



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

ROSINEI APARECIDA DE SOUZA

**A CULTURA DA SOJA NO BRASIL: DEFININDO
PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL
À MICROBIOTA DO SOLO E À FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO
NITROGÊNIO**

Londrina
2006

ROSINEI APARECIDA DE SOUZA

**A CULTURA DA SOJA NO BRASIL: DEFININDO
PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL
À MICROBIOTA DO SOLO E À FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO
NITROGÊNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação, em Química dos Recursos Naturais da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química dos Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Dimas A. M. Zaia
Co-orientador: Dra. Mariângela Hungria

Londrina
2006

ROSINEI APARECIDA DE SOUZA

**A CULTURA DA SOJA NO BRASIL: DEFININDO
PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL
À MICROBIOTA DO SOLO E À FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO
NITROGÊNIO**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Dimas Augusto Morozin Zaia
(Orientador)

Dr. Júlio Cezar Franchini – Embrapa

Prof. Dr. Henrique de Santana – UEL

Londrina, 17 de março de 2006.

***A sabedoria do homem
ilumina seu rosto
e lhe abrandam a
dureza da face.
Eclesiastes 8, 1b***

AGRADECIMENTOS

Nesses dois anos de mestrado, encontrei muita gente e acumulei dívidas ao longo do caminho. Lembro-me inicialmente, com muito carinho e agradecimento, dos funcionários do laboratório de Biotecnologia do Solo: Lígia Maria, Leny, Rinaldo, todos estagiários e parceiros.

À todos os funcionários e estagiários do laboratório de Química de Solos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Dimas Zaia pela orientação, credibilidade, confiança, incentivo, convite para as confraternizações de finais-de-ano, paciência em meus momentos de incerteza e, principalmente, pela amizade dispensada no decorrer do curso. Meu muito obrigada!

Não sei como agradecer minha co-orientadora Dr^a Mariangela Hungria. Primeiro obrigada pelo seu profissionalismo, competência, capacidade de indicar que tipo de trabalho eu deveria realizar, explorar e sempre adivinhar o que eu necessitava. Pela sua habilidade em misturar em doses certas, por alquimia, que nunca consegui entender: crítica, sentimento e encorajamento. Segundo, obrigada pela paciência e amizade com as quais me brindou.

O andamento desse trabalho com certeza teria sido outro não fosse a ajuda, a confiança, a crítica e o incentivo do pesquisador Dr. Júlio Cezar Franchini, a quem agradeço, também, a amizade com que me distinguiu durante esses anos.

Às amigas que trabalharam diretamente comigo: Letícia e Thaís que me deram apoio concreto em momentos difíceis. Minha eterna gratidão!

Ao Alan A. Pereira e Luciano de Souza pelo auxílio na condução das análises.

Ao Dr. Carlos D. Maciel pela contribuição dada a este trabalho.

Aos eternos e antigos amigos do laboratório: Carla, Dino, Luciano e Ana Luiza. Vocês moram em meu coração!

Outras pessoas também fizeram parte dessa caminhada, amigos como: Glaciela, Odair, Luciana Grange, Gentil e outros.

À querida amiga Luciana e H. Iwama pela amizade e companhia de todas as horas, presença carinhosa nos momentos de ansiedade e incerteza.

Aos professores e coordenação do programa de Pós-Graduação em Química dos Recursos Naturais.

Aos colegas de mestrado Tatiana, Luciana, Sônia, Vanessa, Patrícia, João, Aline, Cleverson, Maria, Débora, Thiago, Franke e Fabiano.

Registro, aqui, o meu agradecimento à UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA. Sem o trabalho dela, eu, como mestre em Química dos Recursos Naturais, simplesmente não existiria.

Aos meus irmãos que tanto amo: Edinéia Cristina e José Donisete. Aos cunhados Rodrigo e Sandra Regina e primo João; o incentivo para levar adiante a concretização desta tarefa. Obrigada minha querida irmãzinha, por todos os conselhos dados nos momentos de aflição.

Ao meu pequeno e amado sobrinho, Gustavo Henrique, por todas as horas de alegria e descontração e por me fazer sorrir em momentos de angústia.

À Minha mama querida, mestra que me ajudou a descobrir a vida, companheira de caminhada, poetiza que sonha, profetiza e constrói, que acima de tudo, ama: Maria Aparecida e meu pai (*in memoriam*) que dorme eternamente com os anjos.

Agradeço, ainda, à EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja pela concessão do laboratório para a realização dos experimentos.

À todos aqueles que, indiretamente, prestaram seu apoio e incentivo. E, em especial, agradeço à DEUS meu criador pela força e sabedoria.

Finalmente, como forma de último agradecimento a todos, registro que o trabalho que se segue é resultado não só de longas e árduas horas de angústia, mas também de muito prazer e diversão. Cada página fora redigida com muita garra e sentimento, porém estas duas, que acabo de escrever e, que são as últimas, foram as que despertaram maiores emoções.

À DEUS

Ofereço

Àqueles que dão cor a tudo o que faço, motivo de minha luta e de minha realização, ***minha família.***

Souza, Rosinei Aparecida de. **A cultura da soja no Brasil: definindo parâmetros para avaliação de risco ambiental à microbiota do solo e à fixação biológica do nitrogênio.** 2006. 116f. Dissertação (Química dos recursos naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006

RESUMO

O cultivo comercial de plantas transgênicas, concomitantemente com o manejo com herbicidas ou inseticidas específicos resultou em uma demanda crescente por estudos de análise de risco ambiental. No caso da soja transgênica no Brasil, uma preocupação adicional é a de garantir que a transgenia não afete o processo de fixação biológica do N₂ e outros benefícios relacionados à microbiota do solo. O objetivo deste trabalho foi o de identificar e validar, em escala de plantio comercial (*Ensaio 1*) e de áreas experimentais (*Ensaio 2*), um conjunto de parâmetros para a avaliação, a campo, de riscos à microbiota do solo e à fixação biológica do N₂ pelo uso de novas tecnologias com a cultura da soja. As avaliações foram feitas em 11 municípios localizados em seis estados e no DF. Foram avaliados parâmetros quantitativos da microbiota do solo (C e N da biomassa microbiana – CBM e NBM; respiração basal – RB; e quociente metabólico – qCO_2) e da fixação biológica do N₂ (número de células de rizóbios no solo; número - NN e massa de nódulos secos – MNS; identificação sorológica das estirpes ocupando os nódulos; massa da parte aérea seca – MPAS; N total – NTPA e N-ureídios – NTU na parte aérea). A análise qualitativa da comunidade bacteriana do solo foi estimada pela amplificação do DNA total do solo com “primers” específicos para o gene ribossomal 16S das bactérias, seguido pela eletroforese em géis desnaturantes com gradiente de uréia (PCR-DGGE). Os dados foram analisados em relação à variabilidade pontual e temporal, limites de coeficiente de variação (CV) e correlações entre os parâmetros. O CBM e a RB foram positivamente correlacionados ($r=0,84$, $p\leq 0,001$, *Ensaio 1*), bem como o CBM e o NBM ($r=0,75$, $p\leq 0,001$, *Ensaio 2*). A obtenção dos parâmetros de CBM, RB e NBM é relativamente simples e apresentou boa confiabilidade e repetibilidade para a avaliação quantitativa da biomassa microbiana; o CV máximo aceitável entre repetições para esses parâmetros foi estabelecido em 35%. Além disso, correlações positivas e significativas ($p\leq 0,001$) foram obtidas, no *Ensaio 2*, entre: a MPAS e o CBM ($r=0,61$) e o NBM ($r=0,61$), bem como entre o NTPA e o CBM ($r=0,65$) e o NBM ($r=0,65$), indicando a viabilidade de utilização desses parâmetros microbianos como bioindicadores do crescimento da soja. Foi possível confirmar a homogeneidade de cada área, entre repetições, tratamentos e coletas, pelo método de PCR-DGGE. A fixação biológica do N₂ contribuiu com 72% a 88% do NTPA e o crescimento da soja foi diretamente relacionado ao processo biológico. Os parâmetros de MNS, em adição à MPAS, com CV máximo de 20% foram adequados para avaliar a fixação biológica do N₂, uma vez que correlações significativas ($p\leq 0,001$) foram constatadas entre os parâmetros de MPAS e NTPA ($r=0,88$ e $0,96$), MPAS e NTU ($r=0,81$ e $0,97$), bem como entre o NTPA e o NTU ($r=0,94$ e $1,00$), nos *Ensaios 1* e *2*, respectivamente. No caso de áreas com teores variáveis de N no solo, ou que receberam fertilizantes nitrogenados, torna-se necessária a avaliação adicional dos parâmetros de NTPA e NTU, também com CV máximo de 20%. A aplicação desses parâmetros no *Ensaio 2* indicou que, no primeiro ano, não houve efeito da transgenia para tolerância a um herbicida, ou da composição de dois herbicidas na microbiota do solo e na fixação biológica do N₂ com a cultura da soja.

Palavras-chave: Análise de risco ambiental. Biomassa microbiana do solo. *Bradyrhizobium*. Fixação biológica do nitrogênio. Glifosato. *Glycine Max*. Quociente metabólico microbiano. Respiração microbiana. Soja transgênica.

Souza, Rosinei Aparecida de. **A cultura da soja no Brasil: definindo parâmetros para avaliação de risco ambiental à microbiota do solo e à fixação biológica do nitrogênio.** 2006. 116f. Dissertação (Química dos recursos naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006

ABSTRACT

The commercial cropping of transgenic plants together with the use of specific herbicides and insecticides has resulted in an increasing demand for studies of environmental risk assessment. In Brazil, an additional concern over transgenic soybean crop has been to guarantee that the foreign material does not affect the biological N₂ fixation process or other benefits related to associations with soil microbes other than rhizobia. The objective of this work was to establish and to validate at a commercial cropping (*Trial 1*) and experimental scales (*Trial 2*) a set of parameters capable of assessing, under field conditions, any risks to soil microbes and/or to the biological N₂-fixation process due to the adoption of new soybean technologies. Evaluations were performed at eleven sites in six Brazilian states and in the Federal District. Analyses included quantitative parameters for soil microbes (biomass C and N – MBC and MBN; microbial respiration – MR; and microbial metabolic quotient – $q\text{CO}_2$) and for biological N₂ fixation (number of rhizobial cells in soil; nodule number – NN and dry weight – NDW; serological identification of rhizobial strains occupying the nodules; shoot dry weight – SDW; total N in shoot – TNS and N as ureides in shoot (TNU). Qualitative analysis of the soil bacterial community was achieved by the amplification of total soil DNA with specific primers for the ribosomal 16S gene of bacteria followed by denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). Results were analyzed with reference to point and temporal variability, limits of coefficient of variation (CV) and correlation among the parameters. The MBC and MR were positively related ($r=0.84$, $p\leq 0.001$, *Trial 1*), as well as the MBC and the MBN ($r=0.75$, $p\leq 0.001$, *Trial 2*). Analyses of MBC, MR and MBN were relatively easy and showed good replicability and confidence to quantitative estimation of soil microbes; the maximum acceptable CV was established as 35%. Furthermore, positive and significant correlations ($p\leq 0.001$) were obtained in *Trial 2* between the following parameters: SDW and MBC ($r=0.61$) and MBN ($r=0.61$), as well as between the TNS and MBC ($r=0.65$) and MBN ($r=0.65$), indicating the viability of using the MBC and MBN parameters as bioindicators of soybean growth. It was possible to verify the homogeneity of each area, between replicates, treatments and harvests by the PCR-DGGE method. Biological N₂ fixation contributed from 72 to 88% of the TNS and soybean growth was positively correlated with it. The parameters of NDW and SDW, with a maximum CV of 20%, were adequate for evaluation of the contribution of the biological N₂ fixation; positive correlations ($p\leq 0.001$) were obtained between SDW and TNS ($r=0.88$ and 0.96), SDW and TNU ($r=0.81$ and 0.97), as well as between TNS and TNU ($r=0.94$ and 1.00) in *Trials 1* and *2*, respectively. In areas with variable soil-N content or those that had received N fertilizers, the additional analyses of the TNS and TNU parameters are necessary, also with a maximum CV of 20%. The application of those parameters in *Trial 2* indicated that, in the first year, there was no effect of a herbicide-transgenic soybean as well as of the composition of two herbicides in the soil microbiological parameters as well as in the biological N₂ fixation process.

Keywords: Biological nitrogen fixation. *Bradyrhizobium*. Environmental risk assessment. *Glycine max*. Glyphosate. Microbial biomass. Microbial metabolic quotient. Microbial respiration. Transgenic soybean.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Correlação entre o carbono da biomassa microbiana (CBM, $\mu\text{g C g}^{-1}$ solo seco) e a respiração basal (RB, $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1}$ solo dia^{-1}) em seis locais cultivados com soja (*Ensaio 1*). Os solos foram coletados nos estádios V4 e R2 do crescimento da soja..... 111
- Figura 2** – Análise de agrupamento dos perfis de DNA total do solo após a amplificação com “primers” para a região do gene ribossomal 16S e eletroforese por DGGE. Perfis obtidos em cada uma das três repetições do *Ensaio 1*, em Dourados (A) e São Luiz Gonzaga (B), utilizando o programa Bionumerics, com o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e um índice de tolerância de 5%..... 111
- Figura 3** – Similaridade genética (%) entre os perfis de DNA total do solo obtidos em cada uma das sete áreas do *Ensaio 2*, nas coletas realizadas no pré-plantio e em R2. Perfis obtidos após a amplificação com “primers” para a região do gene ribossomal 16S e eletroforese por DGGE. Os produtos foram analisados utilizando o programa Bionumerics, com o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e um índice de tolerância de 5%..... 112
- Figura 4** – Correlações entre o carbono (CBM) e o nitrogênio (NBM) da biomassa microbiana do solo ($\mu\text{g C}$ ou N g^{-1} de solo seco) em sete locais amostrados (*Ensaio 2*): (A) Dados obtidos nos sete locais na coleta realizada em R2; (B) Dados obtidos em sete locais nas coletas no pré-plantio e em R2 e em cinco locais em R8..... 113
- Figura 5** – Correlações entre a massa da parte aérea seca (MPAS, g pl^{-1}) e o N total, P total e K total acumulados na parte aérea (NTPA, PTPA, KTPA, mg planta^{-1}) de soja cultivada em sete locais (*Ensaio 2*), inoculada com *Bradyrhizobium* e sem receber fertilizante nitrogenado. Plantas coletadas no estádio R2. 114

- Figura 6** – Correlações entre a massa da parte aérea seca (MPAS, g pl⁻¹) e o N total (NTPA) e N na forma de ureídeos (NTPA, NTU, mg planta⁻¹) de soja cultivada em sete locais (*Ensaio 2*), inoculada com *Bradyrhizobium* e sem receber fertilizante nitrogenado. Os valores de NTU não foram estimados para Brasília, pela falta de nodulação. Plantas coletadas no estádio R2..... 115
- Figura 7** – Correlação entre o C e o N da biomassa microbiana (BM) (µg C e N g⁻¹ de solo seco) e a massa da parte aérea seca (MPAS, g planta⁻¹) de soja cultivada em sete locais (*Ensaio 2*). Avaliações realizadas no estádio R2. 116

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Localização, clima e tipo de solo nos municípios onde os experimentos foram conduzidos98
- Tabela 2** – Data de semeadura, precipitação (mm) e temperatura média mensal (°C) nos sete locais do *Ensaio 2*, com evento transgênico e soja convencional na safra 2004/2005.....99
- Tabela 3** – Classificação dos coeficientes de variação (CV) segundo as estimativas das médias aritméticas (\bar{x}) e do desvio padrão (s) das médias dos CVs obtidos nas avaliações realizadas nos *Ensaio 1 e 2*. 100
- Tabela 4** – Carbono da biomassa microbiana (CBM, $\mu\text{g C g}^{-1}$ solo seco), respiração basal (RB, $\mu\text{g de C-CO}_2 \text{ g}^{-1}$ solo seco dia^{-1}) e quociente metabólico, [$q\text{CO}_2$, $\mu\text{g de CO}_2 \mu\text{g}^{-1}$ C microbiano h^{-1}] $\times 10^4$] em solos de seis locais do Brasil. Solos coletados nos estádios V4 e R2 da cultura da soja. Médias e coeficiente de variação (CV%) de três repetições. *Ensaio 1*, soja convencional, safra 2002/2003. 101
- Tabela 5** – Coeficientes de correlação entre os parâmetros de carbono da biomassa microbiana (CBM), respiração basal (RB) e quociente metabólico ($q\text{CO}_2$) avaliados em solos com soja nos estádios V4 e R2 e os parâmetros de crescimento e N acumulado em soja no estádio R2. As legendas dos parâmetros para a soja correspondem às descritas nas Tabelas 4 e 6. *Ensaio 1*, com soja convencional e três repetições, na safra 2002/2003. 102
- Tabela 6** – Número de células de *Bradyrhizobium* no solo (g^{-1} solo seco); nodulação (número de nódulos, NN, $\text{n}^\circ \text{ pl}^{-1}$; massa de nódulos secos, MNS, mg pl^{-1}), ocupação dos nódulos pelas estirpes (%), crescimento e acúmulo de N na parte aérea [massa da parte aérea seca, MPAS, g pl^{-1} ; N total acumulado na parte aérea (NTPA, mg N pl^{-1}) e percentual do N total na forma de ureídeos (NU%) e N total na forma de ureídeos (NTU, $\text{mg N-ureído pl}^{-1}$); eficiência dos nódulos considerando o N total (ENNT, mg N g^{-1} nódulo) e o N na forma de ureídeos (ENNU, $\text{mg N-ureído g}^{-1}$

	nódulo) em soja no estágio R2, coletada em seis áreas produtoras. Médias e coeficientes de variação (CV %) de três repetições. <i>Ensaio 1</i> , soja convencional, safra 2002/2003.	103
Tabela 7 –	Correlação entre os parâmetros utilizados para avaliação da fixação biológica do N ₂ no <i>Ensaio 1</i> , com soja convencional, em seis locais produtores. A soja foi coletadas no estágio R2 e as legendas dos parâmetros correspondem às descritas na Tabela 6. <i>Ensaio 1</i> , soja convencional, safra 2002/2003.....	104
Tabela 8 –	C e N da biomassa microbiana (CBM/NBM, µg C ou N g ⁻¹ solo seco) em solos de sete locais do Brasil, sob três tratamentos com soja e coletados nos estádios de pré-plantio, R2 e R8. <i>Ensaio 2</i> , safra 2003/2004.	105
Tabela 9 –	Similaridade genética final (%) obtida pela análise de agrupamento dos produtos obtidos por PCR-DGGE do DNA total do solo amplificado com "primers" para a região que codifica para o gene ribossomal 16S. Foram realizadas análises de agrupamento entre as repetições de cada tratamento e entre tratamentos em cada coleta. Os produtos de PCR foram analisados usando o programa Bionumerics com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard, com um nível de tolerância de 5%.....	107
Tabela 10 –	Nodulação (número, NN, n°. pl ⁻¹ e massa de nódulos secos, MNS, mg pl ⁻¹), massa da parte aérea seca (MPAS, g pl ⁻¹), teor de N (%NPA), N total (NTPA, mg N pl ⁻¹), teor de N-ureídos (%NU) e N total na forma de ureídos (NTU, mg N-ureído pl ⁻¹) na parte aérea de três tratamentos com soja. Também eficiência dos nódulos considerando o N total (ENNT, mg N g ⁻¹ nódulo) e o N na forma de ureídos (ENNU, mg N-ureído g ⁻¹ nódulo) em soja no estágio R2, coletada em sete áreas produtoras. <i>Ensaio 2</i> , safra 2004/2005.	108
Tabela 11 –	Correlações entre os parâmetros de carbono e N da biomassa microbiana (CBM e NBM), massa de nódulos (MNS) e da parte aérea (MPAS) secos e N total acumulado na parte aérea (NTPA) avaliados em R2. <i>Ensaio 2</i> , safra 2004/2005.....	110

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 SOLO: SISTEMA HETEROGÊNEO	20
1.2 MICRORGANISMOS DO SOLO	21
1.3 BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO	22
1.4 DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO	25
1.5 A SOJA E OS SEUS PRODUTOS	27
1.6 PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS	28
1.7 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO ATMOSFÉRICO (N ₂) COM A CULTURA DA SOJA.....	32
1.8 A SOJA TRANSGÊNICA	35
2 OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO GERAL	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 ÁREAS EXPERIMENTAIS.....	40
3.1.1 Experimento com soja convencional em propriedades de agricultores na safra 2002/2003	40
3.1.2 Experimento com soja convencional e evento transgênico para tolerância à herbicida conduzido em estações experimentais na safra 2004/2005.....	41
3.2 ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DA MICROBIOTA DO SOLO.....	42
3.2.1 Coleta do solo	42
3.2.2 Biomassa microbiana de carbono e de nitrogênio.....	43
3.2.3 Respiração basal.....	44
3.2.4 Quociente metabólico(qCO ₂).....	45
3.2.5 Composição bacteriana do solo avaliada em gel desnaturante (PCR-DGGR), Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)....	45
3.3 AVALIAÇÕES ENVOLVENDO A SIMBIOSE SOJA-RIZÓBIO.....	47
3.3.1 População de rizóbios	47
3.3.2 Avaliação da fixação biológica do nitrogênio em soja	48
3.3.3 Ocupação dos nódulos pelas estirpes dominantes nos solos brasileiros	50
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 ESTABELECENDO NÍVEIS DE CLASSIFICAÇÃO DOS COEFICIENTES DE VARIAÇÃO	53
4.2 ENSAIO 1: EXPERIMENTO COM SOJA CONVENCIONAL EM PROPRIEDADES DE AGRICULTORES NA SAFRA 2002/2003	55
4.2.1 Avaliação quantitativa da biomassa microbiana	55
4.2.2 Avaliação qualitativa da biomassa microbiana	58
4.2.3 Fixação biológica do nitrogênio	59
4.3 ENSAIO 2: EXPERIMENTO COM SOJA CONVENCIONAL E EVENTO TRANSGÊNICO PARA TOLERÂNCIA À HERBICIDA CONDUZIDO NA SAFRA 2004/2005.....	64
4.3.1 Avaliação quantitativa da biomassa microbiana	64
4.3.2 Avaliação qualitativa da biomassa microbiana	67
4.3.3 Fixação biológica do nitrogênio	68
4.4 DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS PARA ESTUDOS DE ANÁLISE DE RISCO AMBIENTAL.....	71
4.4.1 Parâmetros relacionados à microbiota do solo.....	71
4.4.2 Parâmetros relacionados à fixação biológica do nitrogênio.....	73
4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
5 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

Desde a revolução industrial, a humanidade passa por uma série de eras tecnológicas, podendo-se citar a química (plásticos), a nuclear (energia nuclear), a microeletrônica (computadores) e, particularmente nas duas últimas décadas, a era da biotecnologia. O termo biotecnologia parece inovador e, em 1985, foi definido como “um conjunto de atividades inter-relacionadas nas ciências biológicas, químicas e de engenharia, compreendendo estudos para que células de microrganismos, plantas ou animais produzam uma série de serviços e utilidades para o homem” (MOO-YOUNG, 1985). Essa ciência, portanto, possui raízes ancestrais, com registros já em 6.000 a.C. e que incluem o uso de microrganismos para a fabricação de cervejas, vinhos e queijos, entre outros (HUNGRIA, 1996). Nos últimos 20 anos, o termo biotecnologia passou a ser empregado com grande frequência e, segundo a “Convenção sobre Diversidade Biológica”, se refere a “qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou deles derivados, para fazer ou modificar produtos, ou processos, para um uso específico” (CBD, 2005). A partir de 1953, com a descrição da estrutura do DNA (WATSON; CRICK, 1953), houve um impulso espetacular nas ciências biológicas dando, particularmente a partir da década de 1970, início à chamada era da “biotecnologia moderna”, que envolve técnicas de manipulação do DNA, inclusive com a transferência de genes entre espécies distintas e resultando em organismos geneticamente modificados (OGM), no caso dos vegetais, as plantas transgênicas.

