram acondicionadas em sacos de papel Kraft e levadas para a estufa a 65°C por 72 horas para a avaliação da produção de biomassa seca, determinada em uma balança digital de precisão.

#### **4.7 Comprimento de Raízes**

O comprimento de raízes foi medido logo após o desmonte. Aproximadamente, um grama da raiz de cada planta foi cortado e o comprimento estimado também pelo método de interseções em grid-line (Newman, 1966).

#### **4.8 Análises Químicas**

##### **4.8.1 Determinação do pH**

Dez quilogramas de solo seco ao ar foram transferidos a um frasco de extração, onde foram adicionados a 25 mL de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,01 M. Agitou-se a solução por 15 minutos e, após a sedimentação, realizou-se a leitura em potenciômetro segundo IAPAR (1992).

#### **4.9 Análises Bioquímicas**

##### **4.9.1 Fosfatase Ácida**

A análise foi realizada a partir do método de Tabatabai e Bremner( 1969). Neste método, adiciona-se 1 g de solo, em um tubo de ensaio, a 0,2 mL de tolueno, 4 mL de tampão universal modificado (MUB) com pH ajustado para 6,5 e 1 mL da solução de  $\rho$ -nitrofenil

fosfato de sódio 0,05 M. A mistura, agitada por alguns segundos, foi incubada a 37°C por 1 hora em tampão específico com pH 6,5.

Decorrido este tempo, paralisa-se a reação com a adição de 1 mL de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,5 M e 4 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M. A suspensão, filtrada em papel de filtro Whatman nº. 2, tem a intensidade de sua cor amarela medida em espectrofotômetro a 420 nm.

Para a curva de calibração, utilizou-se uma solução padrão de  $\rho$ -nitrofenol, com a obtenção de filtrados com 0, 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{g}$  de  $\rho$ -nitrofenol por tubo.

Para isto, dilui-se 1 mL da solução padrão em  $\text{H}_2\text{O}$  para volume final de 100 mL, das quais alíquotas de 0, 1, 2, 3, 4, e 5 mL foram transferidos a erlenmeyers, com ajuste para volume final de 5 mL com  $\text{H}_2\text{O}$ . As soluções obtidas foram então submetidas ao mesmo tratamento descrito para as outras amostras: a reação foi paralisada e a solução foi filtrada.

Os brancos foram necessários para determinar a cor não proveniente do  $\rho$ -nitrofenol liberado pela atividade da fosfatase ácida. Para os brancos, adicionou-se o  $\rho$ -nitrofenil fosfato de sódio somente após a adição de 1 mL de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,5 M e 4 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M, imediatamente antes da filtração.

#### 4.9.2 Celulase

A determinação desta enzima foi baseada no método de Schinner e Von Mersi (1990), fundamentada na quantificação de açúcares redutores liberados pelas amostras após a incubação com solução de carboximetil celulose sódico (CMC) para celulase por 24 h a 50°C.

Foram preparados 3 reagentes, denominados A, B e C. O reagente A consiste em uma mistura de 16 g de carbonato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) e 0,9 g de cianeto de potássio (KCN) com volume completado para 1000 ml com  $\text{H}_2\text{O}$ ; o reagente B, de 0,5 g de ferricianeto de potássio ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) com volume completado para 1000 mL com  $\text{H}_2\text{O}$ ; o reagente C, de uma mistura de 1,5 g de sulfato ferroso amoniacal ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ), 1 g de dodecil sulfato de sódio (ou lauril sulfato de sódio) ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}$ ) e 4,2 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) com volume completado para 1000 ml com  $\text{H}_2\text{O}$ .

Alicota de 10 g de solo, em frascos de destilação, foram adicionados a 15 mL de tampão acetato de sódio ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 2M, com pH ajustado para 5,5, e a 15 mL de solução de CMC 0,7% (w/v) para celulase. Os frascos foram agitados, incubados por 24 h a 50°C e novamente agitados após a incubação. 1,5 mL da suspensão foi centrifugadas a 9000

rpm por 10 minutos. O controle foi preparado pela adição de 15 mL da solução de CMC depois da incubação e imediatamente antes da centrifugação.

Dilui-se 1 mL do centrifugado em 20 mL de H<sub>2</sub>O, uma vez que altas concentrações de sais, íons amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), oxalato de magnésio (MgC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), ácido oxálico (H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), hidróxido ou fluorido interferem na determinação da glicose. 1 mL do diluído foi transferido a tubos de vidro, onde foram adicionados a 1 mL do reagente A e 1 mL do reagente B. Os tubos, fechados com parafilm, foram agitados e colocados em banho fervente a 100 °C por 15 minutos. Após este tempo, a solução foi resfriada em banho a 20 °C por 5 minutos, adicionada a 5 mL do reagente C, agitada e colocada para repousar a 20° C por 1 h para o desenvolvimento da coloração. Os açúcares redutores foram então quantificados em densidade óptica de 690 nm, comparados ao branco.

Para a curva de calibração, pipetou-se em tubos 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1 mL de solução de glicose monoidratada, diluída em 1 mL de H<sub>2</sub>O. Os açúcares redutores foram determinados pelos mesmos procedimentos descritos para as outras amostras.

A correção dos valores foi feita pela subtração do valor dos controles. O equivalente de glicose foi calculado por  $(C \cdot V \cdot f) / (sw \cdot dwt)$ , em que C é a concentração de glicose medida ( $\mu\text{g glicose.mL}^{-1}$  filtrado), V é o volume da suspensão teste, f é o fator de diluição (20 para solos cultiváveis), sw é o peso de solos úmidos utilizados e dwt é o peso de 1 g de solo úmido. O equivalente foi expressa em  $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{dwt } 24 \text{ h}^{-1}$ .

#### 4.9.3 Asparaginase

Foi realizada pelo método descrito por Frankenberger e Tabatabai (1991), que determina o nitrogênio mineralizado sob a forma de íon amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) pela L-asparaginase.

Neste método, a enzima foi submetida a valores ótimos de pH e de concentração dos substratos. 1 g de solo foi transferido a frascos de destilação, onde foi adicionado a 0,2 mL de tolueno, 9 mL de tampão tris hidroximetil aminometano (THAM) 0,1 M em pH 10. Após uma agitação rápida, adicionou-se 1 mL de solução L-asparagina 0,5 M, agitando novamente. As amostras foram então incubadas a 37 °C por 2 hs. Decorrido este tempo, adicionam-se 40 mL de solução de cloreto de potássio (KCl) e sulfato de prata (Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), misturando vigorosamente. Pipetou-se uma alíquota de 20 mL da suspensão em frascos de destilação a vapor e a quantidade liberada de amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) foi determinada pela destilação a vapor com 0,2 g de óxido de magnésio (MgO) por 4 minutos.

O mesmo procedimento foi realizado com os brancos, com exceção da adição de 1 mL da solução de L-asparagina 0,5 M após a adição de 40 mL da solução de cloreto de potássio (KCl) e sulfato de prata ( $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ).

#### 4.9.4 Urease

A metodologia adotada foi de Tabatabai e Bremner (1972), que estima a quantidade de amônia liberada com o uso de tolueno.

Neste método, a enzima foi submetida a valores ótimos de pH e de concentração dos substratos. Em frascos de destilação, 1 g de solo foi adicionado a 0,2 mL de tolueno e 9 mL de tampão tris hidroximetil aminometano (THAM) 0,05 M em pH 9, sendo agitados por alguns segundos. Adicionou-se 1 mL de solução de uréia 0,2 M, agitando-se novamente os frascos. Estes foram incubados a 37 °C por 2 horas. Adicionou-se então 40 mL de solução de cloreto de potássio e sulfato de prata. Pipetou-se uma alíquota de 20 mL da suspensão em frascos de destilação a vapor e determinou-se a quantidade de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) liberada pela destilação a vapor com 0,2 g de óxido de magnésio (MgO) por 4 minutos. Os brancos foram preparados do mesmo modo, porém pela adição de 1 mL da solução de uréia 0,5 M após a adição de 40 mL da solução de cloreto de potássio e sulfato de prata.

#### 4.9.5 Desidrogenase

A atividade da desidrogenase foi determinada pelo método de Casida *et al.* (1964), baseado na extração com metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) e na determinação colorimétrica de trifetil formazan (TPF) produzido através da redução de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) em solos.

Tubos de ensaio com 5 g de solo e 5 mL da solução aquosa de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 1% ou 1,5 % foram incubados a 37 °C por 24 horas. Adicionou-se 10 mL de metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), misturando a solução por 1 minuto. Após a decantação, o sobrenadante foi centrifugado a 3400 rpm por 10 minutos. A intensidade da cor avermelhada foi determinada em espectrofotômetro a 485 nm. A quantidade de trifetil formazan (TPF) produzida foi calculada com base a curva de calibração.

Para a curva de calibração, 10 mL de uma solução padrão de trifetil formazan (TPF) foram diluídos em  $\text{H}_2\text{O}$ , com volume final de 100 mL.

Pipetou-se alíquotas de 5, 10, 15, 20 mL do diluído em frascos volumétricos, completando o volume de 100 mL com metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), misturando vigorosamente. A intensidade da cor avermelhada de TPF foi quantificada como descrito para as amostras.

#### **4.10 Análise Estatística**

O conjunto dos dados microbiológicos, químicos e bioquímicos foi submetido à análise de variância e comparação de medidas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Utilizando-se o software estatístico Sisvar (versão 4.6, Build 61, Copyright Daniel Furtado Ferreira).

## 5--RESULTADOS

### 5.1 Atividade Enzimática

Inicialmente, 15 dias pós-germinação, a variedade parental não geneticamente modificada (Non-GMP) demonstrou aumento da atividade da enzima desidrogenase no solo enquanto que as plantas geneticamente modificadas (GMP) evidenciaram a estimulação da atividade de asparaginase e celulase. Já a interação entre plantas geneticamente modificadas e micorrizas arbusculares (PGM\*MA) estimulou a asparaginase e a desidrogenase (Tabela 1).

Com 45 dias além da permanência da condição estimulatória da celulase, pelas plantas GMP, observou-se o aumento da atividade da fosfatase ácida. Constataram-se também diferenças na atividade das enzimas urease e asparaginase no solo com plantas Non-GMP. Em contrapartida, a integração apenas apresentou efeito significativo para a urease (Tabela 2).

No solo com plantas convencionais, os valores para desidrogenase foram significativos com 60 dias, bem como a continuação da estimulação da asparaginase, enquanto que no solo com plantas GMP houve a estimulação da fosfatase ácida, urease e celulase. Enquanto a integração mostrou diferenças para a asparaginase, fosfatase ácida e celulase (Tabela 3).

Aos 90 dias, o solo com a cultura convencional apresentou maiores valores para urease, ao passo que a presença de plantas GMP estimulou a atividade de asparaginase e desidrogenase. As mesmas enzimas foram estimuladas na PGM\*MA sendo acrescida da atividade da fosfatase ácida (Tabela 4).

Com 120 dias, os valores foram significativos para asparaginase, desidrogenase, fosfatase ácida e celulase apenas no solo com a variedade transgênica. A integração PGM\*MA foi significativa para todas as cinco enzimas, exceto a desidrogenase (Tabela 5).

A micorrização demonstrou diferenças ao longo dos 120 dias na grande maioria das enzimas analisadas. Sendo evidenciados os maiores valores nas plantas não micorrizadas, com exceção da atividade da urease, com 90 dias (Tabela 4), e a asparaginase e fosfatase ácida, com 120 dias (Tabela 5), que foram estimuladas nos vasos micorrizados.

## 5.2 Grupos Funcionais de Microrganismos do solo e pH

Com 15 dias, as plântulas não geneticamente modificadas apresentaram maior taxa de crescimento estimulando a comunidades de actinomicetos (Ac), celulolíticos (Ce), amilolíticos (Am) e proteolíticos (Pr), o mesmo efeito foi evidenciado sobre os valores de pH em todos os cinco tempos analisados. A inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (MA) estimulou a população de *Pseudomona fluorescens* (Fp), enquanto a interação PGM\*MA influenciaram o pH, Fp, Ac e Ce (Tabela 6).

Com 45 dias, as plantas não transgênicas continuaram a estimular as mesmas populações do tempo anterior, com exceção dos microrganismos amilolíticos. Enquanto que as plantas GMP começaram a estimular determinados grupos microbianos; constatou-se o aumento da quantidade de fungos totais (F) e dos protozoários ciliados (Cil). No solo sem micorrização, as comunidades de F, Ac e Am apresentaram significativas alterações. Já a interação PGM\*MA estimulou os grupos funcionais de Fp, Ac, Pr, Cil e dos protozoários flagelados (Fla) assim como o pH. (Tabela 7).

Com 60 dias, as plantas non-GMP proporcionaram o crescimento da comunidade de amilolíticos, cuja ocorrência voltou a ser significativa junto aos actinomicetos, celulolíticos e proteolíticos. Ao passo que as GMP somente estimularam os protozoários flagelados. No solo sem AM, a condição estimulatória aos actinomicetos permaneceu e estendeu sobre a comunidade de Pr, enquanto no solo inoculado com AM constatou-se o aumento de bactérias heterotróficas. A interação PGM\*MA estimulou os F, Ac, Ce, Am, Cil e Fla (Tabela 8).

Com 90 dias, a frequência dos grupos estimulados no tempo anterior permaneceu e ampliou sobre os protozoários ciliados. Enquanto que nas plantas GMP, foi observado a retomada da estimulação de alguns grupos funcionais, como os solubilizadores de fosfato e, por conseguinte, os protozoários flagelados. O solo sem AM apresentou valores significativos apenas para solubilizadores de fosfato (PS) em contrapartida ao solo com AM que favoreceu a comunidade de protozoários ciliados. A interação apresentou valores significativos para o pH, F, PS, Ac, Ce e Am (Tabelas 9).

Os resultados obtidos com 120 dias não foram significativos para a maioria dos bioindicadores quando contraposto à cultura transgênica e a parental. No entanto, observa-se um relativo aumento nos valores de UFC no solo com plantas GMP, com alterações significativas apenas para os protozoários ciliados e flagelados. Ao longo dos cinco tempos de avaliação, a comunidade de bactérias heterotróficas e de pseudomonas fluorescente não sofreu

alterações referentes às plantas GMP. Tornou-se evidente o aumento dos flagelados, no solo AM, e dos fungos totais no solo não AM (Tabela 10).

A interação entre plantas geneticamente modificadas e micorrizas arbusculares influenciou a maioria dos grupos funcionais ao longo dos cinco tempos analisados, constatando-se um efeito deletério sobre a comunidade de bactérias heterotróficas ao decorrer desse tempo.

O algodão transgênico influenciou significativamente o pH em todos os tempos, sendo constatados os maiores valores nas plantas parentais não GMP. Por outro lado, para a mesma variável, a presença dos fungos MA não revelou diferença significativa em nenhum dos cinco tempos. Enquanto a interação PGM\*MA foi significativa na maioria dos tempos amostrais, tendo como única exceção a análise com 60 dias (Tabela 8).

### **5.3 Biomassa Microbiana, $qCO_2$ , Respirimetria e relação C/N**

Nos cinco tempos de avaliação, a presença de plantas GMP, a colonização micorrízica e a interação PGM\*MA não influenciaram a taxa de desprendimento de  $CO_2$  e os teores de C e de N da biomassa microbiana, de forma que os tratamentos apresentaram valores similares de  $qCO_2$  e relação C/N.

### **5.4 Colonização Micorrízica**

A análise de variância da colonização micorrízica no algodão reportou diferença ( $p < 0,01$ ) entre os solos com plantas GMP e convencionais com 90 dias. Nesta fase, o solo com plantas não GMP apresentaram os maiores níveis de colonização (Figura 1), bem como o florescimento de mais plantas em comparação ao solo com o algodão transgênico. Os níveis de colonização micorrízica foram considerados altos nos dois tratamentos. A presença da planta transgênica não afetou o estabelecimento das relações simbióticas entre a planta e o fungo.

### **5.5 Crescimento da Planta**

O crescimento das plantas foi influenciado pela inoculação do MA, tanto na variedade parental quanto na GMP, que apresentaram maior crescimento quando comparadas às plantas não micorrizadas. A colonização micorrízica apresentou efeito tanto sobre o peso seco da parte aérea com 15, 60 e 120 dias (Figura 2) quanto no peso seco da raiz com 15, 60, 90 e 120 dias (Figura 3), com maiores valores para o solo com plantas micorrizadas. O comprimento específico da raiz por planta foi maior nas plantas micorrizadas durante todos os tempos de avaliação (Figura 4).

## 6- DISCUSSÃO

### 6.1 Atividade Enzimática

A desidrogenase, enzima intracelular responsável pela transferência de energia através da cadeia transportadora de elétrons (Bastida et al., 2006), reflete a atividade oxidativa, constituindo um indicador da atividade microbiana do solo (Nannipieri et al., 1990). Aos 15 dias, houve o aumento da atividade desta enzima no solo com a variedade parental não GMP, o que condiz com os resultados encontrados para os grupos funcionais, enquanto no solo com plantas GMP constatou-se a estimulação da atividade de asparaginase e celulase. A celulase é uma enzima relacionada ao ciclo do C que hidrolisa a celulose fornecendo energia e C aos organismos do solo. Diferentes tipos de solo podem apresentar diferentes taxas de atividade celulásica, que depende de fatores como a qualidade do substrato sobre o qual a enzima atua (Doyle et al., 2006). Já a asparaginase atua no ciclo do N, sendo responsável pela mineralização do N orgânico, disponibilizando-o para plantas e microrganismos na forma de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). Além da assimilação por organismos, o amônio também pode ser adsorvido por minerais de argila ou oxidado a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) no processo de nitrificação (Victoria et al., 1992).