O cultivo comercial de plantas transgênicas iniciou em 1996 e cresceu exponencialmente desde então, atingindo uma área estimada em 81 milhões de ha em 2004 e envolvendo 8,25 milhões de agricultores em 17 países; 60% dessas áreas são ocupadas com a soja (*Glycine max*) transgênica. Ainda em 2004, os Estados Unidos responderam por 59% da área global com transgênicos e, em uma estimativa conservadora, no Brasil foram cultivados 5 milhões de ha (6% do cultivo mundial) com transgênicos. As projeções de adoção acelerada da tecnologia continuam (BROOKES; BARFOOT, 2005; JAMES, 2005).

Recentemente, com base em um levantamento de dados disponíveis em diversos estudos e com várias culturas, Brookes e Barfoot (2005) estimaram os benefícios gerados por uma década de comercialização com

transgênicos. Segundo esses autores, os ganhos líquidos pelos agricultores, no período de 1996-2004, são estimados em US\$ 27 bilhões. Além disso, houve redução no uso de agrotóxicos de 172 milhões de kg (6% do valor global) e um decréscimo de 14% no impacto ambiental, estimado pelo indicador EIQ (Environmental Impact Quotient, proposto por Kovach et al., 1992). Os autores estimaram, ainda, um decréscimo na emissão de gases com efeito estufa que, no período de 1996-2004, corresponderia a 1 bilhão de kg de CO₂, tanto pelo menor gasto de combustíveis resultante da adoção de práticas conservacionistas do solo, com ênfase para o plantio direto que reduz as operações de preparo do solo, como pelo menor número de operações para a aplicação de agrotóxicos. Além disso, teria ocorrido uma redução na emissão de 9,4 bilhões de kg de CO₂, relacionada ao seqüestro de C pelos resíduos culturais pela adoção das práticas conservacionistas (BROOKES; BARFOOT, 2005).

Por outro lado, com freqüência são levantadas preocupações a respeito da segurança dos transgênicos, tanto para o homem, como para outros organismos não-alvo (EAGLESHAM et al., 2001). As principais preocupações incluem a possibilidade de fluxo gênico, com cruzamentos dos transgênicos com plantas domesticadas ou selvagens compatíveis, não só nos centros de diversidade genética e de domesticação, como também com linhagens crioulas selecionadas por séculos por agricultores, além, é claro, da preocupação com ervas daninhas sexualmente compatíveis com a cultura (GEPTS; PAPA, 2003; GEPTS, 2005). Questiona-se, também, a sustentabilidade agrícola e a possível perda de recursos naturais, pois, para algumas culturas, essa tecnologia está conduzindo à consolidação de poucas companhias multinacionais produtoras de sementes e à redução na diversidade genética (GEPTS; PAPA, 2003). O uso de um único herbicida também é visto com preocupação, principalmente pela possível resistência gradual das ervas daninhas. Finalmente, preocupações éticas, sócio-econômicas, de propriedade intelectual e de direito do consumidor são levantadas (GEPTS, 2003; HUFFMAN et al., 2003; GEPTS; PAPA, 2003; GEPTS, 2005).

No caso da soja brasileira, uma preocupação adicional com os transgênicos é a de garantir a eficiência do processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N₂). Desde a expansão comercial da cultura, nos anos 1950, a pesquisa brasileira concentrou esforços no melhoramento de cultivares de soja e de seleção e melhoramento de estirpes de *Bradyrhizobium* que viabilizassem a

independência da cultura em relação aos fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA et al., 1994; VARGAS; HUNGRIA, 1997; HUNGRIA; CAMPO, 2005; HUNGRIA et al., 2005; HUNGRIA et al., 2006). Hoje, as quatro estirpes de *B. japonicum* e *B. elkanii* utilizadas em inoculantes comerciais no país são capazes de fornecer todo o N requerido pelas cultivares mais produtivas disponíveis, permitindo rendimentos a campo superiores a 4.000 kg ha⁻¹, com taxas de fixação de N₂ de até 300 kg de N ha⁻¹, e representando até 94% de todo o N acumulado pela plantas (CAMPO; HUNGRIA, 2005; HUNGRIA et al., 2005; HUNGRIA et al., 2006). Esses valores são ainda mais relevantes quando comparados com aqueles obtidos nas regiões norte e central da China, centros de diversidade genética da soja, mas onde a fixação biológica não consegue garantir o suprimento de N em quantidades adequadas para maximizar o rendimento, sendo necessário aplicar fertilizantes nitrogenados; além disso, os rendimentos obtidos são inferiores aos brasileiros (GAN et al., 2002). O sucesso do programa brasileiro também é evidenciado quando comparado com a análise de 166 ensaios conduzidos principalmente nos EUA e na Austrália no período de 1985 a 2000: o uso crescente de fertilizantes nitrogenados resultou na contribuição média do processo biológico de apenas 54% (VAN KESSEL; HARTLEY, 2000). Desse modo, além de resultar em uma economia para o país estimada em US\$ 3 bilhões por safra, certamente a fixação biológica do N₂ contribui, fortemente, para a viabilidade econômica da cultura no Brasil (HUNGRIA; CAMPO, 2005; HUNGRIA et al., 2006), razão pela qual a eficiência desse processo biológico deve ser sempre monitorada no momento de introdução de novas tecnologias para a cultura.

Teoricamente, a soja transgênica contendo genes de tolerância a herbicidas ou inseticidas não deveria ser afetada em seu papel como macrossimbionte. Contudo, duas situações podem afetar o processo biológico: 1) a regulação de outros genes pode ser alterada no evento de introdução do gene transgênico; e 2) a utilização, pelas companhias de sementes, de material genético com menor capacidade de fixação de N₂. Além disso, o manejo associado aos transgênicos pode afetar: 1) a bactéria, por exemplo, no caso do glifosato, o microssimbionte da soja, *Bradyrhizobium*, possui a enzima de sensibilidade ao glifosato (ZABLOTOWICZ; REDDY, 2004); e 2) os agrotóxicos podem afetar a simbiose. As preocupações com o processo de fixação biológica do N₂ também se aplicam à microbiota do solo, que desempenha um papel relevante nos processos

reativos do solo, principalmente na ciclagem de nutrientes, afetando a fertilidade dos solos e a disponibilidade de nutrientes para as plantas (O'DONNELL; GORRES, 1999).

Na agricultura brasileira, embora o país tenha, desde 1995, uma das legislações mais modernas em relação aos OGMs, o uso de variedades transgênicas tem sido marcado por uma série de problemas jurídicos e sociais. Em 1998 foi aprovado o uso comercial da soja Roundup Ready[®], mas a CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) condicionou tal aprovação à realização de um plano de monitoramento pós-comercial do produto em escala de “plantio comercial”, em diferentes regiões de plantio de soja, durante os primeiros cinco anos de plantio (Comunicado nº54, de 01 de outubro de 1998 e Instrução Normativa nº18 de 30 de dezembro de 1998). Nessa época, foram realizadas várias reuniões e discussões entre representantes da Monsanto do Brasil Ltda e pesquisadores de instituições de pesquisa e ensino nacionais, para a elaboração de um plano de monitoramento ambiental em áreas representativas de cultivo de soja. Um projeto complexo foi aprovado pela CTNBio, incluindo a análise multidisciplinar de uma série de parâmetros sem precedentes mesmo no meio acadêmico internacional (MONSANTO, 2002). Não foi surpresa, porém, que, pela complexidade do plano de monitoramento, ocorressem dificuldades relacionadas à logística, operacionalidade, distribuição de amostras, variabilidade entre os laboratórios, entre outros. Ao contrário, a definição de um conjunto menor de parâmetros sensíveis, com baixa variabilidade e custo, validado para as condições brasileiras, seria útil para a análise de risco ambiental em estudos envolvendo transgênicos, aplicação de agrotóxicos, entre outros. Além disso, é importante considerar que, conforme já salientado em outros países, o próprio melhoramento tradicional pode, muitas vezes, causar impactos negativos em diversos ecossistemas (CBD, 2005) e, provavelmente, tenha que ser, em um futuro breve, objeto de regulação e monitoramento do mesmo modo que os OGMs (GEPTS, 2002).

A polêmica sobre os OGMs certamente continuará pelos próximos anos, mas o cultivo da soja transgênica já está ocorrendo no Brasil em larga escala e, infelizmente, até o presente momento não há informações conclusivas sobre o impacto ambiental desse cultivo no Brasil.

1.1 SOLO: SISTEMA HETEROGÊNEO

O solo é formado por três fases: líquida (água com materiais dissolvidos), gasosa (os mesmos gases da atmosfera, porém, com diferentes proporções) e sólida. Esta última é composta de partículas minerais de várias formas, tamanhos e características químicas, raízes de plantas, populações de organismos macro e microscópicos vivos e com metabolismo ativo ou dormente, e matéria orgânica em vários estádios de decomposição. A característica estrutural dominante é formada por complexos de argilas e matéria orgânica estabilizados em partículas de diferentes tamanhos (areia, silte e argila), formas e arranjos. De modo geral, a fase sólida representa em torno de 45% do volume total, o espaço poroso (fase líquida e gasosa) 50% e a matéria orgânica 5% (incluindo os organismos vivos). A proporção entre as três fases, porém, varia em função do tipo de solo e das condições ambientais (SIQUEIRA; MOREIRA, 2002a).

A fração orgânica do solo é uma mistura complexa de tecidos vivos e mortos e de substâncias orgânicas e inorgânicas transformadas ou em seu estado original. São materiais complexos e em constante transformação, mas que podem ser separados em frações distintas. Em torno de 98% do carbono (C) orgânico do solo encontra-se como matéria orgânica morta, principalmente na forma de húmus. A fração viva geralmente não ultrapassa de 1 a 5% do total de materiais orgânicos. Desta, 5 a 10% são raízes, 60 a 80% são microrganismos e de 15 a 30% são componentes da macrofauna, portanto, a maioria da matéria orgânica viva do solo é protoplasma microbiano, representando a biomassa microbiana (SIQUEIRA; MOREIRA, 2002c).

A fração biológica é um dos principais componentes do solo. Essa fração é composta por comunidades de pequenos animais (mesofauna) e microrganismos (microfauna e microflora). Muitas das propriedades dos solos são decorrentes da atividade biológica, sendo comum dizer-se que um solo sem atividade biológica é um solo sem vida. As relações e interações entre as diferentes comunidades de organismos do solo contribuem para a manutenção da sua vida, e para diversos outros processos que, por sua vez, estão intimamente ligados à cadeia trófica (ARAÚJO; HUNGRIA, 1994).

1.2 MICRORGANISMOS DO SOLO

Os microrganismos do solo, como bactérias (incluindo actinomicetos) e fungos, são responsáveis por inúmeras transformações físico-químicas de grande importância para a produção agrícola. Os resíduos orgânicos incorporados aos solos sofrem o ataque de microrganismos heterotróficos para dar atendimento às suas necessidades metabólicas, bem como para a formação de seus constituintes protoplásmicos. Durante este processo, normalmente ocorre liberação de gás carbônico (CO₂) para a atmosfera e oscilações no balanço de nitrogênio (N) do solo. Medições das variações da população microbiana pela liberação de CO₂, ou pelas concentrações de amônio (NH₄⁺) e nitrato (NO₃⁻) podem ser indicativos da vida microbiana do solo (NUERNBERG et al., 1984).

Os microrganismos estão diretamente envolvidos nos ciclos dos nutrientes no solo e a quantificação de grupos funcionais específicos pode indicar como esses processos estão ocorrendo. A amonificação ou degradação dos compostos nitrogenados orgânicos é o passo limitante da mineralização, realizada por uma grande diversidade de microrganismos amonificantes (ALEF, 1995; TSAI et al., 1992). Sua quantificação nos solos fornece um indicativo do processo de mineralização do nitrogênio (N) e do ciclo desse elemento no solo (Melloni *et al.*, 2001). Já a hidrólise da celulose, substrato orgânico mais abundante incorporado ao solo (30 a 60% dos resíduos vegetais), é feita por microrganismos celulolíticos e a quantificação dos mesmos fornece uma indicação do processo de mineralização de substratos orgânicos e do ciclo do C no solo (CERRI et al., 1992). A lignina é um polímero natural muito importante, responsável por 25% da fitomassa seca produzida, anualmente, na biosfera (35% da madeira). Sua importância deve-se, também, ao fato de que esse biopolímero é o mais abundante na biosfera e, também, recalcitrante em função do seu alto peso molecular e à estrutura tridimensional que confere alta estabilidade química. A degradação da lignina no solo se dá, principalmente, por grupos especializados de fungos pertencentes à ordem Agaricales (Basidiomicetos) e por alguns Ascomicetos. A hemicelulose é o segundo maior componente dos vegetais. É um polissacarídeo constituído por arranjos de pentoses (como a xilose e a arabinose), hexoses (como a manose, glicose e galactose) e, algumas vezes, por ácidos urônicos (como o glucurônico).

Exemplos de hemicelulose são xilanas, mananas e galactanas. Muitas enzimas são envolvidas na sua degradação, produzidas por fungos e bactérias, sendo os actinomicetos os que exercem ação mais prolongada. Bactérias do gênero *Bacillus* degradam xilanas. Diversos outros compostos constituintes da fitomassa e da fauna, como amido, lipídios, quitinas e proteínas, são decompostos no solo pela ação microbiana. Dentre os bons degradadores do amido estão os actinomicetos, que produzem ácidos orgânicos, CO₂ e dextrinas durante a decomposição. A cutina, lipídio que se assemelha à celulose por sua longa cadeia, pode ser atacada por bactérias (ex.: *Azotobacter* e *Streptomyces*) e fungos (ex.: *Penicillium spinulosum*, *Rhodotorulla* sp.). A quitina é um importante componente do exoesqueleto de artrópodes, da parede celular de fungos, de algumas algas e de ovos de nematóides. Sua decomposição é feita por fungos e bactérias e resulta em glicose e amônia, as quais são utilizadas pela microbiota. As proteínas são os componentes dos seres vivos com maior teor de N. Embora possam ser facilmente decompostas por inúmeros microrganismos que produzem exoenzimas proteolíticas, no solo elas estão geralmente associadas a taninos, à lignina ou às argilas, o que aumenta a resistência destas substâncias à decomposição e, conseqüentemente, sua persistência no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002c).

1.3 BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO

A biomassa microbiana do solo é definida como parte viva da matéria orgânica do solo, composta por todos os organismos menores que $5 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$, como fungos, bactérias (incluindo actinomicetos), leveduras e microfauna, como os protozoários. É a principal fonte de enzimas no solo, sendo responsável pela quase totalidade de atividade biológica deste, catalisando as transformações bioquímicas, representando fonte e dreno de C e troca de nutrientes entre a atmosfera e o ecossistema solo-planta (SIQUEIRA; MOREIRA, 2002d).

O conceito de que, para determinados estudos, toda a população microbiana poderia ser tratada como um todo foi proposto por Jenkinson (1966). Para se ter uma idéia da diversidade e quantidade de microrganismos, Ritz et al. (1994) citam que 1 cm^3 de solo sob pastagem pode conter milhões de bactérias,

milhares de protozoários, centenas de metros de hifas de fungos, centenas de fungos, insetos e outros organismos maiores.

A dinâmica da biomassa microbiana está estreitamente correlacionada à dinâmica da matéria orgânica do solo. A maioria dos sistemas naturais é fortemente limitada por nutrientes (GOTTSCHAL, 1990), o que faz com que os microrganismos tenham crescimento lento, ou mesmo fiquem em estado dormente. Nessas condições, as células ficam estressadas e, durante longos períodos, pode ser constatada a ausência de replicação do cromossomo (CHESBORO et al., 1990).

Os trabalhos envolvendo análise da biomassa microbiana do solo podem fornecer informações extremamente úteis sobre a dinâmica de um reservatório lábil da matéria orgânica do solo. Isso pode ter conseqüências importantes no funcionamento do ecossistema e na “qualidade” do solo, refletindo, a longo prazo, na produtividade (WARDLE, 1994).

A manutenção e a produtividade de ecossistemas e de muitos agrossistemas dependem, em grande parte, do processo de decomposição da matéria orgânica no solo, realizado pelos microrganismos, e da conseqüente mineralização dos nutrientes presentes nessa matéria orgânica (GRISI; GRAY, 1986). Nesse contexto, a biomassa microbiana do solo representa importante indicador ecológico, pois é responsável pela decomposição e mineralização dos resíduos vegetais e animais no solo, sendo considerada como um reservatório de nutrientes e de energia potencialmente disponíveis para as plantas (JENKINSON; LADD, 1981). Sabe-se, também, que a microbiota é o principal agente na biodegradação, tanto da biomassa disponível, quanto de xenobióticos que atingem ou são aplicados no solo (SUETT et al., 1996; PAGGA, 1997)

A estimativa da biomassa de microrganismos fornece dados úteis sobre mudanças nas propriedades biológicas do solo, efeito de fertilizantes e biocidas em geral. Além disso, a determinação da biomassa permite avaliar as mudanças edáficas de maneira mais rápida do que as propriedades em análises químicas do solo (GRISI; GRAY, 1986).

O carbono (C) contido na biomassa microbiana é o destino inicial do carbono em transformação no solo e funciona como energia armazenada para os processos microbianos, para a síntese da parede celular, etc. Por apresentar

respostas rápidas a alterações na matéria orgânica (RICE et al., 1996) pode ser um indicativo da qualidade do solo (DICK et al., 1996).

Como a decomposição e a mineralização dos resíduos vegetais dependem da atividade microbiana, a avaliação da biomassa microbiana fornece informações importantes para o entendimento da ciclagem de nutrientes (PAUL; CLARK, 1989). Por apresentar rápida ciclagem, este atributo microbiológico responde intensamente a flutuações sazonais de umidade e temperatura, ao cultivo e ao manejo de resíduos, sendo um indicador mais sensível das mudanças nos níveis de matéria orgânica do que o teor de C orgânico (ANDERSON; DOMSCH, 1989; SPARLING, 1997).

A comunidade microbiana do solo é influenciada pela temperatura, umidade e aeração do solo, disponibilidade de nutrientes e pelos substratos orgânicos. Esses fatores, por sua vez, podem ser modificados pelo sistema de manejo, em função da deposição dos resíduos das culturas anteriores e do grau de revolvimento do solo (VARGAS; SCHOLLES, 2000)

O manejo do solo e de sua cobertura vegetal refletem em suas características físicas, químicas e biológicas. A calagem e a adubação mineral ou orgânica favorecem o desenvolvimento microbiano de forma direta, pelo aumento do pH e pela disponibilidade de nutrientes às células dos microrganismos e, de forma indireta, pela maior produção vegetal, que acarreta em incrementos tanto na atividade rizosférica, como dos resíduos adicionados ao solo (CATTELAN; VIDOR, 1990). O solo adjacente às raízes sofre grande influência destas, principalmente devido aos exsudatos e aos tecidos radiculares mortos que vão sendo destacados. Os exsudatos são mais prontamente disponíveis aos microrganismos do que os resíduos vegetais (LYNCH, 1984). Esse estímulo rizosférico aos microrganismos varia com a espécie vegetal, sendo, para as leguminosas, geralmente mais pronunciado por unidade de raiz. No entanto, as gramíneas, por seu sistema radicular mais desenvolvido e de renovação mais intensa, apresentam efeito total maior do que as leguminosas (ROVIRA, 1978; LYNCH, 1984). O manejo dos restos culturais e o grau de preparo do solo afetam sua temperatura, umidade, aeração e distribuição desses resíduos na camada arável. Desse modo, tais práticas exercem grande influência sobre a biomassa e sobre a atividade da população microbiana, que respondem de maneira muito mais rápida a essas alterações do que os parâmetros edáficos, como o teor de matéria orgânica e outras propriedades

químicas e físicas do solo que pode levar anos para apresentar mudanças significativas (CATTELAN; VIDOR, 1990; BALOTA et al., 1998). Contudo, mais estudos precisam ser conduzidos, particularmente nas condições dos solos brasileiros, visando padronização das metodologias utilizadas para avaliações qualitativas e quantitativas da microbiota do solo, bem como para a definição de valores relacionados à qualidade do solo.

1.4 DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO

As comunidades microbianas que ocorrem nos solos são constituídas por várias espécies, que ocupam os diferentes nichos disponíveis. As populações dominantes são as maiores responsáveis pelos fluxos de matéria e de energia na comunidade, as espécies menos abundantes são as que mais contribuem para a diversidade biológica (ATLAS ; BARTHA, 1997). Uma diversidade elevada de espécies contribui para o uso mais eficiente dos recursos disponíveis (TÓTOLA; CHAER, 2002).

A diversidade é a variedade de espécies em um ecossistema, assim como a variabilidade genética dentro de uma espécie. A diversidade biológica, ou biodiversidade, pode ser também definida como a riqueza da porção viva do ecossistema, que se reflete na variedade de espécies e nas intrincadas inter-relações dos processos biológicos que ocorrem nos vários biomas (TÓTOLA; CHAER, 2002).

A biodiversidade do solo refere-se a uma variedade de grupos taxonômicos, incluindo bactérias, fungos, protozoários, nematóides, minhocas e artrópodes (Van BRUGGEN; SEMENOV, 2000). Diversidade é um assunto que envolve todos os níveis de organização biológica, desde molecular até global. A diversidade de microrganismos é tão vasta quanto desconhecida. Hoje, cerca de 160.000 espécies de microrganismos são conhecidas e descritas na literatura. Destas, metade é representada por fungos. O número de novas descobertas também é representativo. A cada ano, uma média de 1.700 e 120 novas espécies de fungos e bactérias, respectivamente, são descritas na literatura. Não se sabe ao certo o número de espécies microbianas existentes na Terra, porém, algumas

estimativas, consideradas por alguns como conservadoras apontam para um número provável total em torno de 1,8 milhões de espécies (HAWKSWORTH, 1992).

Atividades antrópicas podem afetar o funcionamento e diminuir a diversidade dos ecossistemas, resultando em desequilíbrios ecológicos de conseqüências imprevisíveis e na extinção de espécies essenciais à manutenção do ecossistema (MELLO; AZEVEDO, 1998)

O uso intensivo de muitos ecossistemas tem contribuído para a redução da diversidade de espécies (TÓTOLA; CHAER, 2002). As diferentes práticas agrícolas afetam fortemente o ambiente do solo, causando distúrbios na sua comunidade microbiana, que podem, por sua vez, influenciar os processos bioquímicos do solo. Como exemplo, os distúrbios físicos causados no solo pela aração e pelo manejo de resíduos são fatores cruciais determinantes da atividade da biota do solo e da diversidade de espécies nos agroecossistemas (Altieri, 1999). Como exemplo da importância da diversidade, Reber (1992) verificou menor ciclagem de nutrientes e crescimento de plantas quando houve um decréscimo na diversidade microbiana do solo.

A pesquisa em biodiversidade é fundamental em vários aspectos, como por exemplo: para expandir as fronteiras do conhecimento acerca das estratégias e limites da vida, especialmente em relação à vida em condições extremas; na ainda desconhecida diversidade microbiana deve residir novos genes e organismos valiosos para a biotecnologia; os padrões de diversidade de microrganismos podem ser usados para prever e monitorar mudanças ambientais; os microrganismos desempenham papel fundamental na conservação e restauração biológica de organismos superiores e áreas ambientais degradadas (YOUNG, 1997). Os microrganismos representam o conjunto mais rico em diversidade química e molecular na natureza. Além disso, constituem a base de processos ambientais básicos, tais como ciclos biogeoquímicos e cadeias alimentares, além de manterem relações vitais e refinadas entre si e com os organismos superiores (ROSADO; DUARTE, 2002).