Com 45 dias, além da continuação da estimulação da celulase, observou-se o aumento da atividade da fosfatase ácida, o que pode ser atribuído ao predomínio da ação desta enzima em solos ácidos como o utilizado neste trabalho (Juma and Tabatabai, 1978). A fosfatase ácida é relacionada ao ciclo do P, hidrolisando formas orgânicas e disponibilizando formas minerais de P para plantas e microrganismos (Speir and Ross, 1978; Tabatabai, 1994), podendo ser produzida tanto por microrganismos quanto por plantas. Quando liberada pelas plantas é um importante catalisador na hidrólise das formas orgânicas de fósforo (Richardson et al., 2005). A celulase é uma enzima secretada principalmente por fungos (Andersson et al., 2004), o que pode estar relacionado ao aumento dos fungos totais verificado neste tempo. Constataram-se também diferenças na atividade das enzimas urease e asparaginase no solo com plantas não GMP, devido provavelmente ao crescimento vegetal, que demanda a translocação de mais N. No solo com plantas convencionais, os valores para desidrogenase foram significativos com 60 dias, bem como a continuação da estimulação da asparaginase, enquanto que no solo com plantas GMP houve a estimulação da fosfatase ácida, urease e celulase.

Aos 90 dias, o solo com a cultura convencional apresentou maiores valores para urease, ao passo que a presença de plantas GMP estimulou a atividade de asparaginase e desidrogenase. Aos 120 dias, os valores foram significativos para asparaginase, desidrogenase, fosfatase ácida e celulase apenas no solo com a variedade transgênica.

A micorrização demonstrou diferenças ao longo dos 120 dias na grande maioria das enzimas analisadas. Sendo evidenciados os maiores valores nas plantas não micorrizadas, com exceção da atividade da urease, no quarto tempo, e a asparaginase e fosfatase ácida, no quinto tempo, que foram estimuladas nos vasos micorrizados.

A interação PGM\*MA se revelou significativa para pelo menos uma das cinco enzimas analisadas ao longo dos 120 dias, nos primeiros 15 dias para a asparaginase e desidrogenase, apenas para urease com 45 dias; asparaginase, fosfatase ácida, e celulase com 60 dias; asparaginase, desidrogenase e fosfatase ácida com 90 dias; e todas exceto a desidrogenase com 120 dias.

## **6.2 Grupos Funcionais de Microrganismos do solo e pH**

Inicialmente, a cultura transgênica germinou mais rapidamente que as plântulas não geneticamente modificadas. No entanto, estas apresentaram maior taxa de crescimento, estimulando a comunidades de actinomicetos, celulolíticos, amilolíticos e proteolíticos 15 dias após a germinação. Em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes, como o solo utilizado como substrato, esses microrganismos degradam substâncias normalmente não decompostas por outros grupos. Outro fator que pode ter influenciado a comunidade microbiana foi o pH, moderadamente neutro do solo. Os menores valores de pH observados no solo das plantas geneticamente modificadas apresentaram efeito negativo sobre o desenvolvimento dos grupos funcionais.

Com 45 dias, as plantas GMP começaram a estimular determinados grupos microbianos. Constatou-se o aumento da quantidade de fungos totais devido à liberação de exsudatos pelas plantas GMP associada à moderada diminuição do pH do solo. Outro efeito observado diz respeito aos protozoários ciliados, cuja comunidade foi estimulada em presença das plantas transgênicas. Estas podem apresentar diferentes exsudatos radiculares e, conseqüentemente, ter diferentes efeitos sobre os organismos do solo e os processos por eles mediados em comparação às plantas convencionais (Nodari and Guerra, 2001; Wolfenbarger and Phifer, 2000; Dunfield and Germida 2004). Em contrapartida, Siqueira et al. (2004)

relatam que alterações causadas por cultivos transgênicos na biologia do solo não diferem em qualidade e magnitude daquelas causadas por outras ações antrópicas e variações naturais do solo.

Ainda com 45 dias, as plantas não transgênicas continuaram a estimular as mesmas populações do tempo anterior, com exceção dos microrganismos amilolíticos cuja menor frequência sugere a maior sensibilidade destes à acidificação do solo em relação aos demais grupos. Wu (2000) e Flores (2005) observaram que as plantas GMP são mais suscetíveis a doenças quando comparadas à sua variedade parental, o que pôde ser observado a partir do terceiro até meados do quarto tempo, quando a cotonicultura sofreu com a infestação de pulgão branco. Tal episódio pode ter repercutido sobre as análises com 60 dias, no qual se observou efeito deletério sobre os grupos de microrganismos, com exceção do de protozoários flagelados, além da acidificação do solo que corrobora os resultados obtidos.

Com 60 dias, as plantas não GMP levaram ao aumento do pH, aproximando-o da neutralidade, o que levou ao crescimento da comunidade de amilolíticos, cuja ocorrência voltou a ser significativa junto aos actinomicetos, celulolíticos e proteolíticos. O pH desse solo atingiu a neutralidade com 90 dias, favorecendo a frequência dos grupos estimulados no tempo anterior. Já em relação às plantas GMP, a recuperação destas após a infestação de pulgões brancos se deu juntamente com o aumento do pH do solo, o que contribuiu para retomada da estimulação de alguns grupos funcionais, como os solubilizadores de fosfato e, por conseguinte, os protozoários flagelados. Outro fator a ser considerado é o início da floração, fase em que há maior demanda de P e, conseqüentemente, maior exsudação radicular que favorece o crescimento microbiano.

Os resultados obtidos com 120 dias não foram significativos para a maioria dos bioindicadores quando contraposto à cultura transgênica e a parental, mesmo com a queda no pH observada na última. Tal alteração não foi suficiente para inibir o crescimento microbiano, mantendo-se o número de UFC devido à resiliência do ambiente, no qual se dá o equilíbrio entre a planta, a microbiota e os constituintes abióticos do solo. No entanto, observa-se um relativo aumento nos valores de UFC no solo com plantas GMP, com alterações significativas apenas para os protozoários ciliados e flagelados. Ao longo dos 120 dias, a comunidade de bactérias heterotróficas e de pseudomonas fluorescente (Fp) não sofreu alterações referentes às plantas GMP.

A inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (MA) no momento da semeadura estimulou a população de Fp com 15 dias (Tabela 6), uma vez que as Fp dispõem proteção às raízes contra fungos patogênicos por meio da produção de substâncias antifúngicas,

conferindo resistência sistêmica à planta (Haas *et al.* 2005). No solo sem micorrização, a comunidade de bactérias heterotróficas, actinomicetos e amilolíticos apresentaram alterações somente com 45 dias, fato atribuído à menor capacidade de assimilação de nutrientes pela planta, uma vez que, não usufruía do MA como um facilitador na busca por nutrientes. A estimulação de actinomicetos e proteolíticos nesse solo continuou com 60 dias, enquanto no solo inoculado com AM constatou-se o aumento de bactérias heterotróficas.

Com 90 dias, o solo sem AM apresentou valores significativos apenas para solubilizadores de fosfato, devido à maior carência nutricional das plantas decorrente do florescimento. No solo com AM, a alta ocorrência de bactérias provavelmente estimulou a comunidade de protozoários ciliados. A permanência dessa condição, com 120 dias, levou ao aumento dos flagelados e dos fungos totais. O aumento do número de UFC da microbiota do solo reflete o estabelecimento gradual dos diferentes grupos em seus nichos ecológicos particulares.

A interação entre plantas geneticamente modificadas e micorrizas arbusculares (PGM\*MA) influenciou a maioria dos grupos funcionais ao longo dos cinco tempos analisados. Constata-se o favorecimento da comunidade de actinomicetos no decorrer dos 120 dias, em contraste ao grupo de bactérias heterotróficas, em que se observou efeito prejudicial.

O algodão transgênico influenciou significativamente o pH em todos os tempos, sendo constatados os maiores valores nas plantas parentais não GMP. Por outro lado, para a mesma variável, a presença dos fungos MA não revelou diferença significativa em nenhum dos cinco tempos. A interação PGM\*MA foi observada ao longo de todo o experimento, embora não tenha se mostrado significativa com 60 dias.

### **6.3 Biomassa Microbiana, $qCO_2$ , Respirimetria e relação C/N**

Nos cinco tempos de avaliação, a presença de plantas GMP, a colonização micorrízica e a interação PGM\*MA não influenciaram a taxa de desprendimento de  $CO_2$  e os teores de C e de N da biomassa microbiana, de forma que os tratamentos apresentaram valores similares de  $qCO_2$  e relação C/N. O mesmo resultado sobre a biomassa microbiana foi observado em outros estudos, que indicam o efeito não-deletério das proteínas Cry liberadas por plantas Bt sobre a microbiota (Donegan *et al.*, 1995; Santos e Stotzky, 2001b), acarretando em alterações

transitórias na comunidade microbiana (Bruseti et al., 2004; Blackwood e Buyer, 2004; Griffiths et al., 2006).

#### **6.4 Colonização Micorrízica**

A análise de variância da colonização micorrízica no algodão reportou diferença ( $p < 0,01$ ) entre os solos com plantas GMP e convencionais com 90 dias. Nesta fase, o solo com plantas não GMP apresentaram os maiores níveis de colonização, bem como o florescimento de mais plantas em comparação ao solo com o algodão transgênico. Assim, é possível que a variedade parental se beneficie mais das interações micorrízicas, o que pode estar relacionado à sua maior rusticidade, que a torna mais dependente de associações microbianas, além do florescimento que pode ter aumentado taxa de micorrização devido à maior exigência metabólica da planta nesta fase.