Um grande avanço nos estudos de ecologia microbiana foi dado com o advento de técnicas moleculares, baseadas na análise do DNA de microrganismos, retirado diretamente dos ambientes naturais, sem a necessidade da multiplicação prévia das células (BENLLOCH et al., 1995). O estudo da microbiota utilizando meios de cultura apresenta grandes limitações (AMANN et al., 1995), já

que somente uma pequena porcentagem (0,1 a 0,5%) de microrganismos do solo podem ser cultiváveis em laboratório (TORSVIK et al., 1990). O emprego de técnicas moleculares se tornou possível a partir dos estudos de Pace et al. (1986), pioneiros nas análises de estrutura de comunidades microbianas utilizando as informações da seqüência de nucleotídeos do DNA ribossômico (rDNA). Esses genes são encontrados em todos os organismos vivos, pois estão relacionados com a síntese de proteínas ribossomais, são muito antigos e têm sido usados para derivar filogenias universais da vida. Além disso, os genes rRNA expressam estruturas secundárias altamente conservadas, que são consideradas para o alinhamento correto das seqüências destes genes finalmente, as moléculas de rRNA são abundantes nas células, tornando possível à identificação individual em cada célula, mesmo em comunidades microbianas complexas (WOESE, 1987; WEISBURG et al., 1991). De todos os genes ribossomais, o 16S rRNA é utilizado, atualmente, como método padrão para identificação de famílias, gêneros e, em adição a outras características, a espécies de bactérias e para fungos é o 18S rRNA (GARRITY; HOLT, 2001).

A variabilidade nas seqüências 16S rRNA pode ser avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE), que consiste na separação dos fragmentos específicos do DNA (como o rDNA 16S), em um gel de poliacrilamida com gradiente linear de formamida e uréia. As variações na composição de nucleotídeos dos diferentes fragmentos de DNA determinam seu comportamento de migração no gel, fazendo com que fragmentos diferentes terminem sua migração em posições diferentes (MUYZER, 1999).

1.5 A SOJA E SEUS PRODUTOS

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa herbácea anual cujo alto teor protéico de seus grãos (38%) em média, e sua fácil adaptação aos diversos tipos de clima e fotoperíodo, a colocam entre as principais oleaginosas do mundo (BERTRAND et al., 1987).

A transformação industrial dos grãos da soja possibilita a obtenção do óleo, da torta (resíduo da trituração dos grãos) e de farinha e, a partir destes,

produtos como: lecitina de soja, óleo alimentício, margarina, gorduras emulsionadas, leite de soja, queijo de soja, molho de soja e as proteínas vegetais texturadas (PVT), que são bastante utilizadas em substituição da carne (BERTRAND et al., 1987). Particularmente nos últimos anos, outros usos da soja têm sido revelados no campo da medicina (combate ao alcoolismo, tratamentos de câncer de mama e próstata) e na produção de tintas, colas e protetores solares (PINHO, 2004).

O aumento da demanda por alimentos protéicos por parte dos países desenvolvidos, a queda na oferta de outras matérias primas ricas em proteínas e a retração da produção de soja por parte dos Estados Unidos nas décadas de 1960 e 1970 são responsáveis pelas excelentes cotações que a soja alcançou a partir de 1973 no mercado internacional (ZANLORENZI, 1992). Fatores edafo-climáticos favoráveis à sojicultura e o apoio governamental brasileiro a essa cultura foram fundamentais para sua rápida expansão no Brasil (MUELLER, 1992).

Atualmente a soja é cultivada em mais de 80 países, gerando mais de 162 milhões de toneladas métricas de grãos (BORÉM, 2005).

Os maiores produtores de soja (80% da produção mundial) são: Estados Unidos, Brasil, Argentina e China. Os três primeiros são responsáveis por 90% da comercialização mundial da oleaginosa, sendo o Brasil o segundo maior exportador, já a China, consome sua produção internamente (ARANTES; SOUZA, 1993).

1.6 PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

Há mais de 10 mil anos o homem passou a cultivar os alimentos de que necessitava para a sua subsistência. Além disso, aos poucos, começou a perceber que poderia selecionar e plantar as sementes mais resistentes e que produziam melhores frutos. Essa prática foi muito importante para a evolução da agricultura sendo que, hoje em dia, é possível haver grãos de diferentes aparências e com resistência às mais diversas intempéries do tempo. Esses costumes foram ensinados de geração para geração e foram aprimorados gradativamente, contudo, os cruzamentos foram feitos sempre entre plantas da mesma espécie ou espécies afins (BARROS et al., 2005).

Nas últimas décadas, com ajuda da ciência e da tecnologia, as empresas conseguiram modificar os métodos de cruzamento entre plantas e animais. As novas descobertas na área do melhoramento de plantas, com o aprofundamento do estudo da genética, trouxeram um novo produto para o mercado: os **transgênicos**, também conhecidos como **OGM** (*organismos geneticamente modificados*). Nos dias atuais, em que a preocupação com a saúde pública e com o meio ambiente tornam-se cada vez mais evidentes, o avanço da ciência e da tecnologia tem papel fundamental na vida em sociedade, assim como nas relações internacionais. Entretanto, muitas vezes o aprimoramento tecnológico pode gerar profundas controvérsias em relação aos aspectos morais, éticos, sociais ou econômicos. Nesse contexto, tem havido controvérsia em relação aos OGMs.

Uma das questões que ainda permanecem pendentes quanto aos OGMs refere-se aos impactos e riscos da liberação em larga escala de plantas transgênicas no meio ambiente. Atualmente, existem produtos como a soja, o milho, a canola, a batata e o algodão geneticamente modificados para que resistam a insetos e tolerem herbicidas, que já são cultivados em 20 países em escala comercial (aproximadamente 81,7 milhões de hectares) e consumidos por inúmeras nações.

Entre elas, Europa, Japão, China, Brasil, Índia, Paquistão, Argentina, Canadá, Estados Unidos, México, Uruguai, Colômbia, África do Sul e Filipinas, entre outros países. Os Estados Unidos respondem por cerca de 59% do cultivo mundial de transgênicos, seguidos da Argentina (20%), Canadá (6%), Brasil (6%), China (5%), Paraguai (2%), Índia (1%) e África do Sul (1%). O Brasil cultivou 5 milhões de hectares de soja transgênica em 2004, um aumento de 66% em relação a 2003 (FINARDI et al., 2005).

As exportações de soja cresceram consideravelmente nos últimos anos. O Brasil passou de 15 milhões de toneladas de grãos na safra 2000/2001 para mais de 20 milhões na safra 2003/2004. Já a Argentina, que adotou a soja transgênica na safra 1996/1997, apresentou o maior crescimento relativo nas exportações, passando de 3 milhões de toneladas naquele período para mais de 10 milhões em 2003/2004. Ambos os países têm como principais compradores a China e a União Européia (FINARDI et al., 2005).

Mudanças no solo e no manejo de culturas devido ao crescimento do cultivo de culturas transgênicas, assim como práticas de plantio e uso de

pesticidas podem ter efeitos positivos e negativos no meio ambiente (Council for Agriculture Science e Technology, 2002; NOTTINGHAM, 2002, apud: MOTAVALLI et al., 2004). Algumas pesquisas têm estudado os impactos ambientais de culturas transgênicas, contudo, poucos estudos referentes aos efeitos dessas culturas nos processos mediados pela biota do solo foram realizados (O'CALLAGHAN; GLARE, 2001; BRUINSMA et al., 2003). Entre as principais funções da biota do solo estão a decomposição da matéria orgânica, mineralização e imobilização. A ciclagem de nutrientes incluindo reações de oxidação-redução é outro processo fundamental mediado pela microbiota do solo (MOTAVALLI et al., 2004).

A preocupação com a diversidade biológica em consequência da liberação de OGMs decorre da possibilidade de liberação do transgene no ecossistema, ou de sua transferência e expressão para outras espécies. A adição de um novo genótipo numa comunidade de plantas pode proporcionar vários efeitos indesejáveis, como o deslocamento ou a eliminação de espécies não domesticadas, a exposição de espécies a novos patógenos ou agentes tóxicos, a geração de plantas daninhas ou pragas resistentes, a poluição genética, a erosão da diversidade genética e a interrupção da reciclagem de nutrientes e energia (NODARI; GUERRA, 2001). Há, ainda riscos, de alergias que podem ser causadas por substâncias tóxicas ao homem, produzidas pelas plantas para se defender de agressores. Outro problema seria a polinização cruzada com plantas nativas, pois o gene exterminador pode ser levado pelo vento junto com os grãos de pólen e fecundar as flores de plantas silvestres ou domésticas, podendo também torná-las estéreis, e provocando danos irreparáveis. Por outro lado, novas culturas transgênicas podem melhorar a resistência a condições de estresse e, resultar em plantas com melhores condições nutricionais e teores mais elevados de vitaminas, plantas com maior capacidade fotossintética e de FBN, e, plantas que produzam produtos industriais ou precursores, como por exemplo, bioplásticos, proteínas farmacêuticas e vacinas (NOTTINGHAM, 2002, apud: MOTAVALLI et al., 2004). Esses riscos implicam na necessidade antes da liberação em larga escala de uma cultivar transgênica, da condução de estudos de monitoramento do impacto ambiental que inclua a avaliação de riscos, passo a passo e caso a caso (NODARI; GUERRA, 2001).

Pode-se definir plantas transgênicas como aquelas que têm inserido, em seu genoma, uma ou mais seqüências de DNA manipulado em

laboratório por técnicas de DNA recombinante ou engenharia genética. Alternativamente, plantas transgênicas podem ser definidas como organismos que tiveram seu material genético alterado por métodos que não aqueles naturais, considerando-se como métodos naturais em plantas o acasalamento sexual e a recombinação genética. Do ponto de vista legal, no Brasil, OGM é o organismo cujo material genético (ADN/ARN) tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética (NODARI; GUERRA, 2001).

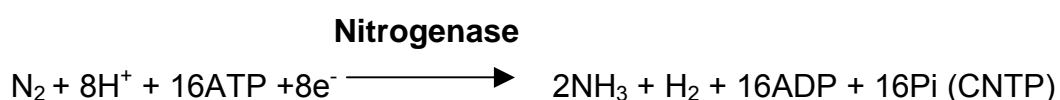
Na transgenia, seqüências de DNA (genes) podem ser removidas de um organismo, modificadas ou não, ligadas a outras seqüências, incluindo as regulatórias, e inseridas em outros organismos. A fonte desses genes pode ser qualquer organismo vivo (microrganismo, planta, animal) ou vírus. Assim, a Soja RR transgênica resistente ao Round-up, herbicida à base de glifosato, contém material genético da *Agrobacterium*, uma bactéria do solo (NODARI; GUERRA, 2001).

Em geral, são vários os motivos dessa manipulação nos genes dos organismos. Como primeiro exemplo pode ser citado o aumento do valor bioquímico, acrescentando nutrientes que antes não estavam presentes. Como segundo exemplo, a eliminação ou diminuição do uso de agrotóxicos, adicionando toxinas que matam os predadores. Defensores da transgenia afirmam que a técnica é segura e que será possível produzir alimentos mais baratos e mais nutritivos, como é o caso do arroz dourado, rico em vitamina A e da alface com vacinas para a prevenção de doenças. Seu cultivo será mais eficiente do que o convencional, aumentando a produção agrícola do planeta, e para os mais otimistas, esta poderia ser a solução para abastecer a crescente população mundial (GIANOTTO, et al., 2005). É apontado, pelos defensores dos produtos transgênicos, que a utilização de cultivares resistentes a insetos proporcionará sensível redução no uso de agrotóxicos. Mesmo no caso da tolerância a herbicidas, em que haverá maior aplicação de um determinado tipo de produto, crê-se que possa haver uma redução na quantidade total desses agroquímicos aplicados na lavoura. No caso da soja, por exemplo, deixar-se-á de aplicar herbicidas pré-emergentes e os seletivos pós-emergentes, substituindo-os por uma ou duas aplicações, pós-emergentes, de um herbicida de largo espectro a que a cultura seja tolerante e que se decomponha no solo de forma rápida. Afirma-se que os herbicidas como o Glifosate, o Bromoxynil, a Sulfonylurea e as Imidazolinones apresentam tais características (ARAÚJO et al., 2001).

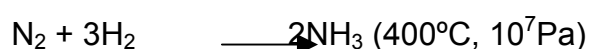
Alguns alimentos estão sendo pesquisados pelos cientistas, inclusive no Brasil e em breve, devem estar disponíveis aos consumidores, como: o tomate com teores mais elevados de licopeno, um antioxidante que ajuda a prevenir o câncer e doenças do coração; arroz com maior teor de betacaroteno, que estimula a produção de vitamina A; grãos com maior teor de vitamina E, que fortalece o sistema imunológico; alface enriquecida com um composto que ajuda a diminuir o mau colesterol (LDL) e estimula o aumento do bom colesterol (HDL); arroz, trigo e feijão com mais ferro, importantes no combate à anemia; frutas com maior teor de vitamina C; alimentos com menor nível de micotoxinas, substâncias tóxicas produzidas por bolores que podem provocar doenças como o câncer, diminuir a resistência do corpo e dar origem a hemorragias (FINARDI et al., 2005).

1.7 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO ATMOSFÉRICO (N₂) COM A CULTURA DA SOJA

A maior parte do nitrogênio (N) no planeta (93,8%), está na crosta terrestre. Os 6,2% restante estão na ecosfera. Nesta, 99,96% do nitrogênio (N) está na forma de Nitrogênio atmosférico (N₂) e, demais 0,04%, nas formas combinadas orgânicas ou inorgânicas existentes nos ecossistemas aquáticos e terrestres (Roswall, 1979). Os animais, os vegetais e a maioria dos microrganismos dependem dessa parcela de N nas formas combinadas, pois o imenso reservatório de N₂ que compõe cerca de 78% da atmosfera não é acessível a todos os eucariotos (incluindo as plantas) e à maioria dos procariotos. Apenas uma parcela relativamente pequena das espécies de procariotos possui o complexo enzimático da nitrogenase, que é capaz de reduzir o N₂ para a forma inorgânica combinada NH₃, que pode então se tornar disponível para plantas e outros organismos. Estes organismos são chamados de fixadores de N₂ ou diazotróficos e o processo que mediam – a Fixação Biológica de N₂ (FBN) – é representado pela seguinte equação (SIQUEIRA; MOREIRA, 2002b).



O nitrogênio atmosférico (N₂) também pode ser fixado, ou seja, transformado em NH₃ através de processos químicos industriais, como o Haber-Bosch, responsável por parte significativa dos fertilizantes nitrogenados usados nos sistemas agrícolas e florestais. Como a ligação tripla que une os dois átomos de nitrogênio é muito forte, para seu rompimento através da fixação industrial são necessárias temperaturas (>400°C) e pressões elevadas (>10⁷ Pascal) obtidas através de derivados de petróleo, elevando os custos de produção (SIQUEIRA; MOREIRA, 2002b).



No processo biológico a energia utilizada é o ATP, produzido através da energia solar convertida em energia química, ou seja, uma fonte renovável. Embora a contribuição dos processos industriais seja bastante significativa em se tratando dos ecossistemas manejados agrícolas e florestais, se forem considerados também os ecossistemas naturais, o processo biológico contribui com a maior parte do nitrogênio fixado anualmente – 1,75x 10⁶ toneladas, ou seja, 65% do total, o que o faz ser considerado o segundo processo biológico mais importante do planeta, somente superado pela fotossíntese (SIQUEIRA; MOREIRA, 2002b).

Diversas leguminosas como a soja podem suprir suas necessidades de N por três fontes: (a) N do solo, proveniente da decomposição da matéria orgânica e das rochas; (b) N fornecido pelos fertilizantes, e (c) N atmosférico (N₂), o qual é biologicamente fixado por bactérias simbiotes dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium* e *Azorhizobium* (SIQUEIRA; FRANCO, 1988; HUNGRIA et al., 1994; VARGAS; HUNGRIA, 1997).

O solo representa uma fonte limitada de nitrogênio (N), facilmente esgotável após algumas culturas e os fertilizantes nitrogenados, além de apresentarem um custo elevado, contribuem para a poluição de rios e lagos. Já o Nitrogênio atmosférico (N₂), possui uma forte ligação entre os átomos de N que não é quebrada por nenhuma planta ou animal, mas apenas por bactérias diazotróficas, incluindo os rizóbios (HUNGRIA et al., 1997). Do ponto de vista econômico e ecológico, o processo de fixação biológica de N₂ é considerado de grande importância, particularmente nos países em desenvolvimento. Atualmente, no Brasil, não são mais recomendados fertilizantes nitrogenados para a cultura da soja, pois

esse processo é capaz de suprir totalmente as necessidades de nitrogênio (N) da planta (HUNGRIA et al., 1994, 1997; VARGAS; HUNGRIA, 1997).

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N₂) ocorre em estruturas típicas e altamente específicas, os nódulos, que são formados após o estabelecimento da simbiose entre o microssimbionte e a planta hospedeira (SIQUEIRA; FRANCO, 1988; HUNGRIA et al., 1994, 1997; VARGAS; HUNGRIA, 1997). O processo da nodulação envolve múltiplas etapas e a expressão de genes específicos da planta hospedeira e da bactéria. O processo inicia com a excreção, pela planta hospedeira, de compostos que, inicialmente, facilitam a colonização rizosférica, estimulando o crescimento do rizóbio (KIJNE, 1992). O movimento do rizóbio também depende do gradiente de umidade do solo e, conseqüentemente, as condições de seca podem limitar consideravelmente a aproximação até as raízes (HAMDI, 1971).

Em seguida, as bactérias aderem aos pêlos radiculares da plantas, em um processo relativamente estável e irreversível, que ocorre em duas etapas: primeiro, as células isoladas aderem à superfície radicular, provavelmente a sítios específicos e, a seguir, outras bactérias aderem às que já estão presas aos pêlos radiculares (HALVERSON; STACEY, 1986).

Outra etapa da infecção, que ocorre simultaneamente com a adesão, se refere à troca de sinais moleculares entre a planta hospedeira e o microssimbionte. A troca de sinais moleculares inicia com a exsudação, pela planta hospedeira, de moléculas indutoras dos genes nod e que foram identificadas, em diversas leguminosas, como compostos fenólicos e flavonóides (HUNGRIA; STACEY, 1997).

O Fator NOD é responsável, entre outras coisas, pelo reconhecimento entre bactéria e planta hospedeira e pela indução de uma intensa divisão celular no córtex da raiz. Na etapa seguinte, os rizóbios penetram na raiz, pela extremidade do pêlo da qual a planta forma, por deposição de um material semelhante à parede celular, uma estrutura denominada **cordão de infecção**, na qual as bactérias proliferam. Ao mesmo tempo, as células do córtex da raiz começam a se dividir, formando o primórdio do nódulo (TATÉ et al., 1994). Os cordões de infecção penetram nas células vegetais desses primórdios, em cujo citoplasma as bactérias são liberadas envoltas em uma membrana e, em seguida, os primórdios diferenciam-se em nódulos e as bactérias aumentam de tamanho e

sofrem várias alterações bioquímicas para se transformarem em bactérias especializadas na fixação de nitrogênio, os bacterióides (Taté *et al.*, 1994). Para diferenciar as duas fases da vida desses microrganismos, convencionou-se que o nome bactéria seria utilizado enquanto não ocorressem as transformações bioquímicas que iniciam o processo de fixação de nitrogênio. Portanto, quando os microrganismos passam a fixar nitrogênio são chamados de bacterióides.

Quando o nódulo está formado, são sintetizadas as enzimas relacionadas com a quebra de tríplice ligação do nitrogênio atmosférico (N_2) e com a assimilação do nitrogênio fixado, iniciando-se o processo (BREWIN, 1991; FRANSSEN *et al.*, 1992; KIJNE, 1992; TATÉ *et al.*, 1994).

O produto da FBN nos nódulos, a amônia (NH_3), é transformada em íons amônio (NH_4^+), que são incorporados em esqueletos de carbono (C) ainda no próprio nódulo (SIQUEIRA; FRANCO, 1988; HUNGRIA *et al.*, 1994; VARGAS; HUNGRIA, 1997). Duas enzimas, a glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT), são responsáveis pela conversão do NH_4^+ em aminoácidos (HOPKINS, 1995; MYLONA *et al.*, 1995). Os principais produtos que são exportados dos nódulos para as plantas hospedeiras são as amidas (principalmente asparagina e, em menor porcentagem, a glutamina) e os ureídos (alantoína e ácido alantóico) (SPRENT, 1980; ATKINS, 1991). Sabe-se que leguminosas de origem temperada (ex. ervilha), normalmente, sintetizam a asparagina, que será utilizado para a exportação de nitrogênio para o restante da planta. Da mesma forma, as leguminosas de origem tropical (ex. soja), freqüentemente, produzem ureídos para a exportação do nitrogênio ao longo do organismo vegetal. O maior transporte de N como amida ou ureídos varia com a espécie de leguminosa (SPRENT, 1980; ATKINS, 1991)

Na soja nodulada, cerca de 90% do N total da seiva do xilema é transportado na forma de ureídos (NEVES *et al.*, 1985; HUNGRIA *et al.*, 1989, 1994). Há indicações de que os sistemas simbióticos mais eficientes transportam uma porcentagem mais elevada de N-ureído que, inclusive, parece ser mais facilmente translocada para os grãos (YONEYAMA, 1984 a,b; NEVES *et al.*, 1985; NEVES; HUNGRIA, 1987; HUNGRIA *et al.*, 1989, 1994).

1.8 A SOJA TRANSGÊNICA

A expansão e modernização da agricultura em geral originaram impactos de ordem socioambiental nas diferentes áreas ocupadas pelo cultivo de soja, colocando em cheque a sua sustentabilidade (MUELLER, 1995). Políticas agrícolas que considerem a totalidade e a biodiversidade do ambiente agrícola do país, baseadas no conhecimento amplo dos recursos naturais, das condições agroecológicas, da produção nos espaços geográficos e dos padrões de ocupação são bastante pertinentes (MEDEIROS, 1998). A otimização da utilização dos espaços já ocupados pela sojicultura é uma saída para o aumento da produção sem a devastação dos biomas (ABRAMOVAY, 1999).

A questão da produção da soja transgênica no Brasil é tema de discussão nos setores sociais, econômicos e ambientais do país. Os argumentos favoráveis à liberação do cultivo de soja transgênica se baseiam, principalmente, na não comprovação de casos resultantes da associação entre consumo de produtos transgênicos e danos à saúde e no menor custo de produção deste produto (CATANHÊDE; SOLIANI, 2003). No entanto, organizações ambientalistas e o Instituto de Defesa do Consumidor (Idec) alegam não existir estudos que comprovem a segurança desta variedade de soja para o consumo humano e para o ambiente (LEITE, 2000).

Plantas daninhas constituem um dos principais fatores limitantes na produção agrícola da cultura da soja. Dependendo das espécies daninhas prevaletentes, herbicidas como a trifluralina, o metribuzin e outros são aplicados. A soja RR, obtida via transformação gênica foi desenvolvida para ser tolerante ao herbicida glifosato, visando permitir seu uso no controle de plantas daninhas. Essas variedades de soja possuem uma forma modificada da enzima EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase), que permite à planta sobreviver à aplicação do herbicida glifosato. O gene inserido nessas variedades foi extraído da bactéria natural do solo *Agrobacterium tumefaciens* estirpe CP4, que vem sendo largamente utilizada em transformação gênica nos últimos 17 anos. É considerada segura para o homem e animais, não havendo nenhuma evidência ou relato de qualquer efeito adverso por ela causado (BORÉM, 2005).