Os níveis de colonização micorrízica foram considerados altos nos dois tratamentos, patamar alcançado em situações de grande carência de fósforo (P), como nas condições em que o experimento foi conduzido, em que a planta busca estabelecer a simbiose micorrízica na tentativa de maior obtenção deste nutriente. Sabe-se que o teor de P no solo é o principal fator que regula o nível de colonização micorrízica, a qual diminui à medida que se aumenta a disponibilidade de P às plantas (Nogueira & Cardoso, 2000). A presença da planta transgênica não afetou o estabelecimento das relações simbióticas entre a planta e o fungo. Em contrapartida, Turrini et al. (2004) constataram que os exsudatos das raízes de milho Bt (evento 176) reduziram o crescimento de hifas de fungos AM em comparação com os milhos Bt 11, um híbrido, e do milho convencional, inibindo a micorrização.

#### **6.5 Crescimento da Planta**

O crescimento das plantas foi influenciado pela inoculação do MA, tanto na variedade parental quanto na GMP, que apresentaram maior crescimento quando comparadas às plantas não micorrizadas. A colonização micorrízica apresentou efeito tanto sobre o peso seco da parte aérea com 15, 60 e 120 dias quanto no peso seco da raiz com 15, 60, 90 e 120 dias, com maiores valores para o solo com plantas micorrizadas. O efeito benéfico da associação com AM é evidente, pois, além de promover maior absorção de nutrientes como o P e o N, há

outros fatores envolvidos como a absorção de micronutrientes (Marschner and Dell, 1994), bem como o aumento da atividade fotossintética, resultando em maior produção de biomassa. O comprimento específico da raiz por planta foi maior nas plantas micorrizadas durante todos os tempos de avaliação.

## 7-CONCLUSÃO

Este trabalho vem ressaltar a necessidade de se estudar os possíveis impactos dessa tecnologia a partir da interação entre os diversos microrganismos que compõem a biologia do solo e a planta transgênica. Isto porque, estudos pontuais, como a respiração microbiana, apesar de importantes, normalmente não são suficientes para captar os eventuais desarranjos na vida do solo. Uma vez que, a avaliação dos impactos sobre os diferentes grupos que compõem a biota do solo, os efeitos sobre os processos biogeoquímicos em que estão envolvidos, atributos físicos e químicos indicam comprometimentos à fertilidade, sustentabilidade do solo e conseqüentemente ao desenvolvimento das plantas. As alterações pontuais sobre a comunidade microbiana estão relacionadas principalmente ao tipo e qualidade de solo sendo, em geral, efeitos transitórios e não relacionado com a presença das proteínas Cry.

## BIBLIOGRAFIA

ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K. e NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p. 214-219.

ANDERSON, T. H., DOMSCH, K. H. The metabolic quotient from CO<sub>2</sub> (qCO<sub>2</sub>) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Brunswick, v. 25, n. 3, p. 393-395, 1993.

ANDERSSON, M.; KJØLLER, A.; STRUWE, S. Microbial enzyme activities in leaf litter, humus and mineral soil layers of European forests. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, p.1527-1537, 2004

ANDRADE, G. Role of functional groups of microorganisms on the rhizosphere microcosm dynamics. In: VARMA A.; ABBOTT L.; WERNER, D.; HAMPP, R. (Eds.), **Plant Surface Microbiology**. Springer-Verlag, Berlin, p.51-69, 2004.

ANDRADE, G.; NOGUEIRA, M. A. Bioindicadores para uma análise de risco ambiental. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 34, n. 1, p. 11-19, 2005.

BADIANE, N.N.Y.; CHOTTE, J.L.; PATE, E.; MASSE, D.; ROULAND, C. Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. **Applied Soil Ecology**, v.18, p.229–238, 2001.

BASTIDA, F.; MORENO, J.L.; HERNÁNDEZ. T.; GARCÍA, C. Microbiological activity in a soil 15 years after its devegetation. **Soil Biology and Biochemistry**. v.38, p.2503-2507, 2006

BLACKWOOD, C.B., BUYER, J.S. Soil microbial communities associated with Bt and non-Bt corn in three soils. **Journal of Environmental Quality** v 33,p 832–836, 2004.

BRAAK, C.J.F.; SMILAUER, P. CANOCO Reference Manual and User's Guide to Canoco for Windows: Software for Canonical Community Ordination (version 4). Microcomputer Power (Ithaca, NY, USA), 352 p, 1998.

BROOKES, P. C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G.; JENKINSON, D. S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.17, p.837-842, 1985.

BRUSETTI, L., FRANZIA, P., BERTOLINI, C., PAGLIUCA, A., BORIN, S., SORLINI, S., ABRUZZESE, A., SACCHI, G., VITI, C., GIOVANNETTI, L., GIUNTINI, E., BAZZICALUPA, M., DAFFONCHIO, D. Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (*Zea mays*) and its non-transgenic counterpart. **Plant and Soil** . v.266, p 11–21, 2004.

BUSOLI, A.C. Práticas culturais, reguladores de crescimento, controle químico e feromônios no manejo integrado de pragas do algodoeiro. In: DEGRANDE, P.E. Bicudo do algodoeiro: manejo integrado. Dourados: **UFMS/EMBRAPA**. p.29-52, 1991.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P.C.O. Determinação de nitrogênio total em solo. In: RAIJ, B. V.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico, p. 270-276, 2001.

CASIDA, L. E.; KLEIN, D. A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, v. 98, p. 371-376, 1964.

CASTRO, O.M.; PRADO, H.; SEVERO, A.C.R.; CARDOSO, E.J.B.N. Avaliação da atividade de microrganismos do solo em diferentes sistemas de manejo de soja. *Sci. agric.*, Piracicaba, v. 50, n.2, p. 212-219, 1993.

CORTET, J., FOGGO, A., HACKETT, C.A., KROGH, P.H. Soil microbial and faunal community responses to Bt maize and insecticide in two soils. **Journal of Environmental Quality** v 35, p 734–741 2006.

COSTA, S.R.; BUENO, M.G. A saga do algodão: das primeiras lavouras a ação na OMC. Rio de Janeiro: **Inight English**, 144p, 2004.

CRUZ, V. R.; PASSOS, S. M. G. Algodão (*Gossypium hirsutum*). Disponível em: <[http://www.agrocasa.com.br/Arquivos\\_culturas/Culturas/ALGOD%C30.HTM](http://www.agrocasa.com.br/Arquivos_culturas/Culturas/ALGOD%C30.HTM)>. Acesso em: 12 outubro de 2008.

DEVARE, M., LONDON, R.L.M., THIES, J.E.. Neither transgenic Bt maize (MON863) nor tefluthrin insecticide adversely affect soil microbial activity or biomass: A 3-year field analysis. *Soil Biology & Biochemistry* v 39, p 2038–2047, 2007.

DEVARE, M.H., JONES, C.M., THIES, J.E. Effect of Cry3Bb transgenic corn and tefluthrin on the soil microbial community. **Journal of Environmental Quality** v 33, p 837–843, 2004.

DICK, W.A., TABATABAI, M.A. Significance and potential uses of soil enzymes. In: Blain, F.J., (Ed.), **Soil Microbial Ecology Application in Agricultural and Environmental Management**, Marcel Dekker, New York, p.95–127, 1993.

DOYLE, J.; PAVEL, R.; BARNES, G.; STEINBERGER, Y. Cellulase dynamics in a desert soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.371-376, 2006.

DONEGAN, K.K., PALM, C.J., FIELAND, V.J., PORTEOUS, L.A., GANIO, L.M., SCHALLER, D.L., BUCAO, L.Q., SEIDLER, R.J. Changes in levels, species, and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. **Applied Soil Ecology** v 2, p 111–124, 1995.

DUNFIELD, K.E.; GERMIDA, J.J. Impact of GM Crops on microbial Biodiversity. **Journal of Environ.Quality.**, v. 33, p.806 – 815, 2004.

EL FEKY, S. Survey of agriculture and technology: growing pains. **The Economist**, London, p. 1-16, 25 Mar. 2000.

FEDERICI B. A. Transgenic Bt crops and resistance: Broadscale use of pest-killing plants to be true test. **California Agriculture** v.52(6), p.14-20, 1998.

FEITELSEN, J. S.; PAYNE, J & KIM, L. *Bacillus thuringiensis* insects and beyond. **Biotechnology**, v.10, p. 271-275, 1994.

FERNANDES, S.A.P.; BETTIOL, W. Efeito do lodo de esgoto na microbiota do solo. Documento da Embrapa - CNPMA, Jaguariúna, SP. 2003.

FERREIRA, A P; CUNHA, C L N; WERMELINGER, E D; SOUZA, M B; LENZI, M F; MESQUITA, C M & JORGE, L C. Impacto de pesticidas na atividade microbiana do solo e sobre a saúde dos agricultores. **Revista Baiana de Saúde Pública**. v.30 n.2, p.309-321, 2006.

FONTES, E. M. G.; PIRES, C. S. S.; SUJII, E. R. (Ed.). Painel de especialistas sobre impactos potenciais ao meio ambiente do algodão geneticamente modificado resistente a insetos. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. p 52 (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 81), 2002a.

FORTES NETO, P. **Degradação de biossólido incorporado ao solo avaliada através de medidas microbiológicas**. Piracicaba. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. 113p. 2000.