Dados de campo da soja RR mostraram ausência de efeitos adversos em organismos-não-alvos, sugerindo que a enzima EPSPS modificada presente nos tecidos da planta transgênica não foi tóxica aos organismos benéficos encontrados na natureza. A proteína CP4 EPSPS não resultou em toxicidade alterada ou alergenicidade, como demonstrado em estudo com dose oral aguda e crônica com ratos e animais em laboratório (COSTA; BORÉM, 2003).

A introgressão do gene de tolerância ao glifosato da soja RR é extremamente improvável de acontecer, uma vez que no Brasil e demais países da América nenhum parente da soja cultivada é encontrado além da soja possuir autofecundação, com taxa de fecundação cruzada em geral menor que 1% (BORÉM, 2000; SEDIYAMA et al., 1999).

A soja cultivada (*Glycine Max*) cruza naturalmente com a espécie silvestre *G.soja*. Porém, esta só ocorre naturalmente na China, na Coreia, no Japão, em Taiwan e na Rússia e não é encontrada no meio ambiente no Brasil. Desta forma, a probabilidade de transferência da característica tolerância ao glifosato da soja RR para seus parentes ou para outras espécies por fluxo gênico, é pequena. Como não há nenhum parente silvestre da soja no Brasil e esta não é uma espécie invasiva e colonizadora, a característica tolerância ao glifosato seguramente não será transferida a outras espécies, modificando a biodiversidade nativa presente no Brasil (BORÉM, 2005).

Nos Estados Unidos, a soja resistente ao glifosato foi, primeiramente, comercializada em 1996 e tem sido amplamente adotada pelos agricultores. A área plantada com soja resistente ao glifosato nos EUA aumentou de 2% em 1996 para 81% em 2003 (CARPENTER; GIANESSI, 2001; Council for Biotechnology Information, 2002).

O glifosato é um herbicida de aplicação foliar, tem largo espectro (FRANZ et al., 1997), tem vida curta no solo (TORSTENSSON; HAMISSEPP, 1977). A introdução da soja transgênica resistente ao glifosato trouxe novas oportunidades para o controle de plantas daninhas, que pode substituir ou reduzir o uso de herbicidas pré-emergentes (CARPENTER; GIANESSI, 2001; REDDY, 2001). Um dos benefícios da aplicação pós-emergente do glifosato é a facilidade na conservação das práticas de manejo, assim como o plantio direto ou cultivo mínimo do solo, que conserva energia e reduz a erosão (BARNES, 2000).

Várias espécies de bactérias do solo podem metabolizar o glifosato, por exemplo, *Pseudomonas sp.* (JACOB et al., 1988), *Arthrobacter sp.* (Pipke et al., 1987) e certos membros da *Rhizobiaceae* (LIU et al., 1991), incluindo *Sinorhizobium Melioli*, *Rhizobium trifolii*, *R. leguminosarium*, *Agrobacterium rhizogenes* e *A. tumefaciens*. Essas bactérias possuem a liase carbono-fosfato, que hidroliza o glifosato para as formas sarcosine e fosfato inorgânico, permitindo, a eles, utilizar o glifosato como sua única fonte de fósforo (ZABLOTOWICZ; REDDY, 2004).

Nos Estados Unidos, a FBN não representa um fator determinante para a produção da soja. Desse modo, os efeitos da transgenia e do glifosato foram pouco estudados.

Os efeitos do glifosato sobre nodulação da soja resistente ao glifosato foram avaliados por Reddy et al. (2000) e King et al. (2001) em experimentos em casa de vegetação. Em ambos os estudos os parâmetros de nodulação da soja resistente ao glifosato foram significativamente reduzidos pela aplicação do glifosato.

Os estudos de Reddy et al. (2000) avaliaram a aplicação foliar de duas concentrações do sal isopropilamina do glifosato aos 14 e 21 dias após o plantio sobre os parâmetros de nodulação da soja resistente ao glifosato (DP5806RR) tratada com um inoculante comercial. No estudo 1, a aplicação de 0,84kg/ha reduziu significativamente o número de nódulos (28%), massa de nódulos (47%); no entanto, a aplicação de 1,68kg/ha não produziu efeito sobre a nodulação. No estudo 2, uma aplicação mais cedo de glifosato não causou efeito sobre a nodulação; contudo uma aplicação de 1,68kg/há três semanas após o plantio reduziu o número de nódulos (30%), massa de nódulos (39%) e nitrogênio total da parte aérea (14%)

Nos estudos realizados por King et al. (2001), uma aplicação de glifosato (1,26kg/ha) a 5 a 12 dias após a emergência (DAE) reduziu significativamente a biomassa de nódulos em 33% e o nitrogênio total da parte aérea foi reduzido de 34 a 36%. A aplicação a 18, 25 e 32 dias após a emergência (DAE) não teve efeito sobre a biomassa de nódulos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar um conjunto de parâmetros para serem utilizados em estudos de análise de risco ambiental, pelo uso de novas tecnologias associadas à cultura da soja, à microbiota do solo e à fixação biológica do nitrogênio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e validar, em escala de cultivo comercial (*Ensaio 1*) e de áreas experimentais (*Ensaio 2*), um conjunto de parâmetros para a avaliação, a campo, de riscos à microbiota do solo pelo uso de novas tecnologias com a cultura da soja, como por exemplo, cultivares transgênicas.
- Identificar e validar, em escala de cultivo comercial (*Ensaio 1*) e de áreas experimentais (*Ensaio 2*), um conjunto de parâmetros para a avaliação, a campo, de riscos à fixação biológica do N₂ pelo uso de novas tecnologias com a cultura da soja, como por exemplo, cultivares transgênicas.
- Avaliar parâmetros quantitativos da microbiota do solo: C e N da biomassa microbiana - CBM e NBM; respiração basal - RB; e quociente metabólico microbiano - qCO_2 .
- Analisar qualitativa a comunidade bacteriana do solo pela técnica de PCR-DGGE.
- Avaliar parâmetros como: número de células de rizóbios no solo; número - NN e massa de nódulos secos - MNS; identificação sorológica das estirpes ocupando os nódulos; massa da parte aérea seca - MPAS; N total na parte aérea - NTPA e o N proveniente da fixação do N₂ sob a forma de ureídeos - NTU.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREAS EXPERIMENTAIS

Foram realizadas avaliações em dois conjuntos de ensaios, conduzidos por duas safras (2002/2003 e 2004/2005) e distribuídos nas principais regiões produtoras de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] (Tabela 1).

A avaliação em plantio comercial (2002/2003) foi conduzida em propriedades de agricultores com soja convencional. A avaliação em áreas experimentais foi conduzida com soja convencional e seu respectivo evento transgênico com tolerância a herbicida e com a aplicação de herbicida convencional ou herbicida específico para o evento transgênico. No caso dos experimentos incluindo o evento transgênico, todas as estações experimentais possuíam “Certificado de Qualidade em Biossegurança” (CQB) e as ATECs (Autorização Temporária para Experimento de Campo). Além disso, todos os procedimentos foram realizados de acordo com a legislação brasileira para liberação e manipulação de OGMs, seguindo as instruções normativas da CTNBio.

3.1.1 Experimento com soja convencional em propriedades de agricultores na safra 2002/2003

Os experimentos foram instalados e conduzidos na safra 2002/2003, em propriedades de agricultores localizadas em seis municípios tradicionais de produção de soja (São Luiz Gonzaga, Passo Fundo, Ponta Grossa, Cascavel, Londrina, Dourados). Informações sobre a localização, clima e tipo de solo em cada município constam da Tabela 1. Os ensaios nessas propriedades foram instalados no delineamento experimental em blocos ao acaso, com três repetições.

As coletas para as análises microbiológicas foram realizadas nos estádios V4 (terceira folha trifoliada estendida e a quarta aberta) e R2 (florescimento pleno: 50% das plantas de cada parcela no estádio de florescimento pleno) do

desenvolvimento da soja (escala de Fehr & Caviness, 1977). Os experimentos foram instalados, conduzidos, as coletas foram efetuadas e as amostras enviadas para o Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja, conforme descrito no item 2.1. Todas as áreas haviam sido cultivadas com soja por vários anos, recebido inoculantes e apresentavam populações estabelecidas de *Bradyrhizobium* (Tabela 4), entretanto, não foram disponibilizadas informações sobre a inoculação na safra 2002/2003, bem como sobre as cultivares utilizadas e o sistema de cultivo adotado. Nenhuma das áreas recebeu fertilizante nitrogenado.

3.1.2 Experimento com soja convencional e evento transgênico para tolerância a herbicida conduzido em estações experimentais na safra 2004/2005

Foram conduzidos sete ensaios em estações experimentais privadas ou da Embrapa localizadas em regiões produtoras de soja (Ponta Grossa, Londrina, Santo Antônio da Posse, Sete Lagoas, Santo Antônio de Goiás, Brasília, Planaltina) e as informações sobre os municípios constam da Tabela 1.

As cultivares de soja utilizadas foram a Conquista (=MG/BR 46: genealogia Lo76-4484 e Numbará; Lo76-4484 é uma seleção em Bragg e Numbará resultou da hibridação entre Davis e IAC71- 1113, APASSUL, 2005) e a Conquista evento transgênico, constituída de uma linhagem desenvolvido em parceria entre a iniciativa privada e a Embrapa, com características fenotípicas desejáveis e contendo uma cópia única de gene para tolerância a um herbicida específico. As condições edafoclimáticas de todos os locais são adequadas para o desenvolvimento da cultivar Conquista. Os ensaios foram conduzidos no sistema de plantio convencional e a precipitação e temperatura médias em cada local durante a condução do ensaio constam da Tabela 2. Os ensaios foram instalados, as amostras coletadas e enviadas para o Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja, conforme descrito no item 2.1. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia do Solo e na casa de vegetação da Embrapa Soja, ambos detentores de CQB.

As parcelas dos experimentos foram constituídas de quatro fileiras de 5 m de comprimento espaçadas por 0,5 m. O mesmo experimento foi instalado

nos diferentes locais e constou de três tratamentos: 1) Conquista evento transgênico com controle de plantas invasoras efetuado exclusivamente com o herbicida específico; 2) Conquista evento transgênico com controle de plantas invasoras efetuado com herbicidas convencionais; 3) Conquista convencional com controle de plantas invasoras efetuado com herbicidas convencionais. Os ensaios foram conduzidos com o delineamento experimental em blocos ao acaso, com quatro repetições.

A semeadura foi realizada manualmente nas épocas indicadas na Tabela 2. Todas as práticas culturais de preparo do solo, fertilização, irrigação, controle de pragas, etc, foram aplicadas uniformemente na área de cada ensaio, seguindo as normas de recomendações técnicas para a cultura da soja para a Região Sul ou Região Central do Brasil (EMBRAPA 2004a; EMBRAPA 2004b). Essas recomendações incluem a inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* e foi utilizado o inoculante comercial Cell-Tech da Nitragin, aplicado na dose de 600.000 células semente⁻¹. As condições climáticas durante a condução dos experimentos constam da Tabela 2. As coletas para as análises microbiológicas foram realizadas nos estádios de pré-plantio (PP), R2 e, em cinco locais, em R8 (maturação plena: 95% das plantas de cada parcela no estágio de maturidade plena, considerando-se maturidade quando 95% das vagens da planta estiverem maduras-secas, escala de FEHR; CAVINESS, 1977).

3.2 ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DA MICROBIOTA DO SOLO

3.2.1 Coleta do solo

De cada uma das parcelas foram coletadas sete subamostras deformadas de solo, da camada de 0-10 cm, na área total da parcela antes do plantio, ou nas entrelinhas após a germinação, utilizando-se uma pá reta; as amostras foram homogeneizadas e transportadas para o laboratório em um saco plástico. No laboratório, as amostras foram cuidadosamente homogeneizadas, retirando-se restos de raízes e resíduos vegetais que porventura estivessem no solo.

As amostras foram, então, peneiradas (4 mm, 5 mesh) e armazenadas em saco plástico, na geladeira, a 4°C por, no máximo, 10 dias, dando origem a uma amostra composta. Para a análise da diversidade microbiana, subamostras de cada amostra composta foram mantidas a -70°C, até o momento da análise.

3.2.2 Biomassa microbiana de carbono e de nitrogênio

Utilizou-se o método de fumigação-extração modificado de Vance et al. (1987) para a análise do carbono da biomassa microbiana (CBM) e de Brookes et al. (1985) para o do nitrogênio (NBM). Amostras de 20 g de solo foram fumigadas ou não com clorofórmio (CHCl_3) isento de álcool, durante a noite (aproximadamente das 16 h de um dia até às 9 h do outro dia) e o C e N foram extraídos com sulfato de potássio (K_2SO_4) 0,5 M. As amostras foram agitadas por 1 hora a 175 rpm, centrifugadas por 10 minutos a 2.500 rpm e filtradas em papel qualitativo, para análise do C e do N totais.

O teor de C nos extratos foi determinado colorimetricamente após oxidação com Mn^{3+} , segundo Bartlett e Ross (1988) e o teor de N nas mesmas frações foi determinado por digestão via úmida em bloco digestor a 350°C com ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado (BREMNER, 1965), com catalizador contendo sulfato de cobre (CuSO_4): K_2SO_4 (10:1) e determinação colorimétrica do N amoniacal (N-NH_4) pelo método de azul de indofenol (FEIJE; ANGER, 1972). O CBM e o NBM foram calculados pela diferença entre as amostras fumigadas e não-fumigadas utilizando um K_{CE} de 0,38 para o C (VANCE et al., 1987) e um K_{NE} de 0,54 para o N (BROOKES et al., 1985).

Cada amostra de solo (10 g) foi também colocada em frascos de 100 mL e o conjunto foi pesado. A seguir, os frascos foram colocados em estufa a 105°C, por uma noite. No dia seguinte, os frascos foram pesados para determinar a umidade do solo e, por diferença, a massa seca do solo. Os valores de biomassa microbiana obtidos foram corrigidos pela densidade e expressos em μg de C ou μg de N da biomassa microbiana g^{-1} de solo seco.

3.2.3 Respiração basal

A respiração foi avaliada pela determinação do C-CO₂ liberado em amostras não-fumigadas, incubadas por 10 dias e capturando o CO₂ em uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 N. Inicialmente, amostras de 100 g de solo não-fumigado foram pesadas em frascos de 300 mL e tiveram a umidade corrigida para 24% da capacidade de campo com água deionizada, deixando-se em repouso no escuro por 12 h, em temperatura ambiente. Após esse período, procedeu-se à incubação das amostras em potes de conserva de 2 L de capacidade, dentro dos quais, além do frasco contendo o solo de interesse, foram colocados um frasco de 100 mL contendo 50 mL de NaOH 0,5 N e um pote plástico (embalagem de filme fotográfico) com 20 mL de água. Para cada repetição foram colocados, como “branco químico”, quatro frascos sem solo, mas com NaOH 0,5 N e água deionizada. Vaselina foi adicionada na borracha de vedação dos frascos, os quais foram tampados. Os potes foram incubados no escuro, a 25°C, por 10 dias. Após o período de incubação, o NaOH presente nos potes de cada amostra foi titulado com ácido clorídrico (HCl) 0,2 N padronizado. Para isso, adicionou-se 1 mL de solução saturada de cloreto de bário (BaCl₂) a 20% para retirada de carbonato de sódio (Na₂CO₃) do meio, a cada frasco contendo 5 mL de NaOH (das amostras incubadas), 20 mL de H₂O deionizada e três gotas do indicador fenolftaleína (C₂₀H₁₄O₄), sob agitação. As amostras em branco também foram tituladas. Na presença de NaOH, não há formação de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), pois essas substâncias reagem entre si ($\text{OH}^- + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O}$), formando Na₂CO₃. Por sua vez, esse produto vai reagir com BaCl₂ e precipitar, retirando o carbonato do meio. Após a titulação do NaOH, procedeu-se ao cálculo do C-CO₂ liberado das amostras não-fumigadas, utilizando-se a fórmula: $\text{C-CO}_2 = (\text{B} - \text{V}) \times \text{N} \times \text{E}$ (onde V = mL de HCl gasto na titulação do NaOH; B = mL de HCl gasto para titular a prova em branco; N = normalidade do HCl; E = 6, equivalente grama do C). Os valores de respiração obtidos foram expressos em µg de C-CO₂ g⁻¹ solo seco dia⁻¹.

3.2.4 Quociente metabólico (qCO_2)

O qCO_2 representa a quantidade de CO_2 liberada por unidade de biomassa microbiana em um determinado tempo. Para a obtenção do qCO_2 foi feita a divisão da respiração basal (item 2.3) pela biomassa microbiana de C (item 2.2). Os valores foram expressos em (μg de C- $CO_2 \mu g^{-1}$ C microbiano h^{-1}) $\times 10^4$.

3.2.5 Composição bacteriana do solo avaliada em gel desnaturante (PCR-DGGE, Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Foram utilizadas as amostras de solo coletadas e compostas conforme descrito no item 2.1. Para a extração do DNA total do solo foram utilizadas amostras de 0,25 g de solo e o "Ultrapure™ Soil DNA Kit" (Mebio Laboratories USA), conforme especificações do fabricante. A pureza e concentração do DNA foram avaliadas em um gel de agarose a 1% em TBE 1X (10,8 g de Tris-base; 5,5 g de ácido bórico (H_3BO_3); 4 mL de EDTA ($C_{10}H_{16}O_8N$), 0,5 M, pH 8, para cada litro de solução), utilizando como peso padrão Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™-Life Technologies).

Foram realizadas duas reações de amplificação do DNA total do solo para a região que codifica o gene 16S rRNA. Inicialmente, o DNA foi amplificado com os "primers" rD1 (5'-ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e fD1 (3'-cccgggatccaagcttAAGGAGGTGATCCAGCC-5'), descritos por Weisburg et al. (1991), que amplificam praticamente toda a região do DNA que codifica para o gene 16S rRNA, ou seja, aproximadamente 1.500 pares de bases (pb). As letras em minúsculo correspondem às seqüências que marcam os produtos de PCR com sítios de restrição terminais, para propósitos de clonagem, e que podem ser omitidas dos "primers", se não forem requeridas. Foi preparada uma solução para a reação de amplificação com a utilização dos seguintes reagentes: dNTPs (desoxinucleotídeos trifosfato, dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (1,5 mM de cada base), 3,0 μL ; tampão 10X, 5,0 μL ; cloreto de magnésio ($MgCl_2$, 50 mM), 1,5 μL ; Taq DNA polimerase (1U); os "primers" fD1 e rD1 (15 pmol reação⁻¹); DNA (20 ng); água milli-Q estéril para

completar o volume final de 50 μ L. A amplificação foi realizada usando os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; 15 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos; 93°C por 45 segundos; anelamento dos “primers” a 55°C por 45 segundos, e extensão a 72°C por 2 minutos; a reação foi finalizada com manutenção a 4°C.

Na segunda reação, os produtos de PCR obtidos foram submetidos a uma nova amplificação, também com “primers” específicos para o 16S rRNA, mas codificando uma região menor: “primer” F 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGAACGCGAAGA ACCTC-3' e R 5'-GCGTGTGTACAAGACCC-3'. A reação de amplificação foi preparada com: dNTPs (1,5 mM de cada base), 5,0 μ L; tampão 10X, 2,5 μ L; MgCl₂ (50 mM), 1,3 μ L; Taq DNA polimerase (1U); os “primers” F e R (10 pmol reação⁻¹); DNA (10 ng); água milli-Q estéril para completar o volume final de 50 μ L. A amplificação foi realizada usando os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 2 ciclos a 94°C por 1 minuto, a 60°C por 2 minutos, e a 72°C por 2 minutos; 2 ciclos a 94°C por 1 minuto, a 59°C por 2 minutos, e a 72°C por 2 minutos; e assim por diante, em ciclos de 2 vezes, até atingir a temperatura de anelamento de 55°C.

As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador PTC-100™ MJ Research, Inc. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (1,5% em TBE 1X, p/v), a pureza confirmada e, então, submetidos à análise de DGGE.

Para a corrida dos produtos de PCR no DGGE foram preparadas as seguintes soluções: 1) acrilamida/bisacrilamida a 40% (acrilamida, 38,93g; bisacrilamida, 1,07g; volume completado para 100 mL; solução filtrada em 0,45 μ m e estocada a 4°C; 2) tampão TAE 50X [Tris base, 242,0g; ácido acético (CH₃COOH) glacial, 57,1 mL; EDTA dissódico (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈.2H₂O) 0,5 M pH 8,0, 100 mL; volume completado a 1.000 mL com água deionizada; solução autoclavada e armazenada à temperatura ambiente]; 3) persulfato de amônio (NH₄)₂S₂O₈ a 10% [0,1g de (NH₄)₂S₂O₈ completado para 1 mL com água deionizada]; 4) tampão de corrida [azul de bromofenol (C₁₉H₉Br₄NaO₅S) a 2%, 0,25 mL; xileno cianol (C₂₅H₂₇N₂NaO₆S₂) a 2%, 0,25 mL; glicerol (C₃H₈O₃) a 2%, 7,0 mL; volume completado a 10 mL com água destilada, solução estocada à temperatura ambiente; o azul de bromofenol foi dissolvido em etanol a 70% e o xileno cianol em água].

O preparo das soluções para o gel de acrilamida a 6% com gradiente de uréia para desnaturação incluiu: 1) 0% (acrilamida a 40%, 3,75 mL; TAE 50X, 0,5 mL; água milli-Q, 20,75 mL); 2) 100% (acrilamida 40%, 3,75 mL; TAE 50X, 0,5 mL; uréia, 10,5 g; formamida, 10 mL). A partir da mistura dessas duas soluções, foram preparados os géis com gradiente de 20% [solução a 0%, 14,4 mL; solução a 100%, 3,6 mL; $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ a 10%, 10 mL, TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$), 10 mL] a 75% de uréia (solução a 0%, 4,5 mL; solução a 100%, 13,5 mL; $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ a 10%, 100 mL; TEMED, 10 mL). Antes de adicionar o $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ e o TEMED, as soluções foram colocadas em dessecador e submetidas ao vácuo por 15 min., para retirar as bolhas de oxigênio da solução e facilitar a polimerização.

O gel foi preparado em um aparato de DGGE (Bio-Rad DCode). Como tampão de corrida foram utilizados 70 mL de TAE 50X em 6.930 mL de água deionizada, pré-aquecidos a 60°C. As amostras foram carregadas no gel e a corrida foi realizada a 100 V por 16 h.

Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídio, fotografados sob radiação UV (302 nm) e as bandas foram fotografadas sob radiação UV.

3.3 AVALIAÇÕES ENVOLVENDO A SIMBIOSE SOJA-RIZÓBIO

3.3.1 População de rizóbios

A população de rizóbios capazes de nodular a soja foi avaliada pelo método do número mais provável (NMP) com contagem em plantas (Vincent, 1970). As amostras foram homogeneizadas, retirando-se de cada uma 10 g de solo, que foram colocados em um erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina esterilizada com cloreto de sódio (NaCl) a 0,85%. A seguir, cada amostra foi colocada para homogeneizar em um agitador orbital, com pérolas de vidro, por 10 min. Seguiram-se diluições seriadas do solo (10^{-2} a 10^{-6}), conforme descrito por Andrade e Hamakawa (1994) que foram, então, utilizadas para a inoculação de plântulas de

soja, com três repetições por diluição. Para a obtenção das plântulas, sementes de soja da cultivar BRS 133 foram desinfestadas superficialmente (VINCENT, 1970) e colocadas para pré-germinar em folhas de papel do tipo “germiteste” esterilizadas e umedecidas com água estéril. As sementes foram recobertas com mais uma folha de papel germiteste umedecida, com o devido cuidado, para manter a distribuição das sementes. O material foi acondicionado em saco plástico e colocado em um germinador à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$, por 48 h. A seguir, as plântulas foram transplantadas assepticamente para vasos de Leonard contendo uma mistura de areia e vermiculita (1:1, v:v) e solução nutritiva isenta de N (ANDRADE; HAMAKAWA, 1994), sendo o conjunto previamente autoclavado.