FLORES, S., SAXENA, D., STOTZKY, G., Transgenic Bt plants decompose less in soil than non-Bt plants. **Soil Biology & Biochemistry** v 37,p 1073–1082, 2005.

FRANKENBERGER, W. T.; TABATABAI, M. A. L-Asparaginase activity of soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 11, p. 6–12, 1991.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; DE BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. Entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ. 920 p, 2002.

GIOVANETTI, M.; MOSSE, B. Evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular micorrhizal infections in roots. **New Phytologist**, v. 84, p. 489-500, 1980.

GRIFFITHS, B.S., CAUL, S., THOMPSON, J., BIRCH, A.N.E., SCRIMGEOUR, C., GUIMARÃES, J.A. Parecer nº 0513/2005 – Algodão BT. Disponível em <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/1260.html>>. Acesso em: 15 outubro de 2008.

HAAS D, DEFAGO G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews in Microbiology** v 3(4) p 307-19, 2005.

HAMILTON, K. A. et al. Bollgard II Cotton: Compositional analysis and feeding studies of cottonseed from insect-protect cotton producing the Cry1Ac and Cry2Ab2 proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.6969-6976, 2004.

HEAD.G.; SURBER J.B.; WATSON J.A.; MARTIN J.W.; DUAN J.J. No Detection of Cry1Ac Protein in Soil After Multiple Years of Transgenic Bt Cotton (Bollgard) Use. **Environment Entomology** 31(1): 30Ð36 , 2002.

HERRERA-ESTRELLA, L. R. Genetically modified crops and developing countries. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 124, p. 923-925, 2000.

HUANG, J.; ROZELLE, S.; PRAY, C.; WANG, Q. Plant biotechnology in China. **Science**, Washington, DC, v. 295, p. 674-676, 2002.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **Manual de análise química do solo e controle de qualidade**. Londrina: IAPAR, 1992. 40p.

JAMES R R, MILLER J C AND LIGHTHART B. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* affects a beneficial insect, the Cinnabar moth (Lepidoptera, Arctiidae). **Journal Econ. Entomology**. 86, p.334–339, 1993.

JUMA, N.G.; TABATABAI, M.A. Distribution of phosphomonoesterases in soils. **Soil Science Society of America Journal**, 126:101-108, 1978.

LEMENITH, M., KARLTUN, E., OLSSON, M. Assessing soil chemical and physical property responses to deforestation and subsequent cultivation in smallholders farming system in Ethiopia. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.105, p.373–386, 2005.

MANN, C. C. Crop scientists seek a new revolution. **Science**, Washington, DC, v.283, p. 310-314, 1999.

MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil Science**, 159:89-102, 1994.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: Editora UFLA, 626 p, 2002.

NANNIPIERI, P., GREGOS, S., CECCANTI, B., Ecological significance of the biological activity in soil. In: Bollag, J.M., Stotzy, G. (Eds.), **Soil Biochemistry**, Marcel Dekker, New York, USA, v.6, p.293–355, 1990.

NEWMAN, E.I. A method for estimating the total length of root in a sample. **Journal Applied Ecology**, v.3, 139-145p, 1996.

NOGUEIRA, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Colonização radicular e produção de micélio externo por duas espécies de fungos micorrízicos arbusculares em soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.329-338, 2000.

PAIVA, R.M; SCHATTAN, S; FREITAS, C.F.T. Setor agrícola no Brasil: comportamento econômico, problemas e possibilidades. 2 Ed. Rio de Janeiro: Forense. Universidade de São Paulo: editora da Universidade de São Paulo, 480p, 1976.

PALMER, R. G.; GAL, J.; SUN, H.; BURTON, W. Production and evaluation of hybrid soybean. **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 21, p. 264–307, 2001.

PAOLETTI, M. G. Impact of genetically modified organisms. Italy, 2001. 14 p. Disponível em: <<http://www.els.net/elssamplematerial/html>>. Acesso em: 16 nov. 2008.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved producers for clearing roots and vesiculararbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **British Mycological Society**, v. 55, n. 1, p. 158-160, 1970.

SANTOS, R. F.; SANTOS, J. W. Crise na cadeia produtiva do algodão. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 1, n. 1, p. 25-36, 1997.

SAXENA, D., STOTZKY, G., 2001b. *Bacillus thuringiensis* (Bt) 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** v 33,p 1225–1230, 2001b.

SCHINNER, F.; MERSI, W. Xylanase, CM-cellulase and invertase activity in soil: an improved method. **Soil Biology and Biochemistry**, Brunswick, v. 22, p. 511-515, 1990.

SIQUEIRA, J.O.; TRANNIN, I.C.B.; RAMALHO, M.A.P.; FONTES, E.M.G. Interferences in the agrisystem and environmental risks of herbicide tolerant and insect protected transgenic crops. **Cadernos de Ciência and Tecnologia**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 11-81, 2004.

SPEIR, T. W.; ROSS, D. J. Soil phosphatase and sulphatase. In: BURNES, R.G. (ed). **Soil Enzymes**. New York. Academic Press, p: 197-250, 1978.

STOTZKY, G. Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from Tabatabai, M. A.; Bremner, J. M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, Brunswick, v. 1, p. 301-307, 1969.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, Brunswick, v. 1, p. 301-307, 1969.

TABATABAI, M. Soil Enzymes. In: SSSA. *Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties* (Book series No. 5), v.775- p. 833, 1994.

TABATABAI, M.A., BREMNER, J.M. Assay of urease activity in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.4, p.479–487, 1972.

THE ROYAL SOCIETY OF LONDON. Genetically modified plants for food use and human health: an update. London, 2002. 19 p. Policy document 4/02.

THIOULOUSE, J., CHESSEL, D., DOLEDEC, S., OLIVIER, J. M. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. **Statistics and Computing**, v.7, p.75–83, 1997.

THOMAS, V.G.; KEVAN, P.G. Basic principles of agroecology and sustainable agriculture. **Journal of Agricultural Environment and Ethnology**, v.5, p.1-18, 1993.

TILMAN, D.; FARGIONE, J.; WOLFF, B.; D'ANTONIO, C.; DOBSON, A.; HOWARTH, R.; SCHINDLER, D.; SCHLESINGER, W.H.; SIMBERLOFF, D.; SWACKHAMER, D. Forecasting Agriculturally driven global environmental change. **Science**, Washington, DC, v. 292, p. 281–284, 2001.

TILMAN, D; CASSMAN, K. G.; MATSON, P. A.; NAYLOR, R.; POLASKY, S. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, London, v.418, p. 671-677, 2002.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, p. 240- 245, 2002.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores dos solos. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 2, p. 195-276, 2002.

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** v 266, p 69–75., 2004.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, p. 703-707, 1987.

VARGAS, L.K.; SCHOLLES, D. Biomassa microbiana e produção de CO<sub>2</sub> e N mineral de um Podzólico Vermelho-Escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, n. 1, p. 35-42, 2000.

VELASQUEZ, E.; LAVELLE, P.; ANDRADE, M. GISQ. A multifunctional indicator of soil quality. **Soil Biology and Biochemistry**. v.39, p.3066-3080, 2007.

VICTORIA, R.L.; PICCOLO, M.C.; VARGAS, A.A.T. O ciclo do nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVEZ, M.C. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Cap. 8. p.105-121, 1992

WILLIAMS, M. R. Cotton crop losses. Disponível em: <[www.msstate.edu/Entomology/html](http://www.msstate.edu/Entomology/html)>. Acesso em: 10 out. 2008.

WILLIAMSON, E. Environmental risks from the release of genetically modified organisms (GMOS) the need for molecular ecology. *Mol. Ecol.* 1: 3Ð8, 1992.

WOOMER, P. L. Most probable number counts. In: Weaver, R.W.; Angle, S.; Bottomley, P.; Bezdicsek, D.; Smith, S.; Tabatabai, A., Wollum, A. (Eds), *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Sci. Soc. Am., Madison, p 59-79, 1994.

WOLFENBARGER LL, PHIFER PR. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science* v 290, p2088–209, 2000.

- WU, W.X., YE, Q.F., MIN, H., Effects of straws from Bt transgenic rice on selected biological activities in water-flooded soil. **European Journal of Soil Biology** v 40, p 15–22, 2004 a.
- ZUBERER, D.A. Recovery and enumeration of viable bacteria. In: Weaver, R.W.; Angle, S.; Bottomley, P.; Bezdicsek, D.; Smith, S.; Tabatabai, A.; (Eds), **Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties**. Soil Sci. Soc. Am., Madison, p 119-144, 1994.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

**Tabela 1.** Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre a atividade de algumas enzimas relacionadas ao Ciclo do Nitrogênio, Atividade Biológica, Ciclo do Fósforo e Ciclo do Carbono na rizosfera de algodão Bollgard I com 15dias. Média de 20 plantas.

Treatment	Ure	Aspar.	Desid.	Fosfat. ác.	Celul.
	(mg N g dry soil <sup>-1</sup> )	(mg N g dry soil <sup>-1</sup> )	(µgTFF g dry soil <sup>-1</sup> )	(mg de p-nitrofenol g dry soil <sup>-1</sup> /1h)	(µg glicose g dry soil <sup>-1</sup> )
Transgenic	Plant (n= 10)				
Non-GMP	112.02 <sup>a</sup>	27.37 <sup>b</sup>	1.05 <sup>a</sup>	323.19 <sup>a</sup>	52.46 <sup>b</sup>
GMP	111.37 <sup>a</sup>	31.65 <sup>a</sup>	0.64 <sup>b</sup>	384.44 <sup>a</sup>	82.11 <sup>a</sup>
AM Fungal	Plant (n= 10)				
Non-AM	119.87 <sup>a</sup>	30.70 <sup>a</sup>	1.12 <sup>a</sup>	405.28 <sup>a</sup>	82.99 <sup>a</sup>
AM	103.52 <sup>b</sup>	28.32 <sup>b</sup>	0.56 <sup>b</sup>	302.36 <sup>a</sup>	51.58 <sup>b</sup>
ANOVA (p values)					
Plant	0.90	<0.01	<0.01	0.34	<0.01
MA	<0.01	0.03	<0.01	0.11	<0.01
PGM*MA	0.76	<0.01	0.01	0.68	0.54

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro de cada tratamento.

Ure = Urease, Aspar. = Asparaginase, Desid. = Desidrogenase, Fosfat. ác. = Fosfatase ácida, Celul. = Celulase

**Tabela 2.** Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre a atividade de algumas enzimas relacionadas ao Ciclo do Nitrogênio, Atividade Biológica, Ciclo do Fósforo e Ciclo do Carbono na rizosfera de algodão Bollgard I com 45dias. Média de 20 plantas.

Treatment	Ure	Aspar.	Desid.	Fosfat. ác.	Celul.
	(mg N g dry soil <sup>-1</sup> )	(mg N g dry soil <sup>-1</sup> )	(µgTFF g dry soil <sup>-1</sup> )	(mg de p-nitrofenol g dry soil <sup>-1</sup> /1h)	(µg glicose g dry soil <sup>-1</sup> )
Transgenic	Plant (n= 10)				
Non-GMP	23.22a	41.00a	2.51a	137.01b	104.32b
GMP	18.88b	32.74b	2.58a	312.26a	136.07a
AM Fungal	Plant (n= 10)				
Non-AM	23.71a	39.69a	2.76a	293.30a	137.90a
AM	18.40b	34.06a	2.32b	155.97b	102.49b
ANOVA (p values)					
Plant	<0.01	0.04	0.62	<0.01	<0.01
MA	<0.01	0.16	<0.01	<0.01	<0.01
PGM*MA	<0.01	0.32	0.74	0.46	0.32

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro de cada tratamento.

Ure = Urease, Aspar. = Asparaginase, Desid. = Desidrogenase, Fosfat. ác. = Fosfatase ácida, Celul. = Celulase.

**Tabela 3.** Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre a atividade de algumas enzimas relacionadas ao Ciclo do Nitrogênio, Atividade Biológica, Ciclo do Fósforo e Ciclo do Carbono na rizosfera de algodão Bollgard I com 60 dias. Média de 20 plantas.

Treatment	Ure	Aspar.	Desid.	Fosfat. ác.	Celul.
	(mg N g dry soil <sup>-1</sup> )	(mg N g dry soil <sup>-1</sup> )	(µgTFF g dry soil <sup>-1</sup> )	(mg de p-nitrofenol g dry soil <sup>-1</sup> /1h)	(µg glicose g dry soil <sup>-1</sup> )
Transgenic	Plant (n= 10)				
Non-GMP	30.05b	34.51a	3.65a	181.63b	95.95b
GMP	55.64a	17.53b	2.65b	278.52 <sup>a</sup>	185.48a
AM Fungal	Plant (n=10)				
Non-AM	48.56a	24.89a	3.34a	270.69 <sup>a</sup>	150.65a
AM	37.13b	27.15a	2.96a	189.46b	130.78a
ANOVA (p values)					
Plant	<0.01	<0.01	<0,05	<0.01	<0.01
MA	<0.01	0.46	0.21	<0.01	0.11
PGM*MA	0.17	0.03	0.09	<0.01	<0.01

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro de cada tratamento.

Ure = Urease, Aspar= Asparaginase, Desid.=Desidrogenase, Fosfat. ác. = Fosfatase ácida, Celul. = Celulase.

**Tabela 4.** Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre a atividade de algumas enzimas relacionadas ao Ciclo do Nitrogênio, Atividade Biológica, Ciclo do Fósforo e Ciclo do Carbono na rizosfera de algodão Bollgard I com 90 dias. Média de 20 plantas.

Treatment	Ure	Aspar.	Desid.	Fosfat. ác.	Celul.
	(mg N g dry soil <sup>-1</sup> )	(mg N g dry soil <sup>-1</sup> )	(µgTFF g dry soil <sup>-1</sup> )	(mg de p-nitrofenol g dry soil <sup>-1</sup> /1h)	(µg glicose g dry soil <sup>-1</sup> )
Transgenic	Plant (n= 10)				
Non-GMP	124.89a	17.74b	2.57b	109.68 <sup>a</sup>	135.73 <sup>a</sup>
GMP	106.43b	30.26a	3.01a	107.16 <sup>a</sup>	141.94 <sup>a</sup>
AM Fungal	Plant (n=10)				
Non-AM	97.87b	34.46a	2.72a	114.07 <sup>a</sup>	154.11 <sup>a</sup>
AM	133.45a	13.54b	2.87a	102.77 <sup>a</sup>	126.56b
ANOVA (p values)					
Plant	<0.01	<0.01	0.02	0.76	0.55
MA	<0.01	<0.01	0.43	0.18	<0.01
PGM*MA	0.69	<0.01	0.02	<0.01	0.47

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro de cada tratamento.

Ure = Urease, Aspar.=Asparaginase, Desid.=Desidrogenase, Fosfat. ác. = Fosfatase ácida, Celul. = Celulase.

**Tabela 5.** Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre a atividade de algumas enzimas relacionadas ao Ciclo do Nitrogênio, Atividade Biológica, Ciclo do Fósforo e Ciclo do Carbono na rizosfera de algodão Bollgard I com 120 dias. Média de 20 plantas.

Treatment	Ure	Aspar.	Desid.	Fosfat. ác.	Celul.
	(mg N g dry soil <sup>-1</sup> )	(mg N g dry soil <sup>-1</sup> )	(µgTFF g dry soil <sup>-1</sup> )	(mg de p-nitrofenol g dry soil <sup>-1</sup> /1h)	(µg glicose g dry soil <sup>-1</sup> )
Transgenic	Plant (n= 10)				
Non-GMP	53.36a	21.08b	0.68b	77.04b	160.21b
GMP	54.10a	39.05a	1.04a	150.94 <sup>a</sup>	219.96a
AM Fungal	Plant (n=10)				
Non-AM	55.04a	16.83b	1.08a	92.52b	238.12a
AM	52.42a	43.75a	0.63b	135.45 <sup>a</sup>	142.04b
ANOVA (p values)					
Plant	0.86	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MA	0.55	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
PGM*MA	<0.01	<0.01	0.15	<0.01	<0.01

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro de cada tratamento.

Ure = Urease, Aspar.=Asparaginase, Desid.=Desidrogenase, Fosfat. ác.= Fosfatase ácida, Celul. = Celulase.

**Tabela 6.** Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre o pH e alguns grupos funcionais de microrganismos na rizosfera do algodão Bollgard I com 15 dias. Média de 20 plantas.

Treatment	Ph	HB	F	Fp	PS	Ac	Ce	Am	Pr	Cil	Fla
	(CaCl <sub>2</sub> )										
					(Log cfu g dry soil <sup>-1</sup> )						(Log NMP)
Transgenic	Plant (n= 10)										
Non-GMP	6.96 <sup>a</sup>	6.92a	5.07 <sup>a</sup>	5.27a	6.07a	6.74a	6.37a	6.52a	6.79a	4.17a	4.97a
GMP	5.60b	7.57a	5.07a	5.27a	5.94a	4.73b	5.56b	6.13b	6.33b	4.44a	4.56a
AM Fungal	Plant (n=10)										
Non-AM	6.18a	7.68a	5.06a	5.18b	6.08a	5.21a	5.94a	6.30a	6.67a	4.34a	4.67a
AM	6.37a	6.81a	5.08a	5.36a	5.93a	6.27a	5.98a	6.34a	6.45a	4.27a	4.39a
ANOVA (p values)											
Plant	<0.01	0.41	0.97	0.95	0.28	0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.29	0.70
MA	0.14	0.27	0.86	<0.01	0.24	0.15	0.75	0.66	0.06	0.77	0.14
PGM*MA	<0.01	0.36	0.39	<0,01	0.24	0.04	0.04	0.07	0.51	0.20	0.61

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p< 0,05), dentro de cada tratamento.

HB = Bactérias Heterotróficas, F = Fungos Totais, Fp = Pseudomonas, PS = Solubilizadores de Fosfato, Ac = Actinomicetos, Ce = Celulolíticos, Am = Amilolíticos, Pr = Proteolítico, Cil = Ciliados, Fla = Flagelados

**Tabela 7.** Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre o pH e alguns grupos funcionais de microrganismos na rizosfera do algodão Bollgard I com 45 dias. Média de 20 plantas.