As plantas cresceram em condições de casa de vegetação e, aos 30 dias após a inoculação, foram coletadas, verificando-se a presença ou ausência de nódulos. A presença de pelo menos um nódulo no sistema radicular da unidade teste conferiu resultado positivo. Adotaram-se, para fins de cálculo, três diluições, sendo que a diluição subsequente à última não poderia apresentar nenhuma unidade teste positiva. Com o número de unidades-teste positivas de cada diluição, utilizando-se a tabela de NMP para três repetições (ANDRADE; HAMAKAWA, 1994) foi obtido o NMP de células viáveis. Os resultados foram expressos em número de células g^{-1} solo seco.

3.3.2 Avaliação da fixação biológica do nitrogênio em soja

No estágio R2, dez plantas de soja foram coletadas ao acaso de cada parcela, segundo sorteio realizado previamente à coleta, excluindo-se as duas fileiras externas e as duas fileiras centrais, para a avaliação da nodulação e crescimento das plantas. A coleta foi realizada introduzindo-se uma pá para formar um retângulo abrangendo todo o sistema radicular. O torrão de solo contendo cada planta foi cuidadosamente retirado e colocado sobre uma peneira com orifícios de, no máximo, 1 mm. Procedeu-se ao destorroamento cuidadoso, retirando-se o excesso de solo e colocando-se a planta em sacos de papel, onde também foram colocados nódulos referentes a essa planta que porventura houvessem caído na peneira.

No laboratório, a parte aérea foi separada das raízes. A parte aérea foi lavada em água destilada e acondicionada em saco de papel. As raízes foram lavadas em água corrente, cuidadosamente, também sobre peneira e acondicionadas em sacos de papel, adicionando-se nódulos eventualmente caídos na peneira. O material foi colocado em uma estufa a 65°C, com ventilação forçada, até atingir massa constante (aproximadamente 72 h). Os nódulos foram separados das raízes, contados e colocados para secagem novamente, a 65°C, com ventilação forçada, até atingir massa constante. O material retirado da estufa foi acondicionado em sacos plásticos, que foram fechados com fita crepe, para evitar a hidratação; a próxima etapa consistiu da pesagem do material. Após a pesagem, a parte aérea foi moída em micro-moinho, em 20 mesh, para a análise dos teores de nutrientes nos tecidos. Os pecíolos foram moídos separadamente, para a avaliação do teor de N-ureídeos.

O N total foi avaliado pela técnica da digestão úmida com H₂SO₄ e mistura catalisadora (Bremner, 1965), seguida pela determinação da concentração de N utilizando um analisador automático (Tecator Automatic N Analyzer, Suécia).

A análise do teor de N-ureídeos foi feita com base na metodologia de Vogels e van der Drift (1970). Por essa metodologia, os ureídeos são estimados pela hidrólise seletiva a glioxilato, pela reação Rimini-Schryve, seguida pela medida do glioxilato resultante. A análise foi feita em pecíolos de soja coletados em R2. Inicialmente, os tecidos foram moídos em micro-moinho (20 mesh). Foram colocados, em cada tubo, entre 0,1 g e 0,5 g do material seco, adicionando-se, então, 5 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e 2,5 mL de etanol (relação 2:1, tampão:etanol). A mistura foi aquecida em banho-maria a 80°C durante 15 min., não deixando ferver. Em seguida, a mistura foi mantida em repouso durante 1 h. Após essa etapa, a suspensão foi filtrada utilizando três camadas de gaze de algodão do tipo 9 fios e centrifugada durante 5 min. Os extratos de material suspenso foram guardados a -15°C. Para a análise, ao extrato de tecido vegetal (50 µL) adicionou-se água destilada para completar um volume de 0,75 mL, em seguida, acrescentou-se 0,25 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹, misturando-se em um agitador do tipo vórtex. Os tubos foram colocados para aquecer em banho-maria a 100°C por 8 min. A seguir, os tubos foram resfriados em banho de gelo e acrescentaram-se 0,25 mL de HCl 0,65 mol L⁻¹, voltando-se ao aquecimento por 4 min. a 100°C. Após novo

resfriamento dos tubos em gelo, adicionaram-se 0,25 mL de tampão fosfato 0,4 mol L⁻¹ pH 7,0 e 0,25 mL de fenilhidrazina (C₆H₈N₂/C₆H₅NHNH₂), misturando-se em vórtex, e os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram colocados em banho de gelo e adicionaram-se 1,25 mL de HCl concentrado e pré-resfriado e 0,25 mL de ferricianeto de potássio [K₃Fe(CN)₆], também pré-resfriado, misturando-se a solução. Removeram-se os tubos do gelo e a leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 535 nm após 10 minutos e completada em, no máximo, 30 minutos, quando se começa a observar mudança na coloração. Os padrões foram feitos conforme descrito em Hungria (1994). A abundância relativa de ureídeos foi estimada em relação ao N total nos pecíolos e conferida em relação ao teor de ureídeos e de nitrato (NO₃⁻) nos mesmos tecidos, conforme sugerido por Herridge e Peoples (1990). O nitrato foi analisado segundo descrito anteriormente por Hungria (1994).

No *Ensaio 2* os teores de P e K na parte aérea das plantas coletadas em R2. Após a digestão do material moído por via seca em mufla, os teores de P e K foram analisados por espectroscopia de emissão atômica induzida por plasma (ICP-AES).

3.3.3 Ocupação dos nódulos pelas estirpes dominantes nos solos brasileiros

Após a retirada dos nódulos das raízes, 40 nódulos foram escolhidos ao acaso de cada parcela, para a análise de ocupação dos nódulos pelas estirpes inoculantes, pelo método de imuno-aglutinação (VINCENT, 1970). Inicialmente, foram preparados os antissoros policlonais contra os antígenos somáticos termo-estáveis das estirpes dominantes nos solos brasileiros: SEMIA 5079 (que apresenta a mesma reação sorológica da SEMIA 566), a SEMIA 5080 (com a mesma reação sorológica da SEMIA 586), a SEMIA 587 e a SEMIA 5019. O preparo dos antissoros e as reações com os nódulos foram conduzidos conforme descrito anteriormente (Nishi, 1994).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade das variáveis e de homogeneidade das variâncias (ANOVA) (SAS, 1999). Quando comprovadas a normalidade e a homogeneidade, foram calculadas a média aritmética (\bar{x}) e o desvio padrão (s). Essas análises também podem ser conduzidas utilizando o software Microsoft® Excel.

Para a estimativa da precisão experimental foi utilizado o coeficiente de variação (desvio padrão/média, s/\bar{x}). Para a classificação do CV nos níveis baixo, médio, alto e muito alto foram considerados os valores propostos por Gomes (1984) para experimentos de campo. Além disso, foi calculada uma classificação de CV para cada parâmetro, conforme proposto por Garcia (1989). Para isso, foram considerados todos os CVs disponíveis para cada parâmetro, sendo estimadas a média aritmética (\bar{x}) e o desvio padrão da média (s) de cada valor de CV. Com esses valores, a classificação foi realizada da seguinte maneira: $CV < (\bar{x} - s)$, baixa; $(\bar{x} - 1s) < CV < (\bar{x} + 1s)$, média; $(\bar{x} + 1s) < CV < (\bar{x} + 2s)$, alta; $CV > (\bar{x} + 2s)$, muito alta (Garcia, 1989; Ramalho *et al.*, 2005).

Os dados também foram analisados considerando-se o índice de variabilidade temporal (IVT), que indica a evolução do CV com o tempo (Wardle, 1998).

Coefficientes de correlação entre os diversos parâmetros também foram estimados, a fim de expressar quantitativamente o quanto duas variáveis estão correlacionadas, com o programa Microsoft® Excel. As correlações, o nível de significância das correlações e o teste de diferença entre correlações também foi estimado no website livre da University of Amsterdam (2005).

No segundo ensaio, após o teste de normalidade e de homogeneidade, quando a significância do valor P foi confirmada, foi aplicado um teste *post-hoc*, utilizando-se o teste de Duncan como procedimento de análise múltipla (SAS, 1999).

Em relação à análise do DNA total do solo, os perfis de DNA fotografados foram analisados pelo programa Bionumerics (v.1.0.1, Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica). A análise de agrupamento foi realizada utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with arithmetic mean, Sneath & Sokal, 1973) e o coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1912), com uma tolerância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existe uma demanda crescente e clara, por parte da sociedade, por informações sobre segurança ambiental e à saúde humana frente à introdução progressiva de plantas transgênicas em diversos agroecossistemas. Como consequência, têm sido criados diversos programas de avaliação do impacto de uso de plantas GMs, por exemplo, pela European Science Foundation, pela European Environmental Agency e pela American Academy of Microbiology (FIRBANK, 2003). Cabe aqui salientar que a estimativa do impacto, também denominada de análise de risco é definida como um processo de avaliação que inclui a identificação das incertezas, das probabilidades e da severidade de efeitos ou eventos adversos ao homem ou ao meio ambiente, após a exposição a determinadas fontes de risco. Conseqüentemente, esse conceito envolve o conhecimento científico de biossegurança relacionado ao uso de OGMs. Nesse contexto, este estudo procurou determinar um conjunto de parâmetros cientificamente válidos, de ampla e fácil aplicação, com precisão de dados estatisticamente aceitável e a um custo acessível para a utilização em análises de risco ambiental envolvendo a cultura da soja no Brasil.

Desde os primórdios da introdução de OGMs na agricultura tem sido mencionado que ensaios conduzidos sob condições de laboratório deveriam ser considerados com cautela, uma vez que podem não expressar as condições realísticas do campo (por exemplo, EIJSACKERS, 1985; GROSSBARD, 1985). Um passo importante nesse sentido foi a definição das “avaliações em escala de campo” (“Farm Scale Evaluations”, FSEs), estabelecendo alguns critérios, metodologias e bases estatísticas para esses estudos (FIRBANK et al., 1999; FIRBANK et al., 2003; PERRY et al., 2003). A publicação recente do volume especial da revista “Philosophical Transactions of the Royal Society of London B (v.358, 2003)” relata os primeiros resultados obtidos em FSEs na Grã Bretanha com culturas transgênicas de beterraba (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*), milho (*Zea mays* L.) e canola (*Brassica napus*). Tanto nos estudos de definição de FSEs, como nesse volume especial, porém, são apresentados resultados de propriedades físicas e de cobertura do solo, condições agroclimáticas, variedades e manejo das culturas, uso de agrotóxicos, fertilizantes e biota (plantas, ervas daninhas, população de invertebrados) (FIRBANK

et al., 2003; PERRY et al., 2003; SQUIRE et al., 2003), mas não da microbiota do solo. Além disso, nos estudos apresentados nesse volume especial foi salientado que os resultados não poderiam ser extrapolados para outras regiões, pois se referiam a riscos ambientais em um agroecossistema particular (FIRBANK, 2003).

Nos ensaios conduzidos na Grã-Bretanha desde 2000, o desenho experimental escolhido foi em “split-plot”, em que metade da área foi cultivada com a cultura GM e a outra metade com a cultura convencional, havendo a necessidade de repetir esse desenho em 60-75 locais por cultura para conseguir detectar diferenças de 50% entre os tratamentos (CHAMPION et al., 2003; PERRY et al., 2003; SQUIRE et al., 2003). No entanto, apesar do número elevado de locais amostrados, os autores demonstraram que, pela análise histórica das áreas, o cultivo tradicional por um ou vários anos antes do início do ensaio afetou grupos sensíveis em 50% ou mais, desse modo, dificultando a análise de qualquer efeito positivo ou negativo do cultivo de plantas GMs nos três anos em que o estudo foi conduzido (SQUIRE et al., 2003). Finalmente, os autores concluem que a importância dos estudos nesses FSEs reside, principalmente, em iniciar um debate sobre os ensaios envolvendo OGMs e na oportunidade de obtenção de dados para estudos futuros.

4.1 ESTABELECENDO NÍVEIS DE CLASSIFICAÇÃO DOS COEFICIENTES DE VARIAÇÃO

Pela sua extensão, o Brasil apresenta diversas condições edafoclimáticas, o que torna os estudos de avaliação de risco ambiental ainda mais complexos. Nesse contexto, os parâmetros escolhidos para este estudo deveriam mostrar sensibilidade aos diversos manejos dos solos e das culturas e os resultados obtidos nas análises deveriam apresentar dispersão ou desvios estatisticamente aceitáveis, ainda que pudessem ocorrer algumas diferenças entre as amostras, por exemplo, relacionadas ao tempo de chegada ao laboratório, vindas de vários locais. Como os ensaios visando avaliar a microbiota do solo são, de um modo geral, semeados manualmente, o delineamento experimental escolhido foi o de blocos ao acaso com três ou quatro repetições, em vários locais. Finalmente, decidiu-se pela utilização do desvio padrão normalizado (coeficiente de variação, CV%) como indicativo da precisão dos experimentos.

Com freqüência, em experimentos em nível de campo, têm sido adotados os valores de CV(%) propostos por Gomes (1994): $CV < 10$, baixo; $10 < CV < 20$, médio; $20 < CV < 30$, alto e $CV > 30$, muito alto. Contudo, conforme salientado por Ramalho *et al.* (2005), essa classificação não considera a natureza do parâmetro que está sendo analisado. Com base em informações referentes a 146 projetos de pesquisa com espécies de *Pinus* e *Eucalyptus*, Garcia (1989) sugeriu que os limites deveriam ser estabelecidos de acordo com a natureza dos dados, com base na média aritmética dos CVs e do desvio padrão da média. O uso dessa classificação também foi proposto para outras culturas, por exemplo, milho (*Zea mays* L.) (SCAPIM *et al.*, 1995) e citros (*Citrus* spp.) (AMARAL *et al.*, 1997). Já era conhecida a natureza variável de alguns dos parâmetros microbiológicos deste estudo, como a nodulação de leguminosas, particularmente o número de nódulos por planta (NN). Como exemplo, em ensaios com cultivares de soja em condições controladas de casa de vegetação o CV para o NN foi estimado em 38% (BOHRER; HUNGRIA, 1998) e 50% (SANTOS *et al.*, 2006) e, a campo, em 25% (NISHI; HUNGRIA, 1996), 38% (HUNGRIA *et al.*, 1998), 46% (CAMPOS *et al.*, 2001) e 32% (MENDES *et al.*, 2004). Em geral, variabilidade menor, mas ainda elevada é encontrada quando a massa desses nódulos é estimada; no estudo de Hungria e Bohrer (1998), por exemplo, o CV diminuiu para 29%, mas continuou em 50% no estudo de Santos *et al.* (2006). Conhecendo a natureza variável dos dados microbiológicos, foram estimadas as classes de CV, conforme sugerido por Garcia (1989) e Ramalho *et al.* (2005), com base no levantamento das médias aritméticas e desvios padrões de todos os CVs obtidos neste estudo. Na Tabela 3 constam os valores de CV encontrados, ficando evidenciado que, para os parâmetros de natureza mais variável, o limite de dispersão dos dados aceitável (médio) pode ser estabelecido em 35%. Para os demais parâmetros de natureza menos variável, foi tolerado um CV máximo de 20%, conforme sugerido por Gomes (1994) para ensaios a campo.

4.2 ENSAIO 1: EXPERIMENTO COM SOJA CONVENCIONAL EM PROPRIEDADES DE AGRICULTORES NA SAFRA 2002/2003

4.2.1 Avaliação quantitativa da biomassa microbiana

Em relação à biomassa microbiana do solo, os valores detectados nas diversas áreas foram bastante distintos (Tabela 4). No estágio V4, o C da biomassa microbiana (CBM) foi menor na Região Sul, exceto em Cascavel, sendo maior em Dourados. Na coleta em R2, porém, os valores mais elevados foram constatados no RS, com um decréscimo acentuado em Dourados. Considerando o valor máximo aceitável de 35% (Tabela 3), o CV do CBM em V4 foi adequado em todos os locais, exceto em São Luiz Gonzaga (57%). Embora o menor valor de CBM também tenha sido constatado em S.L. Gonzaga, a variabilidade não esteve associada à magnitude dos valores, uma vez que P. Grossa e Londrina também apresentaram valores baixos de CBM, mas com CV de apenas 15 e 17%, respectivamente. Já em R2, a variabilidade em relação às médias foi aceitável em todas as áreas, variando de 12% (Londrina) a um máximo de 32% (S.L. Gonzaga) (Tabela 4).

Os valores de respiração basal (RB) também diferiram entre os seis locais amostrados e tanto em V4 como em R2 o CV esteve dentro dos limites considerados aceitáveis, exceto novamente em S.L. Gonzaga em V4 (60%) (Tabela 4). O quociente metabólico (qCO_2) indicou que a população microbiana em Dourados apresentou alta eficiência metabólica em V4, mas não em R2, ao contrário da população de S.L. Gonzaga. De modo semelhante aos demais resultados, os valores de CV para qCO_2 foram aceitáveis em todos os locais, exceto em S.L. Gonzaga em V4 (50%) (Tabela 4).

A robustez dos dados também foi avaliada considerando-se a variabilidade temporal, ou “índice de variabilidade temporal”, conforme sugerido por Wardle (1998), que procura quantificar a evolução temporal da dispersão dos dados coletados. O índice se baseia no princípio de que se os organismos são mais resistentes aos distúrbios ambientais, menor será a variabilidade das medidas associadas a essa biota. Para isso, os CVs relativos à RB e CBM obtidos em V4 e

R2 foram comparados. Não houve correlação entre os valores de RB e CBM obtidos nas duas coletas, porém, ambos os parâmetros obtidos em V4 não diferiram estatisticamente daqueles obtidos em R2 ($p=0,252$ para a RB e $p=0,393$ para o CBM), indicando estabilidade dos parâmetros no tempo.

Sabe-se que a biomassa microbiana varia em função do ciclo das culturas, incorporação de resíduos vegetais, pluviometria, pH do solo, entre outros (por exemplo, WARDLE, 1992, 1998; BALOTA et al., 1998; FRANCHINI et al., 2006). Desse modo, as variações no CBM, RB e qCO_2 observadas entre duas avaliações, por exemplo, em Dourados (Tabela 4), podem estar relacionadas a alterações em um, ou mais, desses fatores. Pode-se concluir que, no *Ensaio 1*, conduzido com três repetições e com a análise de duas avaliações por repetição, o CV foi aceitável para os parâmetros de biomassa microbiana em todos os locais, exceto em S.L. Gonzaga na primeira coleta, o que poderia indicar problemas de amostragem, ou armazenamento, ou transporte das amostras para o laboratório.

Quando os parâmetros de CBM, RB e qCO_2 foram correlacionados (Tabela 5), destacaram-se as correlações positivas e significativas entre o CBM e a RB, tanto no estádio V4 ($r=0,83$, $p\leq 5,898e^{-5}$), como no estádio R2 ($r=0,90$, $p\leq 5,271e^{-6}$) (Tabela 5). A correlação entre esses dois parâmetros também foi positiva e estatisticamente significativa quando os dados das duas coletas foram analisados em conjunto ($r=0,84$, $p\leq 1,107e^{-9}$, Fig. 1). Em relação ao qCO_2 , não houve correlação com a RB, contudo, em cada coleta, houve uma correlação negativa e significativa a $p\leq 0,05$ com o CBM, indicando que, concomitantemente com o incremento no CBM, a microbiota tendeu a incrementar a eficiência metabólica (Tabela 5).

A biomassa microbiana do solo é definida como o componente microbiano vivo do solo, composto de bactérias, fungos, microfauna e algas; o conceito de que, para determinados estudos, toda a população microbiana poderia ser tratada como um todo foi, inicialmente, proposto por Jenkinson (1966). Considera-se a biomassa microbiana como um componente crítico de todos os ecossistemas naturais ou manipulados pelo homem, porque é o agente regulador da taxa de decomposição da matéria orgânica e da ciclagem dos elementos (JENKINSON; LADD, 1981) atuando, portanto, como fonte e dreno (“source” e “sink”) dos nutrientes necessários ao crescimento das plantas (LADD et al., 1985). Desde o estudo pioneiro de Jenkinson (1996), dezenas de trabalhos comprovaram que a análise da biomassa microbiana do solo pode fornecer informações relevantes

sobre o funcionamento dos ecossistemas e sobre a “qualidade” do solo. Com frequência tem sido relatado, também, que a biomassa microbiana apresenta maior sensibilidade do que outros parâmetros químicos e físicos, refletindo rapidamente alterações pelo manejo do solo ou das culturas (por exemplo, JENKINSON; POWLSON, 1976a; JENKINSON et al., 1976b; JENKINSON; LADD, 1981; BROOKES; Mc GRATH, 1984; WARDLE; PARKINSON, 1991; WARDLE et al., 1993; WARDLE; HUNGRIA, 1994; BALOTA et al., 1998; WARDLE, 1998; BALOTA et al., 2003; FRANCHINI et al., 2006). Dois métodos específicos para estimar a biomassa microbiana do solo foram desenvolvidos: fumigação-incubação e fumigação-extração. No método de fumigação-incubação a biomassa microbiana é calculada pela diferença entre as quantidades de CO₂ liberadas durante a incubação (10 dias) pelo solo fumigado com clorofórmio e pelo solo não-fumigado. O CO₂ é liberado pelo aumento na taxa de respiração da população que se restabelece em função da reinoculação do solo após a evacuação do clorofórmio, que degrada a biomassa. Assim, constituintes da biomassa morta representam uma fonte de energia e nutrientes prontamente metabolizáveis e, comparando-se os teores de C dos solos fumigado e não-fumigado, obtém-se a quantidade de C pertencente à biomassa microbiana (JENKINSON; POWLSON, 1976a; JENKINSON; POWLSON, 1976b). Posteriormente, Vance et al. (1987) propuseram uma modificação do método de Jenkinson and Powlson, visando facilitar a análise no laboratório, o método de fumigação-extração, que também envolve a eliminação da microflora do solo pelo clorofórmio, contudo, o C liberado pela morte dos microrganismos é determinado por extração química ou digestão.

No Brasil, os métodos de fumigação-incubação e fumigação-extração já foram comparados em solos da Amazônia (PFENNING et al., 1992), Rio de Janeiro (RODRIGUES et al., 1994), dos Cerrados (OLIVEIRA et al., 2001) e do norte do Paraná (BRANDÃO-JÚNIOR, 2005) e, em todos, o método de extração, adotado neste estudo, mostrou-se adequado e com maior conveniência, pelo menor trabalho e tempo envolvidos. De fato, as vantagens do método de fumigação-extração foram, recentemente, revisadas e enfatizadas, podendo-se citar, entre outras, o melhor desempenho em solos ácidos ou com resíduos vegetais recentemente incorporados (JENKINSON et al., 2004). No *Ensaio 1*, essa metodologia também se mostrou bastante efetiva, com baixa variabilidade, mesmo em solos bastante distintos.