Treatment	pH	HB	F	Fp	PS	Ac	Ce	Am	Pr	Cil	Fla
	(CaCl <sub>2</sub> )									(Log NMP)	
Transgenic	Plant (n= 10)										
Non-GMP	6.62a	7.95a	5.17b	1.02a	5.66a	6.75a	6.48a	6.48a	7.40a	3.99b	4.36a
GMP	5.75b	7.09a	5.50a	0.51a	5.79a	6.41b	6.21b	6.51a	7.12b	4.41a	3.95a
AM Fungal	Plant (n=10)										
Non-AM	6.21a	7.94a	5.55a	1.02a	5.67a	6.77a	6.41a	6.61a	7.34a	4.27a	4.13a
AM	6.16a	7.09a	5.12b	0.51a	5.78a	6.36b	6.28a	6.39b	7.18a	4.13a	4.18a
ANOVA (p values)											
Plant	<0.01	0.29	<0.01	0.53	0.20	0.04	0.01	0.67	0.03	0.02	0.11
MA	0.85	0.29	<0.01	0.53	0.32	0.01	0.18	0.02	0.19	0.38	0.82
PGM*MA	0.01	0.30	0.49	0.07	0.03	<0.01	0.06	0.48	0.05	<0.01	0.03

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro de cada tratamento.

HB = Bactérias Heterotróficas, F = Fungos Totais, Fp = Pseudomonas, PS = Solubilizadores de Fosfato, Ac = Actinomicetos, Ce = Celulolíticos, Am = Amilolíticos, Pr = Proteolítico, Cil = Ciliados, Fla = Flagelados

**Tabela 8.** Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre o pH e alguns grupos funcionais de microrganismos na rizosfera do algodão Bollgard I com 60 dias. Média de 20 plantas.

Treatment	pH	HB	F	Fp	PS	Ac	Ce	Am	Pr	Cil	Fla
	(CaCl <sub>2</sub> )										
				(Log cfu g dry soil <sup>-1</sup> )						(Log NMP)	
Transgenic	Plant (n= 10)										
Non-GMP	6.85a	7.52a	5.14a	2.55a	2.05a	6.65a	6.52a	6.62a	6.76a	3.97a	3.29b
GMP	5.39b	7.66a	5.12a	2.72a	3.80a	5.48b	5.70b	5.89b	6.11b	3.85a	4.21a
AM Fungal	Plant (n=10)										
Non-AM	6.10a	7.47b	5.32a	3.13a	3.71a	6.23a	6.18a	6.21a	6.68a	3.85a	3.60a
AM	6.14a	7.71a	4.94a	2.14a	2.14a	5.89b	6.04a	6.30a	6.19b	3.98a	3.89a
ANOVA (p values)											
Plant	<0.01	0.18	0.94	0.89	0.13	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.42	0.04
MA	0.71	0.02	0.07	0.45	0.17	<0.01	0.24	0.24	0.02	0.40	0.50
PGM*MA	0.11	0.50	0.03	0.97	0.16	<0.01	<0.01	<0.01	0.08	0.02	0.01

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro de cada tratamento.

HB = Bactérias Heterotróficas, F = Fungos Totais, Fp = Pseudomonas, PS = Solubilizadores de Fosfato, Ac = Actinomicetos, Ce = Celulolíticos, Am = Amilolíticos, Pr = Proteolítico, Cil = Ciliados, Fla = Flagelados

**Tabela 9.** Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre o pH e alguns grupos funcionais de microrganismos na rizosfera do algodão Bollgard I com 90 dias. Média de 20 plantas.

Treatment	pH	HB	F	Fp	PS	Ac	Ce	Am	Pr	Cil	Fla
	(CaCl <sub>2</sub> )										
				(Log cfu g dry soil <sup>-1</sup> )						(Log NMP)	
Transgenic	Plant (n= 10)										
Non-GMP	7.13a	7.46 <sup>a</sup>	4.82 <sup>a</sup>	0.01a	2.53b	6.82a	6.56a	6.56a	6.84a	4.57a	0.62b
GMP	5.93b	7.47a	5.06a	0.01a	5.53a	6.07b	5.87b	5.87b	6.38b	3.59b	3.71a
AM Fungal	Plant (n=10)										
Non-AM	6.44a	7.50a	5.11a	0.01a	5.45a	6.44a	6.29a	6.29a	6.66a	3.77b	1.84a
AM	6.22a	7.43a	4.77a	0.01a	2.61b	6.44a	6.14a	6.14a	6.56a	4.39a	2.49a
ANOVA (p values)											
Plant	<0.01	0.94	0.16	0.1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MA	0.43	0.62	0.051	0.1	<0.01	0.98	0.23	0.23	0.49	0.01	0.14
PGM*MA	<0.01	0.08	0.03	0.1	<0.01	0.01	0.04	0.04	0.29	0.09	0.19

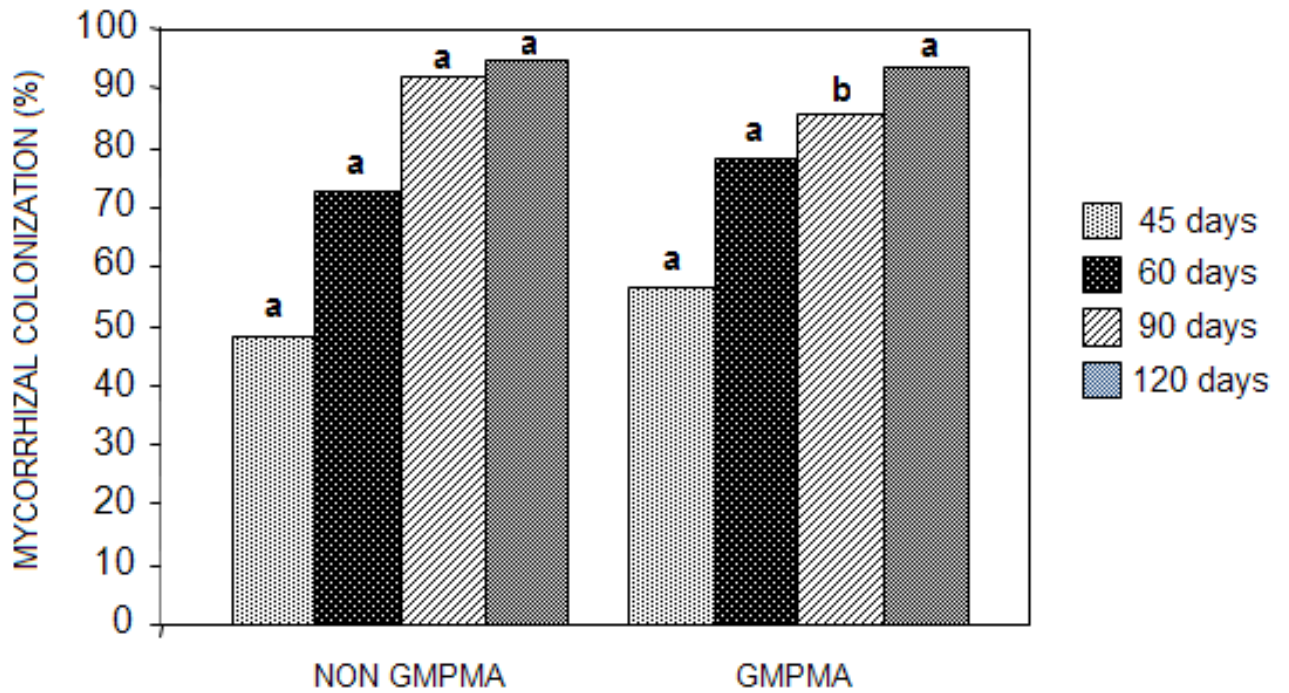
Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p< 0,05), dentro de cada tratamento.

.HB = Bactérias Heterotróficas, F = Fungos Totais, Fp = Pseudomonas, PS = Solubilizadores de Fosfato, Ac = Actinomicetos, Ce = Celulolíticos, Am = Amilolíticos, Pr = Proteolítico, Cil = Ciliados, Fla = Flagelados