4.2.2 Avaliação qualitativa da microbiota do solo

A avaliação qualitativa da biomassa microbiana é bem mais complexa do que a quantitativa. Nos métodos clássicos, baseados no isolamento, cultivo e caracterização morfofisiológica dos microrganismos existe a limitação pela seletividade, que não permite o conhecimento de toda a extensão da comunidade bacteriana. Além disso, a proporção de células cultiváveis que pode ser estimada representa menos de 10% da população total e poucos dados estão disponíveis a respeito de como elas refletem a atual composição dessas comunidades (COWAN, 2000; RANJARD et al., 2000). Métodos moleculares têm sido utilizados de modo crescente, com a perspectiva de detectar microrganismos cultiváveis e não-cultiváveis. Nesse contexto, a técnica de PCR-DGGE pode ser usada para separar fragmentos de DNA de mesmo tamanho, mas com seqüências de bases nucleotídicas diferentes. Originalmente, foi desenvolvida para detectar mutações específicas no genoma humano, mas vem sendo adaptada, por exemplo, para a análise da comunidade bacteriana ou de fungos e estudos de estrutura genética de grupos funcionais. Existem limitações ao DGGE, por exemplo, amplificação preferencial de determinadas espécies, ou de espécies dominantes no solo e utilização parcial de genes, entretanto, quando comparado a outras metodologias, o DGGE tem apresentado melhor nível de resolução e relação custo/benefício (por exemplo, MYERS et al., 1985; MUYZER et al., 1993; ROSADO et al., 1997; MUYZER; SMALLA, 1998; KOZDRÓJ; van ELSAS, 2001).

As análises do DNA total do solo por PCR-DGGE com “primers” para a região do DNA que codifica para o gene ribossomal 16S de bactérias indicaram que a diversidade dos gêneros/espécies de bactérias em cada área era distinta, embora vários gêneros/espécies fossem comuns a todas as áreas. Londrina apresentou a menor diversidade, o que poderia resultar do uso agrícola intensivo desses solos. Apesar disso, não se pode descartar que propriedades intrínsecas desses solos, como os teores elevados de argila e ferro, possam dificultar a extração do DNA, embora vários testes de extração de DNA tenham sido feitos e, aparentemente, não indicaram quaisquer problemas. Os perfis obtidos em cada uma três repetições de cada área foram bastante semelhantes entre si, exceto em S.L. Gonzaga. O coeficiente de similaridade entre os três perfis foi de 99,9% em

Cascavel, Ponta Grossa (dados não mostrados) e Dourados (Fig. 2), de 95,0% em Londrina, de 90,0% em Passo Fundo (dados não mostrados) e de 79,0% em S.L. Gonzaga (Fig. 2). A diversidade de perfis de PCR-DGGE em S.L. Gonzaga (Fig. 2), em adição à variabilidade nas análises de biomassa microbiana (Tabela 4) indicam, portanto, que essa área apresentava menor homogeneidade em termos de microbiota do solo.

A análise dos perfis de DNA obtidos pode ser feita visualmente, mas essa tarefa é dificultada quando vários géis têm de se analisados. Existem programas de análise de géis que, inclusive, conseguem normalizar as bandas de acordo com os pesos moleculares dos padrões utilizados. Esse é o caso do programa Bionumerics, entretanto, o programa é extremamente sensível à detecção de quaisquer diferenças entre os perfis. Desse modo, pelos resultados obtidos neste estudo, em adição à experiência do laboratório nos últimos anos, foi possível estabelecer que a dissimilaridade máxima aceitável entre repetições de um mesmo local seria de 10%, utilizando o nível de tolerância de 5%, o algoritmo de UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

4.2.3 Fixação biológica do nitrogênio

A soja é uma planta exótica que foi introduzida no Brasil no final do século XIX, desse modo, os solos brasileiros são, originalmente, isentos de bactérias capazes de nodular, de modo eficaz, essa leguminosa. Particularmente a partir da expansão comercial da cultura, na década de 1960, teve início um processo de inoculação maciça com algumas estirpes que foram selecionadas pela pesquisa. Com o cultivo da soja e inoculações por alguns anos, os solos se tornaram o hábitat de uma população elevada, estimada em 10^3 a 10^6 células g^{-1} de solo e formada por poucas estirpes que foram introduzidas via inoculantes (HUNGRIA et al., 1994; VARGAS; HUNGRIA, 1997; HUNGRIA et al., 2005; HUNGRIA et al., 2006).

A população nativa ou naturalizada de rizóbios pode variar em função de uma série de fatores, como pluviometria, cobertura vegetal, presença da planta hospedeira, temperatura, acidez, fertilidade do solo, entre outros (por exemplo, WOOMER et al., 1988). No caso do Brasil, a presença contínua do hospedeiro em

áreas de cultivo de soja e as condições ambientais favoráveis, por exemplo, como a falta de um período rigoroso de inverno, resultam em populações elevadas nas áreas que já receberam inoculantes (HUNGRIA et al., 2006). De fato, as seis áreas avaliadas no *Ensaio 1* cultivavam soja há alguns anos e apresentaram populações de *Bradyrhizobium* da ordem de $5,95 \times 10^3$ (P. Fundo) a $37,4 \times 10^3$ células g^{-1} de solo seco (Cascavel) (Tabela 6). O CV para o parâmetro de número de células foi bastante elevado, de 49% (Passo Fundo) a 130% (Cascavel) e esses limites não se enquadram na variabilidade máxima estabelecida para este estudo, de 35%. Frequentemente, pela dispersão elevada, utiliza-se a transformação logarítmica desse parâmetro (por exemplo, Woome et al., 1988) e, de fato, quando os dados foram transformados o CV diminuiu para 5,2% e 15,8% em Passo Fundo e Cascavel, respectivamente (Tabela 6).

A nodulação de leguminosas a campo, particularmente o número de nódulos (NN) por planta, pode ser um parâmetro com variabilidade elevada, e o valor máximo aceitável de CV estabelecido neste estudo, conforme já mencionado, foi de 35%. Em relação ao NN, o CV variou de 7,9% (Ponta Grossa) a um máximo de 16,2% (S.L. Gonzaga) e, para a massa de nódulos secos (MNS), de 6,6% (Londrina) a 20,4% (Dourados), respectivamente, valores aceitáveis e, portanto, dispensando a necessidade de transformação dos dados (Tabela 6).

Na análise de ocupação dos nódulos foram realizados testes de reação contra os sorogrupos das quatro estirpes utilizadas atualmente em inoculantes comerciais e predominantes na maioria dos solos brasileiros já cultivados com soja: *Bradyrhizobium elkanii* estirpes SEMIA 587 (recomendada para o uso em inoculantes comerciais de 1968 a 1975 e desde 1979) e SEMIA 5019 (=29W) (recomendada desde 1979) e *B. japonicum* estirpes SEMIA 5079 (=CPAC 15) e SEMIA 5080 (=CPAC 7), ambas recomendadas desde 1992. As quatro estirpes apresentam reações sorológicas distintas, contudo, a SEMIA 5079 pertence ao mesmo sorogrupo da SEMIA 566, estirpe que foi utilizada em inoculantes comerciais no período de 1966 a 1978, sorogrupo este considerado como o mais competitivo nos solos brasileiros. A estirpe SEMIA 5080 pertence ao mesmo sorogrupo da SEMIA 586, recomendada comercialmente em 1977, mas pouco competitiva (HUNGRIA et al., 1994; VARGAS; HUNGRIA, 1997; MENDES et al., 2004; HUNGRIA et al., 2006).

A soma das porcentagens de nódulos ocupados por cada sorogrupo foi superior a 100%, pois vários nódulos apresentaram ocupação por mais de uma

estirpe, o que costuma ser verificado a campo, ou mesmo em casa de vegetação. De 22% (Londrina) a 47% (S.L. Gonzaga e Passo Fundo) dos nódulos foram ocupados por mais de uma estirpe; além disso, de 2,6% (Dourados) a 10,2% (Londrina) foram ocupados por estirpes sem reação conhecida (Tabela 6), o que também é relatado em diversos ensaios conduzidos com soja a campo no Brasil (Vargas & Hungria, 1997; Hungria *et al.*, 2006). A maior porcentagem de nódulos apresentou reação sorológica com a SEMIA 5079, o sorogrupo mais competitivo e utilizado por mais tempo em inoculantes comerciais.

A variabilidade nos parâmetros de ocupação dos nódulos pelos diversos sorogrupos foi aceitável quando as estirpes que ocuparam a maior porcentagem dos nódulos (SEMIA 587, 5019 e 5079) foram consideradas (Tabela 6). Como exemplo, a estirpe SEMIA 587 comprovou a sua alta capacidade competitiva, relatada em diversos trabalhos conduzidos no Brasil (por exemplo, HUNGRIA *et al.*, 1994; VARGAS; HUNGRIA, 1997) e ocupou de 31% a 43% dos nódulos, com uma amplitude de CV de 5,7% a 18,6%. Contudo, os CVs foram elevados com a menor ocupação dos nódulos, por exemplo, em Passo Fundo a média da ocupação pela estirpe SEMIA 5080, de 12%, apresentou um CV de 44,4%. Conseqüentemente, embora, de um modo geral o CV obtido tenha sido inferior aos 35% estabelecidos para as avaliações relacionadas à nodulação, para as estirpes menos competitivas, os resultados devem ser considerados com cautela. A variabilidade elevada em relação ao parâmetro de ocupação dos nódulos pelas estirpes de rizóbios também foi verificada em outros ensaios conduzidos a campo no Brasil, por exemplo, CVs de 35% foram relatados em Cruz Alta, RS (CAMPOS *et al.*, 2001), 38% em Londrina, PR (HUNGRIA *et al.*, 1998) e 61% em Planaltina, DF (MENDES *et al.*, 2004). O erro na análise de ocupação dos nódulos se torna ainda mais elevado quando adicionado à ocupação de um único nódulo por mais de uma estirpe, ou por estirpes pertencentes a sorogrupos desconhecidos. Além disso, outra dificuldade associada a essa análise reside na dificuldade em identificar estirpes distintas, mas com a mesma reação sorológica, por exemplo, a SEMIA 566, introduzida há três décadas e a SEMIA 5079, utilizada em inoculantes na última década.

A avaliação da ocupação dos nódulos é de grande importância em estudos de introdução de estirpes em solos isentos de *Bradyrhizobium*, a fim de determinar a capacidade competitiva e saprofítica dessas estirpes (por exemplo,

MENDES et al., 2004). Essa avaliação também pode ser importante para monitorar o efeito da reinoculação maciça de novas estirpes em solos com população estabelecida de rizóbios indígenas ou naturalizados (por exemplo, NISHI; HUNGRIA, 1996). Contudo, no caso de estudos de análise de risco ambiental em áreas tradicionais de cultivo, ou de ensaios sobre efeito da reinoculação com estirpes já estabelecidas no solo, as informações fornecidas não são, freqüentemente, conclusivas. Por essa razão, inicialmente a análise de ocupação dos nódulos foi definida, pela RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola) como essencial para a avaliação em ensaios para recomendação de estirpes de rizóbios, inoculantes e técnicas de inoculação para a cultura da soja (RELARE, 1994). Posteriormente, porém, após analisar e discutir os resultados obtidos em diversos ensaios a campo, a ocupação dos nódulos foi retirada do protocolo de eficiência agrônômica do Ministério da Agricultura, sendo apenas sugerida a sua utilização opcional, em ensaios de competitividade em vasos de Leonard ou em vasos com solo, ou em áreas sem população estabelecida (RELARE, 2000).

Para as avaliações de massa, N total, e N-ureídos na parte aérea também foram considerados os dados referentes a dez plantas por repetição. Mesmo em condições controladas de casa de vegetação, Santos *et al.* (2006) relataram CV de 25% para o parâmetro de MPAS. Seguindo a sugestão de Gomes (1994) e os resultados obtidos na análise dos CVs (Tabela 3), porém, estabeleceu-se que o CV máximo aceitável para esses parâmetros seria de 20%. Neste *Ensaio 1*, o CV para esses parâmetros foi baixo em todos os locais, com um máximo de 16,6% para o NTU em P. Fundo (Tabela 6).

A quantificação do processo de fixação biológica do N₂ em leguminosas pode ser avaliada pelo balanço de N, pelo uso de metodologias envolvendo o isótopo ¹⁵N e, no caso de leguminosas como a soja, que transportam a maior parte do N proveniente do processo biológico na forma de ureídos (alantoína e ácido alantóico), pela determinação do teor desses compostos, considerando sempre que os ureídos contêm quatro átomos de N por molécula. A quantificação da contribuição da fixação do N₂ em soja pelo teor de ureídos foi, inicialmente, proposta por McClure e Israel (1979), utilizando seiva do xilema. Posteriormente, o método foi validado, pelo uso de ¹⁵N, em seiva exsudada naturalmente ou com o auxílio de bomba de vácuo, bem como em extratos do caule (incluindo pecíolos), e coeficientes

altamente significativos foram obtidos ($r=0,97-1,00$) (HERRIDGE; PEOPLES, 1990). Mais recentemente, com base em diversos ensaios conduzidos na Austrália, Ásia, África e Oriente Médio, Peoples e Herridge (2000) afirmaram que tanto o método de abundância natural de ^{15}N , como a avaliação da abundância relativa de N-ureídos permitem quantificar a contribuição da fixação do N_2 a campo, de modo amplo e com confiança. Pode-se citar, entre as principais vantagens da análise de N-ureídos, em comparação com os métodos utilizando o isótopo ^{15}N , o baixo custo e a não necessidade de inclusão de controles sem fixação de N_2 .

A contribuição da fixação do N_2 , avaliada pelo método de N-ureídos, variou de 72% em Ponta Grossa a 81% em Dourados, valores bastante elevados (Tabela 6). Em um levantamento recente de quantificação do processo biológico em ensaios conduzidos no Brasil, utilizando as metodologias de diluição isotópica de ^{15}N , ou de $\delta^{15}\text{N}$, ou de balanço de N, ou de %N-ureídos, as estimativas foram de 69% a 94% (HUNGRIA et al., 2006). Vale salientar que essa contribuição é bastante superior àquela encontrada nos EUA e Austrália. Como exemplo, van Kessel e Hartley (2000) analisaram 362 ensaios conduzidos nos EUA e Austrália em um período de 25 anos e estimaram a contribuição da fixação do N_2 em 54%, enquanto que Unkovich e Pate (2000), em 33 campos comerciais na Austrália, encontraram uma contribuição de 53%. Finalmente, cabe destacar que a eficiência dos nódulos em Dourados e Londrina foi superior em relação à das demais áreas (Tabela 6).

Os parâmetros utilizados para a avaliação da fixação do N_2 também foram correlacionados entre si (Tabela 7). O NN foi correlacionado positivamente com a MNS ($r=0,91$, $p\leq 2,632e^{-5}$). Desse modo, no caso deste estudo, conduzido em solos com população estabelecida de *Bradyrhizobium*, somente um dos dois parâmetros necessitaria ser avaliado, sendo preferível optar pela MNS, pela maior praticidade e, também, relato de melhor correlação com o desempenho simbiótico (por exemplo, DÖBEREINER, 1966; BOHRER; HUNGRIA, 1998; HUNGRIA; BOHRER, 2000). Entretanto, não foram observadas correlações significativas entre o NN ou a MNS e a MPAS, ao contrário de estudos conduzidos anteriormente com soja, sob condições controladas de casa de vegetação (BOHRER; HUNGRIA, 1998; HUNGRIA; BOHRER, 2000).

Deve-se enfatizar a correlação positiva e significativa constatada entre a MPAS e o NTPA ($r=0,88$, $p\leq 1,141e^{-5}$), bem como entre a MPAS e o N total da planta sob a forma de N-ureídos (NTU) ($r=0,81$, $p\leq 9,832e^{-5}$); além disso, o NTU foi

altamente correlacionado com o NTPA ($r=0,94$, $p\leq 8,6748e^{-7}$) (Tabela 7). Em condições axênicas, Haydock et al. (1980) verificaram que as estirpes mais eficientes podiam ser selecionadas com base na biomassa de plantas ou somente da parte aérea, sem necessidade de determinar o N nos tecidos. Bohrer e Hungria (1998) constataram, também em condições axênicas, correlação positiva, elevada e significativa ($r=0,88$, $p\leq 0,001$) entre a MPAS e o NTPA, dando suporte à sugestão de que não seria necessário realizar a análise de N total nos tecidos sob essas condições. A seguir, esses resultados também foram confirmados em condições controladas de casa de vegetação, mas em vasos contendo solo não estéril ($r=0,91$, $p\leq 0,001$; HUNGRIA; BOHRER, 2000). Finalmente, neste estudo, a análise de materiais coletados em seis locais distintos e a campo também identificou correlação positiva e significativa entre a MPAS e o NTPA.

A ocupação dos nódulos pelas estirpes não foi correlacionada significativamente com a MPAS, com o NTPA, ou com o NTU. Entretanto, a massa nodular foi correlacionada positivamente com a ocupação pelas estirpes SEMIA 587 e 5019, enquanto que a eficiência dos nódulos foi correlacionada negativamente com essas duas estirpes e positivamente com a ocupação pela SEMIA 5080. Desse modo, as estirpes SEMIAs 587 e 5019 resultaram em maior nodulação, mas a SEMIA 5080 foi a mais eficiente no processo de fixação do N_2 , confirmando relatos anteriores (NISHI; HUNGRIA, 1996; HUNGRIA et al., 1998; VARGAS; HUNGRIA, 1997; MENDES et al., 2004; HUNGRIA et al., 2006).

4.3 Ensaio 2: Experimento com soja convencional e evento transgênico para tolerância a herbicida conduzido na safra 2004/2005

4.3.1 Avaliação quantitativa da biomassa microbiana

No *Ensaio 1*, o CBM e a RB foram significativamente correlacionados (Tabela 5) e, pela maior praticidade e uso mais amplo na comunidade científica, neste *Ensaio 2* decidiu-se pela avaliação do CBM e pelo teste de um novo parâmetro, o NBM. Esses dois parâmetros foram avaliados nos sete

agroecossistemas, nos estádios de pré-plantio (PP), em R2 e, em cinco deles, em R8. De um modo geral, os maiores valores de biomassa microbiana, tanto de C como de N, foram constatados no PP (Tabela 8). Todas as áreas foram conduzidas sob o sistema de plantio convencional e a incorporação dos restos culturais provavelmente estimulou a atividade microbiana do solo no PP. Considerando o CV máximo aceitável de 35% (Tabela 3), somente dois tratamentos em Londrina apresentaram maior variabilidade no PP (transgênico + herbicida convencional e Conquista + herbicida convencional). Não houve tendência de que um dos dois parâmetros (CBM ou NBM) apresentasse menor CV. Em geral, os maiores valores de CBM e NBM foram constatados em Ponta Grossa, mas valores elevados também foram observados em Planaltina e, em duas coletas, em Sete Lagoas, esta última, inclusive, com os maiores valores observados em R8. O período de seca acentuado que ocorreu em Ponta Grossa e Londrina (Tabela 2) resultou em uma queda drástica na biomassa microbiana do solo em R8 (Tabela 8). De modo semelhante, em Sete Lagoas os valores baixos de BMC e BMN em R2 (Tabela 8) podem ser atribuídos às temperaturas bastante elevadas no período (Tabela 2). Wardle (1992) ressaltou que um déficit hídrico rápido resulta em morte de uma porção significativa da biomassa microbiana. Ainda nesse contexto, Alvarez et al. (1995) verificaram, em um ensaio conduzido em Pergamino, nos pampas argentinos, que a produção de C-CO₂ era positivamente correlacionada com a temperatura do solo e precipitação ($r^2 = 0,78-0,89$), desse modo, grandes perdas de CO₂ podem resultar em decréscimo na biomassa microbiana. Conseqüentemente, os resultados obtidos no *Ensaio 2* confirmam a sensibilidade dos parâmetros de biomassa microbiana às alterações ambientais e dão suporte a sua utilização em estudos de monitoramento ambiental, ou como bioindicadores de qualidade do solo. Outros estudos conduzidos no Brasil também relatam que os parâmetros relacionados à biomassa microbiana foram capazes de detectar alterações provocadas pelo manejo do solo e das culturas em um estágio anterior ao das mudanças nos parâmetros químicos e físicos (BALOTA et al., 1998; BALOTA et al., 2003; FRANCHINI et al., 2006). O índice de variabilidade temporal (WARDLE, 1998) também foi estimado no *Ensaio 2*. Para isso, os CVs relativos aos parâmetros de CBM e NBM obtidos em PP, R2 e R8 foram comparados. Não houve correlação entre os valores de biomassa microbiana obtidos em PP e R2, o que também pode ser constatado pela Tabela 8, pois em algumas áreas a biomassa foi superior em PP e, em outras, em R2. Contudo, o CV

do CBM em PP não diferiu estatisticamente daquele obtido em R2 ($p = 0.8081$) e o de R2 também não diferiu daquele obtido em R8 ($p = 0.5381$). O mesmo ocorreu com o parâmetro de NBM entre PP e R2 ($p = 0.2213$) ou R8 ($p = 0.8961$). Esses resultados dão maior robustez à idéia de que os parâmetros de CBM e NBM podem ser utilizados como bioindicadores em estudos de análise de riscos ambientais.

De um modo geral, os tratamentos com herbicida convencional ou herbicida específico para o evento transgênico não diferiram estatisticamente. Apenas em Ponta Grossa, em duas das seis avaliações a biomassa foi inferior com a aplicação do herbicida convencional, enquanto que em R8 em Londrina e no PP em Brasília e Sete Lagoas o tratamento com herbicida específico para o transgênico resultou em menor biomassa microbiana (Tabela 8). Os resultados disponíveis na literatura indicam que, quando a biomassa microbiana é analisada por um período maior de tempo, em geral os efeitos dos herbicidas são de menor importância e intensidade do que os de outros agrotóxicos, por exemplo, os fungicidas (WARDLE, 1992; WARDLE; HUNGRIA, 1994; WARDLE, 1995; TOPP et al., 1997). Os herbicidas podem ser tóxicos a diversos microrganismos, como por exemplo, os fotossintéticos (Topp et al., 1997). Alguns estudos demonstraram que as doses empregadas em estudos conduzidos *in vitro* são, em geral, muito superiores às aquelas utilizadas no campo e que a aplicação em concentrações realistas (iguais ou semelhantes às usadas pelos agricultores) em geral não afeta a biomassa microbiana. Além disso, parte do herbicida aplicado não atinge ao solo, outra parte é retida pela vegetação e, finalmente, o herbicida que atinge o solo é parcialmente degradado e adsorvido (GROSSBARD, 1985). Deve-se considerar, ainda, que em alguns estudos que relataram efeitos inibitórios de herbicidas a campo estes estavam, provavelmente, avaliando os efeitos indiretos, pela alteração da cobertura vegetal (WARDLE; PARKINSON, 1991; WARDLE, HUNGRIA, 1994; WARDLE, 1995). Além disso, mesmo nos casos em que as avaliações indicaram toxidez aos microrganismos, há indicações de que, assim que o produto químico foi degradado, ocorreu uma recuperação da população microbiana (TOPP et al., 1997). Em um estudo conduzido por 35 anos no Canadá com 2,4-D, por exemplo, não houve efeito significativo na biomassa e respiração microbianas, nas taxas de mineralização do N, na nitrificação e em diversas enzimas do solo, como a urease, fosfatase ou desidrogenase (TOPP et al., 1997). Em outro estudo conduzido com glifosato, a disparidade dos dados obtidos não permitiu uma análise conclusiva, mas algumas

observações puderam ser feitas em relação aos efeitos do herbicida: muitas bactérias (incluindo actinomicetos), fungos e algas foram inibidos *in vitro* pelo glifosato, em geral em função da dose. Ocasionalmente, porém, foi constatado até um incremento, tanto na população de bactérias como na de fungos do solo, pela aplicação de herbicidas (WARDLE et al., 1993). É provável, no entanto, que esse estímulo seja específico para aqueles organismos que têm a capacidade de utilizar a(s) molécula(s) presente(s) no herbicida (EIJACKERS, 1985).

De um modo geral, não houve diferença entre a cultivar Conquista e o evento transgênico nos parâmetros de biomassa microbiana em cada coleta (Tabela 8). Além disso, quando os dados de todos os locais foram analisados em conjunto, o CBM no tratamento com a cultivar Conquista foi apenas 3,4% superior ao do tratamento com o evento transgênico, diferença essa que não foi estatisticamente significativa ($p=0,056$). Também não foi detectada diferença estatística entre o tratamento com o evento transgênico recebendo herbicida específico e a Conquista recebendo herbicida convencional ($p=0,161$).

4.3.2 Avaliação qualitativa da microbiota do solo

Neste segundo ensaio, a viabilidade de utilizar o perfil de PCR-DGGE para a avaliação qualitativa da microbiota do solo foi confirmada, sendo útil tanto para detectar diferenças na diversidade microbiana, como para confirmar a homogeneidade das áreas.

Em relação aos resultados obtidos com as repetições de cada área no PP, similaridade superior a 90% entre as quatro repetições foi confirmada em todos os locais exceto pelo tratamento 1 em Brasília (Tabela 9). A análise da comunidade bacteriana também foi realizada no estádio R2 e, novamente, a similaridade entre as repetições foi superior a 90%, exceto em Ponta Grossa (Tabela 9). A seguir, as quatro repetições de cada tratamento foram combinadas duas a duas (repetições 1+3 e 2+4), o DNA da amostra combinada foi extraído e analisado por PCR-DGGE, visando verificar a possibilidade de juntar amostras e diminuir os custos. Os perfis obtidos foram semelhantes aos da primeira análise e os índices de similaridade resultantes também foram semelhantes. Na Fig. 3 são mostrados os

perfis obtidos na análise conjunta (duas repetições) em duas situações. No caso de Santo Antonio da Posse, os perfis obtidos entre as repetições no pré-plantio foram semelhantes, o mesmo acontecendo com os perfis entre os tratamentos em PP e em R2, indicando homogeneidade da área. Além disso, a maioria das bandas observadas nos perfis obtidos na amostragem do PP também esteve presente em R2 (Fig. 3). Já em Brasília, a homogeneidade entre as repetições no pré-plantio foi menor, particularmente no tratamento 1 (Fig. 3). Em R2, os perfis entre as repetições foram semelhantes (dados não mostrados), o mesmo ocorrendo entre os três tratamentos nessa mesma coleta (Fig. 3). Contudo, os perfis obtidos no PP foram bastante distintos daqueles obtidos em R2 (Fig. 3). No caso dos perfis distintos entre as coletas, há muito é reconhecido que a microbiota do solo é fortemente estimulada pela rizosfera das plantas. Como exemplo, a população de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro é estimulada com a germinação e o florescimento da planta hospedeira (HUNGRIA et al., 2003). É importante destacar que os resultados deste estudo são pioneiros em relação à análise de várias repetições, a campo, de um mesmo tratamento, bem como dos tratamentos em épocas distintas do crescimento das plantas. Com isso, comprova-se a viabilidade de utilizar essa metodologia para o monitoramento qualitativo da microbiota do solo. Além disso, os perfis de DNA foram distintos entre as áreas (dados não mostrados), indicando diferenças na diversidade entre as comunidades bacterianas de cada área. Acompanhamentos a longo prazo permitirão o maior conhecimento das alterações qualitativas na microbiota do solo, em função do ciclo das culturas, condições climáticas, entre outros. Neste primeiro ano, não foram constatadas diferenças qualitativas na microbiota do solo relacionadas à transgenia ou à composição do herbicida, sendo maior a diferença, em alguns locais, entre as coletas.

4.3.3 Fixação biológica do nitrogênio

Todos os solos utilizados neste segundo ensaio, exceto o de Brasília, também apresentavam população estabelecida de rizóbios: Ponta Grossa, $9,32 \times 10^4$ células g^{-1} de solo seco; Londrina, $1,47 \times 10^5$ células g^{-1} ; Santo Antônio da Posse, $4,27 \times 10^3$ células g^{-1} ; Sete Lagoas, $1,72 \times 10^4$ células g^{-1} ; Planaltina, $3,98 \times 10^3$

células g^{-1} ; Brasília, <10 células g^{-1} e Santo Antônio de Goiás, $1,47 \times 10^2$ células g^{-1} solo seco. De modo semelhante ao *Ensaio 1* (Tabela 6), a variabilidade no número de células de rizóbios foi bastante elevada, diminuindo com a transformação logarítmica (dados não mostrados) e indicando a dificuldade de utilização desse parâmetro para a análise de riscos ambientais. Não há dúvidas de que a avaliação da população de rizóbios do solo é fundamental para entender os sucessos ou fracassos na nodulação em áreas de primeiro cultivo com soja, mas em áreas com população estabelecida por inoculações e cultivos anteriores dificilmente é possível detectar diferenças nesse parâmetro.

Em relação à nodulação, em geral a MNS apresentou menor variabilidade do que o NN. Contudo, particularmente nos locais onde houve seca (Sete Lagoas e Santo Antônio de Goiás) ou com baixa população de rizóbios (Brasília), CVs superiores ao limite estabelecido (35%) foram observados (Tabela 10). Esses resultados também conferem maior confiabilidade às análises, uma vez que é amplamente reconhecida a sensibilidade da simbiose a estresses hídricos (Hungria et al., 2006). No *Ensaio 2* também foi constatada contribuição elevada do processo biológico, estimada em 73 a 88% de todo o N acumulado pelas plantas (Tabela 10). A análise conjunta dos dados obtidos nos sete locais indicou que não houve diferença estatística entre a Conquista e o evento transgênico nos parâmetros de: NN ($p=0,396$), MNS ($p=0,395$), MPAS ($p=0,484$), %NPA ($p=0,244$), NTPA ($p=0,443$), %N-ureído ($p=0,443$) e NTU ($p=0,486$).

De um modo geral não foram constatadas diferenças entre os herbicidas (Tabela 10) e, inclusive, na análise geral dos dados obtidos nos sete locais, não foi constatada diferença entre os dois herbicidas nos parâmetros de: NN ($p=0,458$), MNS ($p=0,300$), MPAS ($p=0,419$), %NPA ($p=0,135$), NTPA ($p=0,425$), %N-ureído ($p=0,476$) e N-ureído total ($p=0,488$). Em diversos estudos conduzidos sobre a fixação do N_2 tem sido constatado que, de um modo geral, os herbicidas são menos tóxicos que os fungicidas (por exemplo, De-POLLI et al., 1986; CATTELAN; HUNGRIA, 1994; VARGAS; HUNGRIA, 1997). Contudo, existe grande variação entre os princípios ativos dos herbicidas e, portanto, também são encontradas variações na toxidez à simbiose. Como exemplo, 42% dos estudos compilados por De Polli et al. (1986) mostraram efeitos prejudiciais dos herbicidas à fixação do N_2 . Em alguns casos, os herbicidas, incluindo o glifosato, reduziram drasticamente a sobrevivência do *Bradyrhizobium* e a nodulação da soja (por exemplo, Ali-ELDIN et

al., 1981; MARENCO et al., 1993; ZAWOZNIK et al., 1995). Além disso, no caso de toxidez, essa pode ser atribuída a um ou mais fatores. Como exemplo, Jacques et al. (2003) constataram que o crescimento *in vitro* das estirpes comerciais de *Bradyrhizobium* SEMIA 587, SEMIA 5019 e SEMIA 5079 foi afetado por sete formulações comerciais de glifosato, mas a magnitude variou tanto com a estirpe, sendo a SEMIA 587 a mais tolerante, como com a formulação, com a maior toxicidade, de até 99%, ocorrendo com o Roundap Transorb®. De modo semelhante, Zablotowicz e Reddy (2004) também constataram diferenças entre estirpes de *Bradyrhizobium* quanto à tolerância ao glifosato, afetando a taxa de crescimento das bactérias, a nodulação e o teor de leghemoglobina nos nódulos. É importante salientar, ainda, que, no caso de soja transgênica tolerante a glifosato, o *Bradyrhizobium* possui a enzima de sensibilidade ao glifosato e já foi constatado acúmulo do herbicida nos nódulos, embora não tenha sido demonstrado nenhum efeito tóxico a campo (ZABLOTOWICZ; REDDY, 2004). Por outro lado, em outros experimentos com soja não foi constatado efeito tóxico do herbicida, por exemplo, no caso da trifluralina, não sendo detectada redução na nodulação ou na ocupação de nódulos pelas estirpes inoculadas (MENDES et al., 1994).

Os parâmetros de CBM, NBM, MNS, MPAS e NTPA obtidos no *Ensaio 2*, em cada um dos sete locais na coleta realizada R2 foram correlacionados. A correlação entre o CBM e a NBM em cada local (12 amostras) não foi estatisticamente significativa (Tabela 11), entretanto, considerando os dados das sete áreas em R2 a correlação foi positiva e altamente significativa ($r=0,77$, $p \leq 6,907e^{-15}$, Fig. 4A). O CBM e o NBM também foram altamente correlacionados quando todas as épocas e todos os locais foram considerados ($r=0,75$, $p \leq 1,844e^{-36}$, Fig. 4B). Pode-se concluir, portanto, que, em estudos gerais de análise de risco ambiental, somente um dos dois parâmetros seria suficiente para monitorar quantitativamente a microbiota do solo.

Também se destacaram as correlações entre a MPAS e o NTPA em R2, significativas em todos os locais (Tabela 11). Quando os dados dos sete locais foram analisados, novamente obteve-se uma correlação positiva e altamente significativa ($r=0,96$, Fig. 5), confirmando tanto os resultados obtidos no *Ensaio 1*, como aqueles obtidos nos trabalhos de Bohrer e Hungria (1998) e Hungria e Bohrer (2000). Desse modo, em substrato estéril, ou em solos com baixos teores de N e na ausência de fertilizantes nitrogenados, como ocorre na maioria das áreas sob cultivo

com a soja no Brasil, a avaliação da MPAS representa um forte indicativo do estado nutricional da planta em N. Isso porque, no Brasil, em geral a soja recebe os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento exceto o N, que se torna o nutriente limitante ao crescimento das plantas.

Para verificar se o crescimento das plantas (MPAS) estava de fato relacionado ao N, procedeu-se à análise dos teores de P e K nos mesmos tecidos. Foi evidenciado, então, que o N foi o nutriente com maior correlação com o crescimento das plantas, sendo estatisticamente distinto do P e do K (Fig. 5). Adicionalmente, a MPAS foi significativamente correlacionada com o N proveniente da fixação do N_2 sob a forma de ureídeos (Fig. 6), houve uma correlação altamente significativa entre o NTPA e o NTU ($r=0.997$, $p\leq 1.033e^{-31}$). Cabe aqui salientar a escolha de correlação com o parâmetro de MPAS, que nos parece mais adequado do que o rendimento de grãos para estimar o efeito de diferentes manejos ou ambientes no desenvolvimento das plantas. O rendimento de grãos é uma variável complexa, condicionada por várias características genéticas e que nem sempre refletem as condições mais adequadas do solo. Como exemplo, diferenças genéticas relacionadas à resistência ao acamamento, ao número de vagens por haste, entre outras, podem resultar em rendimentos de grãos distintos e não necessariamente relacionadas às condições favoráveis para o crescimento das plantas, ou à qualidade do solo.

Quando todas as áreas foram consideradas (84 dados por parâmetro), também foram verificadas correlações positivas e altamente significativas entre a MPAS e o CBM (Fig. 7) e a BMN (Fig. 7), bem como entre o NTPA e o CBM ($r=0,65$, $p\leq 6,539e^{-10}$) e a BMN ($r=0,65$, $p\leq 4,646e^{-10}$), indicando a viabilidade de utilização dos parâmetros de biomassa microbiana como bioindicadores do crescimento da soja.

4.4 DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS PARA ESTUDOS DE ANÁLISE DE RISCO AMBIENTAL

4.4.1 Parâmetros relacionados à microbiota do solo

Inicialmente, é importante considerar a amostragem do solo e, conforme salientado por Balser et al. (2002), as repetições de solo para as análises da microbiota devem ser repetições de cada parcela, sendo ainda possível, como no caso deste estudo, analisar duas vezes cada repetição. Diversos trabalhos consideram como repetição as repetições de laboratório e não do campo, deixando de representar os tratamentos. Outro ponto relevante é a definição de níveis aceitáveis de dispersão dos dados pois, conforme salientado por Bruinsma et al. (2003), a falta de informação sobre o que deve ser uma variação “normal” ou modificada por um impacto ambiental é, provavelmente, um dos principais fatores responsáveis pelo número elevado de estudos não conclusivos sobre impacto ambiental na microbiota do solo. Uma contribuição importante deste trabalho foi o estabelecimento de limites de CV para os diversos parâmetros microbiológicos, o que deve contribuir para a análise de ensaios futuros de análise de risco ambiental no Brasil. No caso dos parâmetros quantitativos da microbiota do solo (CBM, RB e NBM), foi estabelecido que o CV deve ser inferior a 35%.

No *Ensaio 1* foi confirmada a viabilidade de utilizar a avaliação da CBM ou da RB como um indicativo quantitativo da microbiota do solo e esses parâmetros foram positiva e significativamente correlacionados. No *Ensaio 2*, os parâmetros de CBM e NBM também foram positiva e significativamente correlacionados. Conseqüentemente, qualquer um dos três parâmetros pode ser adotado para a avaliação quantitativa da microbiota do solo, dependendo das facilidades de cada laboratório. A análise dos parâmetros de CBM e RB apresenta a vantagem de estimar o qCO_2 , que pode fornecer informações importantes sobre a eficiência da microbiota do solo.

Devem-se destacar, ainda, as correlações positivas e significativas, obtidas no *Ensaio 2*, entre a microbiota do solo (CBM e NBM) e o crescimento (MPAS) e fixação do N_2 pela soja (NTPA e NTU). Esse é um forte indicativo de que

os parâmetros de CBM e NBM podem ser utilizados como bioindicadores do crescimento da soja.

Diferenças qualitativas na microbiota do solo, permitindo verificar a biodiversidade da comunidade bacteriana, bem como confirmar a homogeneidade da área puderam ser verificadas pela análise do perfil do DNA total do solo amplificado com “primers” para a região do gene ribossomal 16S, seguido por eletroforese em DGGE. Este estudo foi pioneiro na avaliação de várias repetições a campo, provenientes de diferentes agroecossistemas, bem como de amostragens em diferentes épocas e os resultados obtidos confirmaram a viabilidade do uso dessa metodologia para a análise qualitativa da microbiota do solo.

4.4.2 Parâmetros relacionados à fixação biológica do nitrogênio

Em ensaios de avaliação da fixação do N_2 , a determinação da nodulação é essencial, pois sem a mesma não é possível relacionar o processo biológico com o desempenho das plantas. A massa de nódulos secos de dez plantas por repetição foi um parâmetro mais adequado do que o número de nódulos; o CV máximo aceitável foi estabelecido em 35%. O número de células de rizóbios no solo e a ocupação dos nódulos pelas estirpes apresentaram variabilidade elevada e pouca contribuição à análise de risco ambiental.

Em relação ao crescimento e nutrição das plantas, os parâmetros de MPAS e NTPA foram adequados e ambos foram positiva e significativamente correlacionados entre si e com o NTU. Para a avaliação desses parâmetros a campo o CV máximo aceitável foi estabelecido em 20%. Comprovou-se, também, que a maior parte do N da planta foi proveniente do processo biológico e que a fixação do N_2 foi o fator determinante para o crescimento da soja. Além disso, as correlações significativas entre a MPAS e o NTPA encontradas nos dois ensaios dão suporte às conclusões de Bohrer e Hungria (1998) e Hungria e Bohrer (2000) de que, em solos com baixos teores de N e na ausência de fertilizantes nitrogenados, como ocorre na maioria das áreas sob cultivo com a soja no Brasil, a avaliação da MPAS pode ser um forte indicativo do desempenho simbiótico.

4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cada ano aumenta o número de agricultores brasileiros que utilizam soja transgênica. Inicialmente, foi utilizado material genético da Argentina, mas a Embrapa vêm desenvolvendo, desde 1997, em parceria com a iniciativa privada, soja transgênica com resistência a herbicidas. Com a liberação para o plantio da soja transgênica foi possível verificar que o material hoje disponível apresenta rendimento levemente inferior às parentais. Como exemplo, na comparação de rendimento de seis cultivares de soja transgênica (BRS 242 RR, BRS 243 RR, BRS 244 RR, BRS 245 RR, BRS 246 RR e BRS 247 RR), em 40 ensaios conduzidos por dois anos pela APASSUL, a produção foi sempre inferior no material transgênico, variando de 48 kg ha⁻¹ com a BRS 247 RR a 180 kg ha⁻¹ com a BRS 243 RR; em média, o rendimento da soja transgênica foi inferior em 113 kg ha⁻¹ ao das parentais (APASSUL, 2005). Novas cultivares transgênicas estão sendo obtidas e podem apresentar rendimentos semelhantes ou superiores às parentais, mas, neste momento, as vantagens ou desvantagens dessa tecnologia devem ser consideradas em relação ao custo de produção, por exemplo, redução na aplicação de herbicidas e menor uso de máquinas agrícolas.

Em relação à avaliação da microbiota do solo, dentre as preocupações em relação ao efeito dos transgênicos são citadas: 1) a liberação de novas proteínas para a rizosfera, podendo alterar a biodiversidade microbiana, pelo estímulo e/ou inibição de microrganismos específicos; 2) a persistência de DNA transgênico em material senescente no solo, interagindo com a microbiota; 3) a transferência horizontal de genes para microrganismos indígenas. Até o presente momento, porém, esses efeitos na microbiota do solo não foram demonstrados a campo, ou os dados não foram conclusivos, ou ocorreram de modo variável e transiente (BRUINSMA et al., 2003; DUNFIELD; GERMIDA, 2004; LYNCH et al., 2004; MOTAVALLI et al., 2004). Na análise de diversos estudos com transgênicos, Bruinsma et al. (2003) concluíram que, apesar dos avanços obtidos nas metodologias utilizadas em estudos de ecologia microbiana, os resultados não devem ser vistos como conclusivos, uma vez que novas metodologias estão sendo desenvolvidas e aperfeiçoadas. Neste estudo, algumas metodologias foram validadas a campo e foi demonstrado que podem ser utilizadas em larga escala. Em

uma aplicação prática, no *Ensaio 2*, não foi constatado efeito da transgenia ou da composição dos herbicidas na microbiota do solo, quantitativa (CBM e NBM) ou qualitativamente (PCR-DGGE), bem como no crescimento das plantas e na fixação biológica do N_2 . É importante destacar, porém, que esses resultados se referem a sete locais, mas apenas ao primeiro ano e, para a análise de risco ambiental, vários anos precisam ser analisados.

Com a assimilação da tecnologia da transgenia, algumas das pressuposições iniciais não foram confirmadas. Como exemplo, foi evidenciado que os OGMs não substituem o melhoramento tradicional, mas podem contribuir com os mesmos, bem como foi demonstrado que a inserção e expressão do gene inserido não é tão precisa e fácil como se supunha inicialmente (GEPTS, 2002). É necessário estudar, caso a caso, os benefícios e os impactos e, conforme salientou Gepts (2002) é possível que, em breve, seja reconhecida a necessidade de também avaliar o impacto ambiental em cultivares obtidas por técnicas clássicas de melhoramento. Além disso, é necessário considerar que alimentos precisam ser fornecidos a uma população crescente, desse modo, é importante desenvolver tecnologias para diminuir a degradação dos solos, preservar a biodiversidade e aumentar a disponibilidade de alimentos (HUFFMAN et al., 2003; MA, 2005). Essas tecnologias devem, provavelmente, incluir tanto o uso de transgênicos, como de não-transgênicos.

Com a adoção crescente no uso de transgênicos e de novas formulações de agrotóxicos, torna-se essencial realizar estudos de análise de risco ambiental pela adoção dessas tecnologias. Neste estudo, parâmetros mínimos para avaliar possíveis efeitos na microbiota do solo (CBM ou NBM e perfil de DNA total do solo por PCR-DGGE) e na fixação do N_2 (MNS, MPAS e, no caso de desconhecimento dos teores de N do solo, o NTPA) com a cultura da soja foram identificados. A adoção de um conjunto mínimo de parâmetros em diversos ensaios pode permitir a criação de um banco de dados, facilitando os estudos de análise de risco ambiental e garantindo respostas mais rápidas à comunidade científica e à sociedade.

5 CONCLUSÕES

Em ensaios de análise de risco ambiental a campo com a cultura da soja:

1) Este estudo indicou a viabilidade de utilização dos parâmetros de carbono ou nitrogênio da biomassa microbiana ou, ainda, da respiração basal (CBM, NBM ou RB, com CV máximo entre as repetições de 35%) como indicadores quantitativos da microbiota do solo.

2) O CBM e o NBM foram destacados como parâmetros potencialmente úteis para a utilização como bioindicadores do crescimento da soja.

3) A análise do perfil de DNA total do solo amplificado para a região do gene ribossomal 16S, seguida por eletroforese em DGGE foi eficaz para confirmar a homogeneidade das áreas, para indicar a biodiversidade da comunidade bacteriana do solo e para monitorar o efeito do manejo do solo.

4) Nos solos brasileiros, em geral pobres em N, a determinação da massa de nódulos secos (MNS, com CV máximo de 35%), e da massa da parte aérea seca (MPAS, com CV máximo de 20%) foi adequada para avaliar o crescimento e o desempenho simbiótico da soja. No caso de áreas com teores variáveis de N no solo, ou que receberam fertilizantes nitrogenados, o N total da parte aérea (NTPA) e o N total como ureídos (NTU) (com CV máximo de 20%) precisam ser analisados.

5) Esse conjunto de parâmetros foi validado em um estudo de análise de risco ambiental pelo uso de soja transgênica e herbicidas a campo. No primeiro ano não foi constatado efeito da transgenia ou da composição dos herbicidas na microbiota do solo e na fixação biológica do N₂.

REFERÊNCIAS

- ABRAMOVAY, R. **Moratória para os cerrados. Elementos para uma estratégia de agricultura sustentável.** São Paulo: Departamento de Economia e Programa de Ciência Ambiental da USP, 1999.
- ALEF, K. Nitrogen mineralization in soils. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry.** London: Academic Press, 1995. p.234-245.
- ALL-ELDIN, M.N.; MAHMOUD, S.A.Z.; MAKAWI, A.; ABDEL-NASSER; HERZALLAH, N.A. Effect of pre-emergence application of some herbicides on nodulation, nitrogen fixation and growth of soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.16, p.833-839, 1981.
- ALTIERI, M.A. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.74, p.19-31, 1999.
- ALVAREZ, R.; SANTANATOGLIA, O.J.; DANIEL, P.E.; GARCÍA, R. Respiration and specific activity of soil microbial biomass under conventional and reduced tillage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p.701-709, 1995.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, v.59, p.143-169, 1995.
- AMARAL, A.R.; MUNIZ, J.A.; SOUZA, M.A. Avaliação do coeficiente de variação como medida da precisão na experimentação com citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p.1221-1225, 1997.
- ANDERSON, J. D.; DOMSCH, K.H. Ratio of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.21, p.471-479, 1989.
- ANDRADE, D.S.; HAMAKAWA, P.J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S., eds. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola.** Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.63-94.

APASSUL (Associação dos Produtores e Comerciantes de Sementes e Mudanças do RS). **Cultivares/descrição** - lista de cultivares da cultura soja. Disponível em: <<http://www.apassul.com.br/conteudo.asp?content=12&a=view&ID=12>>. Acesso em 01 out. 2005.

ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. M. **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1993.