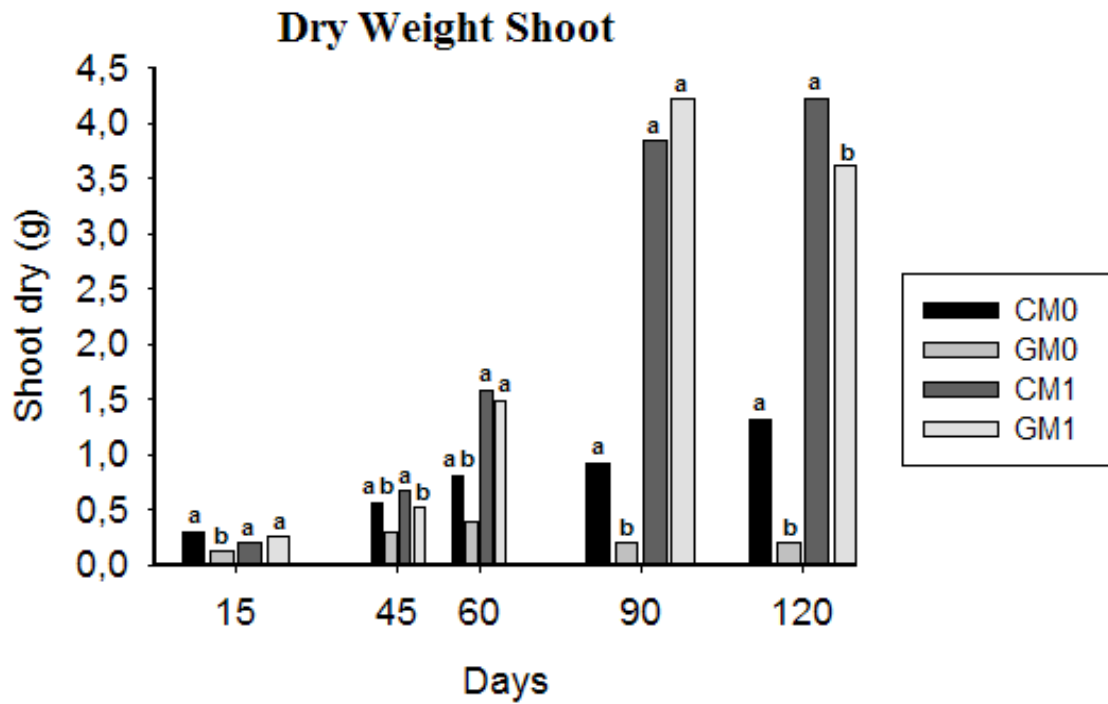
**Tabela 10.** Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de Fungo Micorrízico Arbuscular (AM) sobre o pH e alguns grupos funcionais de microrganismos na rizosfera do algodão Bollgard I com 120 dias. Média de 20 plantas.

Treatment	pH	HB	F	Fp	PS	Ac	Ce	Am	Pr	Cil	Fla
	(CaCl <sub>2</sub> )										
				(Log cfu g dry soil <sup>-1</sup> )						(Log NMP)	
Transgenic	Plant (n= 10)										
Non-GMP	6.93a	7.99 <sup>a</sup>	5.22 <sup>a</sup>	0.01a	1.01a	6.88a	6.37a	6.37a	6.80a	4.37b	2.04b
GMP	6.43b	7.08a	5.29a	0.01a	2.14a	6.71a	6.24a	6.24a	6.92a	4.97a	4.50a
AM Fungal	Plant (n=10)										
Non-AM	6.67a	7.99a	5.48a	0.01a	1.57a	6.76a	6.30a	6.30a	6.87a	4.78a	2.16b
AM	6.69a	7.08a	5.02b	0.01a	1.58a	6.83a	6.31a	6.31a	6.85a	4.57a	4.38a
ANOVA (p values)											
Plant	<0.01	0.26	0.66	0.1	0.32	0.07	0.15	0.15	0.36	<0.01	<0.01
MA	0.87	0.26	<0.01	0.1	0.99	0.43	0.93	0.93	0.88	0.19	<0.01
PGM*MA	0.01	0.15	<0.01	0.1	0.99	<0.01	0.16	0.16	0.11	0.02	<0.01

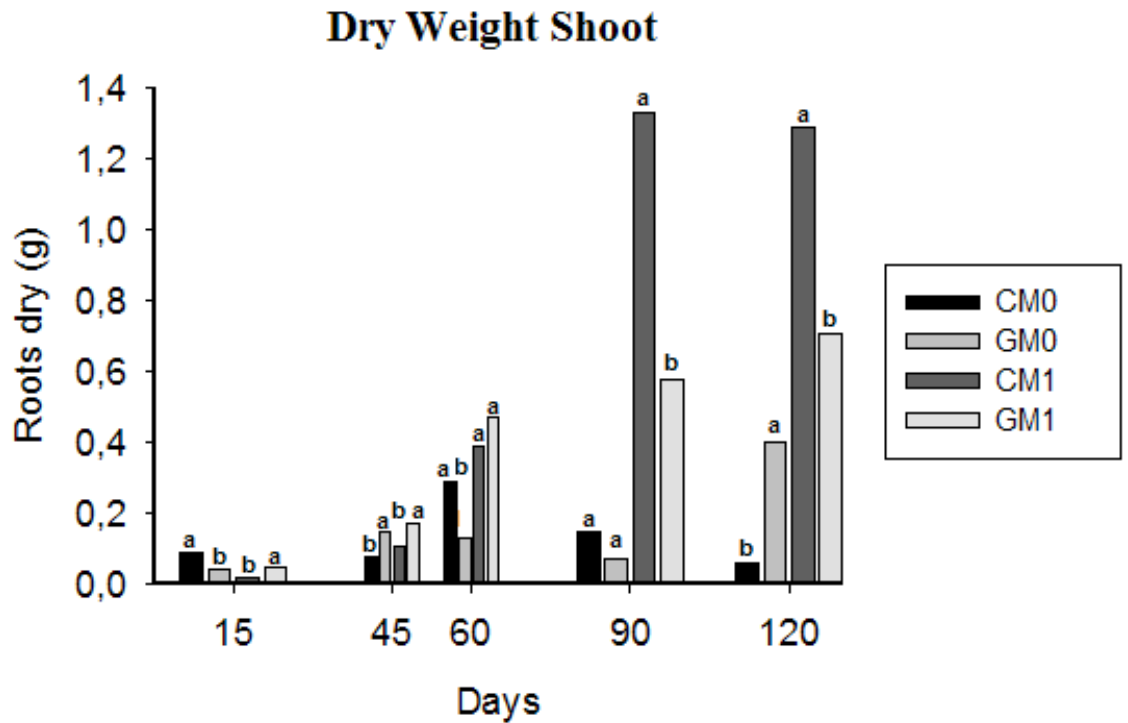
Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro de cada tratamento. HB = Bactérias Heterotróficas, F = Fungos Totais, Fp = Pseudomonas, PS = Solubilizadores de Fosfato, Ac = Actinomicetos, Ce = Celulolíticos, Amr = Amilolíticos, P = Proteolítico, Cil = Ciliados, Fla = Flagelados



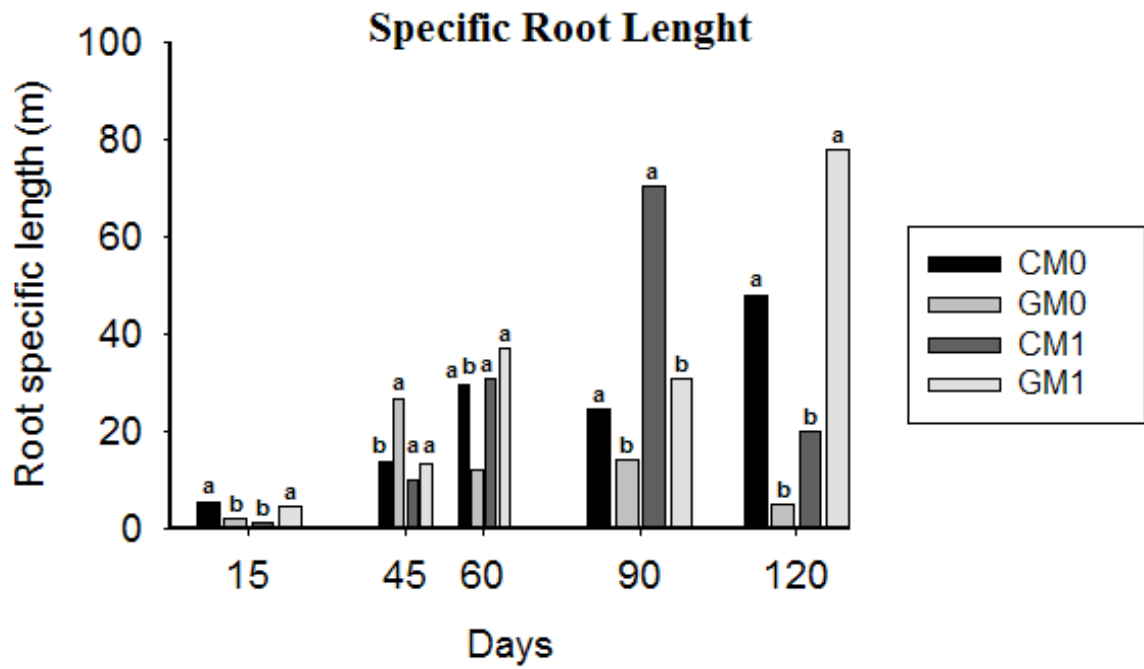
**Figura 2-** Colonização micorrízica (%) por *Glomus clarum* dentro de cada tratamento e tempo de crescimento do algodão Bolgard. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro de cada tratamento.



**Figura 2.** Análise em diferentes épocas de avaliação do efeito de organismos PGM (G) e não GM (C), micorrizados (M1) e não micorrizados (M0) no crescimento do algodão. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro de cada tratamento.



**Figura 3.** Análise em diferentes épocas de avaliação do efeito de organismos PGM (G) e não GM (C), micorrizados (M1) e não micorrizados (M0) no crescimento do algodão. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro de cada tratamento.



**Figura 4.** Análise em diferentes épocas de avaliação do efeito de organismos PGM (G) e não GM (C), micorrizados (M1) e não micorrizados (M0) no crescimento do algodão. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro de cada tratamento.