ARAÚJO, J.C. Produtos transgênicos na Agricultura – Questões técnicas, políticas e ideológicas. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v.18, p.117-145, 2001.

ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. Introdução. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M., eds. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.7-8.

ATKINS, C. A. Ammonia assimilation and export of nitrogen from the legume nodule. In: DILWORTH, M.J.; GLENN, A.R., eds. **Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.293-319.

ATLAS, R.M. & BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4.ed. California: Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1997. 694p.

BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; DICK, R.P. Microbial biomass in soils under different tillage and crop rotation systems. **Biology and Fertility of Soils**, v.38, p.15-20, 2003.

BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; HUNGRIA, M. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.22, p.641-649, 1998.

BALSER, T.C.; KIRCHNER, J.W.; FIRESTONE, M.K. Methodological variability in microbial community level physiological profiles. **Soil Science Society of America Journal**, v.66, p.519-523, 2002.

BARNES, R.L.; Why the American Soybean Association supports transgenic soybeans. **Pest Management Science**. V.56, p.580-583, 2000.

BARROS, L.; SILVA, J. S.; OLIVEIRA, R. S. de. Princípio da Precaução e os Transgênicos. **Site do Curso de Direito da UFSM**. Santa Maria-RS. Disponível em: <<http://www.ufsm.br/direito/artigos/precaução.htm>>.

BARTLETT, R.J.; ROSS, D.N. Colorimetric determination of oxidizable carbon in acid soil solutions. **Soil Science Society of America Journal**, v.52, p.1191-1192, 1998.

BENLLOCH, S.; MARTINEZ-MURCIA, A.J.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Sequencing of bacterial and archaeal 16S rRNA genes directly amplified from a hypersaline environment. **Systematic and Applied Microbiology**, v.18, p.574-581, 1995

BERTRAND, J., LAURENT, C. & LECLERCQ, V. **O mundo da soja**. São Paulo: HUCITEC, 1987.

Biotech acres: Global biotech plantings show double-digit growth for seventh straight year. **Council for Biotechnology Information**. Washington, 2002. Disponível em <<http://whybiotech.com/index.asp?id=1808>>

BOHRER, T.R.J.; HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.937-952, 1998.

BORÉM, A. **Escape gênico e transgênicos**. Rio Branco: Editora suprema, 2000. 204p.

BORÉM, A. Variedades transgênicas e meio ambiente. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, p.91-99, 2005.

BRANDÃO-JUNIOR, O. **Atividade e diversidade da biomassa microbiana em diferentes sistemas de manejo do solo e de culturas no norte do Estado do Paraná**. 78f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Departamento em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A., ed. **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1965. p.1149-1178.

BREWING, N.J. Development of the legume root nodule. **Annual Review of Cell Biology**, 1991. v.7, p.191-226.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. GM crops: the global economic and environmental impact – the first nine years 1996-2004. **AgBioForum**, Columbia, v. 8, n. 2 & 3, p. 187-196, 2005. Disponível em: <<http://www.agbioforum.missouri.edu/v8n23/v8n23a15-brookes.htm>>. Acesso em 28 out. 2005.

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 & Biochemistry**, v.17, p.837-842, 1985.

BROOKES, P.C.; MC GRATH, S.P. Effects of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass. **The Journal of Soil Science**, v.35, p.341-346, 1984.

BRUINSMA, M.; KOWALCHUK, G.A.; VAN VEEN, J.A. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.37, p.329-337, 2003.

CAMPOS, B.C.; HUNGRIA, M.; TEDESCO, V. Eficiência da fixação biológica de N₂ por estirpes de *Bradyrhizobium* na soja em plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.25, p.583-592, 2001.

CARPENTER, J.E.; GIANESSI, L.P. **Agricultural biotechnology: updated benefit estimates**. National Center for Food and Agricultural Policy, Washington, DC.

CATANHÊDE, E.; SOLIANI, A. Lula deve liberar plantio de soja transgênica. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 20 set. 2003. Caderno Dinheiro, p.B4.

CATTELAN, A.J.; HUNGRIA, M. Nitrogen nutrition and inoculation. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Tropical soybean improvement and production**. Rome: FAO, 1994. p.201-215. (FAO. Plant Production and Protection Series, 27).

CATTELAN, A.J.; VIDOR, C. Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo, em função de variações ambientais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.14, p.133-142, 1990.

CBD (The Convention on Biological Diversity). **Handbook of the convention on biological diversity**. 3rd ed. Quebec, Canadá: CBD, 2005. 1493p. Disponível em: <[http:// www.biodiv.org/convention/](http://www.biodiv.org/convention/) > Acesso em 28 out. 2005.

CERRI, C.C.; ANDREUX, F.; EDUARDO, B.P. O ciclo do carbono no solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, 1992. p.73-90.

CHAMPION, G.T.; MAY, M.J.; BENNETT, S; BROOKS, D.R.; CLARK, S.J.; DANIELS, R.E.; FIRBANK, L.G.; HAUGTON, A.J.; HAWES, C.; HEARD, M.S.; PERRY, J.N.; RNADLE, Z.; ROSSALL, M.J.; ROTHERY, P.; SKELLERN, M.P.; SCOTT, R.J.; SQUIRE, G.R.; THOMAS, M.R. Crop management and agronomic context of the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v.358, p.1801-1818, 2003.

CHESBORO, W.; ARBIDGE, M.; EIFFERT, F. When nutrient limitation places bacteria in the domains of slow growth: methabolic, morphologic and cell cycle behaviour. **FEMS Microbiology Ecology**, v.74, p.103-120, 1990

Comparative environmental impacts of biotechnology-derived and traditional soybean, corn, and cotton crops. **Council for Agricultural Science and Technology**. CAST, Ames, IA, 2002.

COSTA, N.M.B.; BORÉM, A. **Biotecnologia e nutrição**. São Paulo: Editora Nobel. 2003. 214p.

COWAN, D.A. Microbial genomes – the untapped resource. **Tibtech**, v.18, p.14-16, 2000.

DE-POLLI, H.; SOUTO, M.; FRANCO, A.A. **Compatibilidade de agrotóxicos com *Rhizobium* spp. e a simbiose das leguminosas**. Seropédica: EMBRAPA-UAPNPBS, 1986. 71p. (EMBRAPA-UAPNPBS. Documentos, 3).

DICK, R.P.; BREAKWELL, D.P.; TURCO, R. F. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. In: DORAN, J.W.; JONES, A.J., eds. **Methods for assessing soil quality**. Madison, Soil Science Society of America, 1996. p.247-272. (SSSA Special Publication, 49)

Disponível em <<http://www.ncfap.org/reports/biotech/updatedbenefits.pdf>>. Acesso: em 13 out. 2005

DÖBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. **Nature**, v.210, p.850-852, 1966.

DUNFIELD, K.E; GERMIDA, J.J. Impact of genetically modified crops on soil- and plant- associated microbial communities. **Journal of Environmental Quality**, v.33, p.806-815, 2004.

EAGLESHAM, A., PUEPPKE S.G.; HARDY R.W.F. Genetically modified food and the consumer. **NABC Report**, n.13, 2001. 248p. (National Agricultural Biotechnology Council, Ithaca, NY)

EIJSACKERS, H. Effects of glyphosate on the soil fauna. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D., eds. **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p.151-158.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília/Rio de Janeiro: Embrapa SPI/Embrapa Solos, 1999. 412p.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja** - Paraná 2005. Londrina: Embrapa Soja, 2004a. 224p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 5).

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja** – Região Central do Brasil 2005. Londrina: Embrapa Soja-Embrapa Cerrados-Embrapa Agropecuária Oeste-Fundação Meridional, 2004b. 239p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 6).

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1977. 11p. (Cooperative Extension Service. Special report, 80).

FEIJE, F.; ANGER, V. Spot test in inorganic analysis. **Analytical Chemistry Acta**, v.149, p.363-367, 1972.

FINARDI, F.; MENOSSI, M.; SILVEIRA, J.M.; FUKUMA, P.; DI BLASI, G. **Transgênicos você tem direito de conhecer**. Disponível em: <<http://www.cib.org.br/pdf/cartilha.pdf>>. Acesso: em 19 out. 2005.

FIRBANK, L.G. Introduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v.358, p.1777-1778, 2003.

FIRBANK, L.G.; DEWAR, A.M.; HILL, M.O.; MAY, M.J.; PERRY, J.N.; ROTHERY, P.; SQUIRE, G.R.; WOIWOD, I.P. Farm-scale evaluation of GM crops explained. **Nature**, v.399, p.727-728, 1999.

FIRBANK, L.G.; HEARD, M.S.; WOIWOD, I.P.; HAWES, C.; HAUGHTON, A.J.; CHAMPION, G.T.; SCOTT, R.J.; HILL, M.O.; DEWAR, A.M.; SQUIRE, G.R.; MAY, M.J.; BROOKS, D.R.; BOHAN, D.A.; DANIELS, R.E.; OSBORNE, J.L.; ROY, D.B.; BLACK, H.I.J.; ROTHERY, P.; PERRY, J.N. An introduction to the Farm-Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. **Journal of Applied Ecology**, v.40, p.2-16, 2003.

FRANCHINI, J.C.; CRISPINO, C.C.; SOUZA, R.A.; TORRES, E.; HUNGRIA, M. Microbiological parameters as indicators of soil quality under various soil management and crop rotation systems in southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, 2006 (in press).

FRANZ, J.E.; MAO, M.K.; SIKORSKI, J.A. Glyphosate a unique global herbicide. **America Chemistry Society**, Washington: DC, 1997.

FRASSEN, H.J.; VIJN, I.; YANG, W.C.; BISSELING, T. Developmental aspects of the Rhizobium-legume symbiosis. **Plant Molecular Biology**, v.19, p.89-107, 1992.

GAN, Y.; STULEN, I.; POSTHUMUS, F.; VAN KEULEN, H.; KUIPER, P.J.C. Effects of N management on growth, N₂ fixation and yield of soybean. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.62, p.163-174, 2002.

GARCIA, C.H. **Tabelas para a classificação do coeficiente de variação**. Piracicaba: IPEF, 1989. 10p. (IPEF. Circular Técnica, 171).

GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. The road map to the *Manual*. In: GARRITY, G.M.; BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2.ed. New York: The Williams & Wilkins, 2001. v.1, p.119-154.

GEPTS, P. A comparison between crop domestication, classical plant breeding and genetic engineering. **Crop Science**, v.42, p.1780-1790, 2002.

GEPTS, P. Introduction of transgenic crops in centers of origin and domestication. In: KLEINMAN, D.L.; KINCHY, A.J.; HANDELSMAN, J., eds. **Controversies in science and technology**: from maize to menopause. Madison: The University of Wisconsin Press, 2005. p.119-134.

GEPTS, P. Who owns biodiversity, and how should the owners be compensated? **Plant Physiology**, v.134, p.1295-1307, 2003.

GEPTS, P.; PAPA, R. Possible effects of (trans)gene flow from crops on the genetic diversity from landraces and wild relatives. **Environmental Biosafety Research**, v.2, p.89-103, 2003.

GIANOTTO, D.; FEITOZA, L.; COLLET, T.; GASPAR, V. **Alimentos transgênicos**. Disponível em: <<http://www.dbi.uem.br/transgênicos.pdf>>.

GOMES, F.P. **A estatística moderna na pesquisa agropecuária**. Piracicaba: POTAFOS, 1984. 160p.

GOTTSCHAL, J.C. Phenotypic response to environmental changes. **FEMS Microbiology Ecology**, v.74, p.93-102, 1990.

GRISI, B.M.; GRAY, T.R.G. Comparação dos métodos de fumigação, taxa de respiração em resposta à adição de glicose e conteúdo de ATP para estimar a biomassa microbiana de solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.10, p.109-115, 1986.

GROSSBARD, E. Effects of glyphosate on the microflora: with reference to the decomposition of treated vegetation and interaction with some plant pathogens. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D., eds. **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p.159-185.

HALVERSON, L.J.; STACEY, G. Signal exchange in plant-microbe interactions. **Microbiological Reviews**, v.50, p.193-255, 1986.

HAMDI, Y.A. Soil-water tension and the movement of *Rhizobium*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.3, p.121-126, 1971.

HAWKSWORTH, D. L. Biodiversity in microorganisms and its role in ecosystem function. In: SOLBRIG, O. T.; VAN EMDEN, H. M.; VAN OORDT, P.G.W.J., eds. **Biodiversity and global change**. Paris: IUBS 1992. p. 83-89.

HAYDOCK, K.P.; NORRIS, D.O.; MANNETJE, L. 't. The relation between nitrogen percent and dry weight of inoculated legumes. **Plant and Soil**, v.57, p.353-362, 1980.

HERRIDGE, D.F.; PEOPLES, M.B. Ureide assay to measuring HUNGRIA, M. O emprego de técnicas de biotecnologia nos estudos de microbiologia do solo: solução para velhos e novos problemas. In: ALVARES V., V.H.; FONES, L.E.F.; FONTES M.P.F., eds. **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado**. Viçosa: SBCS, UFV, DPS, 1996. p.489-504.

HOPKINS, W. G. **Introduction to plant physiology**. New York, John Wiley & Sons, 1995. 464 p.

http://www.conab.gov.br/download/safra/6levant_de_safra.pdf – Safra 05/06

HUFFMAN, W.E.; ROUSU, M.; SHOGREN, J.F.; TEGENE, A. **Better dead than GM-fed?** Information and the effects of consumers' resistance to GM-foods in high-income countries. Ames: Iowa State University, 2003. 37p. (Department of Economics Working Paper Series # 03017). Disponível em: <http://www.econ.iastate.edu/research/webpapers/paper_10345_03017.pdf>. Acesso em 28 dez. 2005.

HUNGRIA, M.. Metabolismo do carbono e do nitrogênio nos nódulos. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S., eds. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa SPI, 1994. p.250-283.

HUNGRIA, M.; BODDEY, L.H.; SANTOS, M.A.; VARGAS, M.A.T. Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v.27, p.393-399, 1998.

HUNGRIA, M.; BOHRER, T.R.J. Variability among soybean cultivars for N₂ fixation capacity. **Biology and Fertility of Soils**, v.31, p.45-52, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J. ; MENDES, I.C. 2003. Benefits of inoculation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, p.88-93, 2003.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J. A fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 30., 2005, Recife. **Anais**. Solos, sustentabilidade e qualidade ambiental. Recife: SBCS, URFPE, Embrapa Solos, 2005. 30p. (CD Rom).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C.; GRAHAM, P.H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R.P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P.K., eds. **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston, Texas: Studium Press, LLC, 2006. p.43-93.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E., eds. **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment**. Series: Nitrogen fixation: origins, applications, and research Progress. v.4. Amsterdam: Springer, 2005. p.25-42.

HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; DÖBEREINER, J. Relative efficiency, ureide transport and harvest index in soybeans inoculated with isogenic HUP mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. **Biology and Fertility of Soils**, v.7, p.325-329, 1989.

HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology and Biochemistry**. 1997.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAÚJO, R.S. Fixação biológica do N₂ em feijoeiro. In: HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAÚJO, R.S., eds. **Biologia dos solos de Cerrados**. Planaltina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1997. p.189-294.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M., eds. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.9-89.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Mapas interativos**. mapa de solos. Disponível em: <<http://www.ibge.org.br>>. Acesso em 01 out. 2005.

JACCARD, P. The distribution of flora in the alpine zone. **New Phytologist**, v.11, p.37-50, 1912.

JACOB, G.S.; GARBOW, J.R.; HALLAS, L.E.; KIMACK, N. M; KINSHORE, G.M.; SCHAEFER, J. Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* strain LBr. **Applied Environment Microbiology**, v.54, p.2953-2958, 1988.

JACQUES, R.J.S.; SANTOS, J.B.; PROCÓPIO, S.O.; KASUYA, M.C.M; SILVA, A.S.; SANTOS, E.A. Efeito das diferentes formulações do herbicida glifosato no crescimento do rizóbio da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Anais**. Ribeirão Preto: UNESP/SBCS, 2003. Resumos expandidos (CD-ROM).

JAMES, C. Preview: global status of commercialized biotech/GM crops: 2004. In: ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications), **Highlights of Briefs** No. 32-2004. Metro Manila, Filipinas: ISAAA SEAsiaCenter, 2005. 12 p. Disponível em: <[http://www.isaaa.org/kc/CBTNews/press_release/briefs32/ESummary/Executive%20Summary%20\(Portuguese\).pdf](http://www.isaaa.org/kc/CBTNews/press_release/briefs32/ESummary/Executive%20Summary%20(Portuguese).pdf)>. Acesso em 28 out. 2005.

JENKINSON, D.S. Studies on the decomposition of plant material in soil. II. Partial sterilisation of soil and the soil biomass. **Journal of Soil Science**, v.17, p.280-302, 1966.

JENKINSON, D.S.; BROOKES, P.C.; POWLSON, D.S. Measuring soil microbial biomass. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.5-7, 2004.

JENKINSON, D.S.; LADD, J.N. Microbial biomass in soils: measurement and turnover. In: PAUL, E.A.; LADD, J.N., eds. **Soil biochemistry**. v.5. New York: Marcel Decker, 1981. p.415-471.

JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effects of biocide treatment on metabolism in soil. I. Fumigation with chloroform. **Soil Biology & Biochemistry**, v.8, p.167-177, 1976a.

JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effects of biocide treatment on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. **Soil Biology & Biochemistry**, v.8, p.209-213, 1976b.

KIJNE, J.W. The *Rhizobium* infection process. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J, eds. **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.349-398.

KING, C.A.; PURCELL, L.C.; VORIES, E. D. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to foliar glyphosate applications. **Agronomy Journal**. V.93, p.179-186, 2001.

KOVACH, J.; PETZOLDT, C.; DEGNI, J.; TETTLE, J. **A method to measure the environmental impact of pesticides**. Geneva, NY: Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station Geneva, 1992. (IPM Program). Disponível em <<http://www.nysipm.cornell.edu/publications/EIQ/>>. Acesso em 01 jun. 2004.

KOZDRÓJ, J., VAN ELSAS, J.D. Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialised area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling. **Applied Soil Ecology**, v.17, p.31-42, 2001.

LADD, J.N.; AMATO M.; OADES, J.M. Decomposition of plant material in Australian soils. III. Residual organic and microbial biomass C and N from isotope-labelled legume material and soil organic matter, decomposing under field conditions. **Australian Journal of Soil Research**, v.23, p.603-611, 1985.

LEITE, M. **Plantio de transgênicos cresce 44%**. São Paulo, 20 jan. 2000.

LIU, C.-M.; McLean, P.A.; SOOKDEO, C.C.; CANNON, F.C. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. **Applied Environment Microbiology**, v.57, p.1799-1804, 1991.

LYNCH, J.M. Interactions between biological processes, cultivation and soil structure. **Plant and Soil**, v.76(1-3), p.307-318, 1984.

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

MA (Millennium Ecosystem Assessment). **Living beyond our means: natural assets and human well-being – statement from the board**. United Nations: Milenium Ecosystem Assessment, 2005. 21p. Disponível em: <<http://www.millenniumassessment.org>>. Acesso em 01 nov. 2005.

MARENCO, R.; LOPES, N.F.; MOSQUIM, P.R. Nodulation and nitrogen fixation in soybeans treated with herbicides. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.5, p.121-126, 1993.

McCLURE, P.R.; ISRAEL, D.W. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. **Plant Physiology**, v.64, p.411-416, 1979.

MEDEIROS, S. A. F. Agricultura moderna e demandas ambientais: o caso da sustentabilidade da soja nos cerrados. In: DUARTE, L. M. G.; SANTANA, M. L. (orgs.) **Tristes cerrados. Sociedade e biodiversidade**. Brasília: Paralelo 15, 1998. p.127-145.

MELLO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa, CNPMA, 1998. 488p.

MELLONI, R.; PEREIRA, E.G.; TRANNIN, I.C.B.; SANTOS, D. R.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Características biológicas de solos sob mata ciliar e campo cerrado no sul de Minas Gerais. **Ciência Agrotécnica**, v.25, p.7-13, 2001.

MENDES, I.C.; HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Establishment of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains in a Brazilian Cerrado oxisol. **Biology and Fertility of Soils**, v.40, p.28-35, 2004.

MENDES, I.C.; SUHET, A.R.; VARGAS, M.A.T.; PERES, J.R.R.; VIVALDI, L. Efeitos do trifluralin e da inoculação com rizóbio na soja cultivada em solos de Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.18, p.1-6, 1994.

MONSANTO (Monsanto do Brasil Ltda). **Plano de monitoramento comparativo de plantios comerciais da soja geneticamente modificada com tecnologia Roundup Ready® e do sistema convencional em diferentes regiões do Brasil**. São Paulo: Monsanto do Brasil Ltda, 2002. Impresso. 91p.

MOO-YOUNG, M., ed. **Comprehensive biotechnology**. 4v. Oxford: Pergamon Press, 1985. 3764p.

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

MUELLER, C. C. **A sustentabilidade da expansão agrícola nos cerrados**. Instituto Sociedade, População e Natureza – Documento de Trabalho n.36, 1995.

MUELLER, C. C. **Dinâmica, condicionantes e impactos socio-ambientais da evolução da fronteira agrícola no Brasil**. Instituto Sociedade, População e Natureza – Documento de Trabalho n.7, 1992.

MUYZER, G. Genetic fingerprinting of microbial communities – present status and future perspective. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 8., Halifax, 1999. **Proceedings**. <http://plato.acadiau.ca/isme/Symposium16/muyzer.PDF>

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

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.73, p.127-141, 1998.

MYERS, R.M.; FISCHER, S.G.; LERMAN, L.G.; LERMAN, L.S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v.13, p.3131-3145, 1985.

MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K. & BISSELING, T. Symbiotic nitrogen fixation. **The Plant Cell**, v.7, p.869-885, 1995.

NEVES, M.C.P.; DIDONET, A.D.; DUQUE, F.F., DÖBEREINER, J. Rhizobium strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, v. 36, p.1179-1192, 1985.

NEVES, M.C.P.; HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, v.6, p.267-321, 1987.

NISHI, C.Y.M. Identificação sorológica de *Bradyrhizobium/Rhizobium*. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S., eds. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa SPI, 1994. p.171-181.

NISHI, C.Y.M.; HUNGRIA, M. Efeito da reinoculação na soja [*Glycine max* (L.) Merrill] em um solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium* com as estirpes SEMIA 566, 586, 587, 5019, 5079 e 5080. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, 359-368, 1996.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v.18, p.81-116, 2001.

NUERNBERG, N.J.; VIDOR, C.; STAMMEL, J.G. Efeito de sucessões de culturas e tipos de adubação na densidade populacional e atividade microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.8, p.197-203, 1984.

O'DONNELL, A.G.; GORRES, H. 16S rDNA methods in soil microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, p.225-229, 1999.

O'CALLAGHAN, M.O.; GLARE, T.R. Impacts of transgenic plants and microorganisms on soil biota. *N. Z. Plant Protection*, v.54, p.105-110, 2001.

OLIVEIRA, J.R.A.; MENDES, I.C.; VIVALDI, L. Carbono da biomassa microbiana em solos de cerrado sob vegetação nativa e sob cultivo: avaliação dos métodos fumigação-incubação e fumigação-extração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.25, p.863-871, 2001.

PACE, N.R.; STAHL, D.A.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, v.9, p.1-55, 1986.

PAGGA, U. Testing biodegradability with standardized methods. **Chemosphere**, v. 35, p.2953-2972, 1997.

PAUL, E.A. & CLARK, F.E., eds. **Soil microbiology and biochemistry**. New York: Academic Press, 1989. 340p.

PEOPLES, M.B.; HERRIDGE, D.F. Quantification of biological nitrogen fixation in agricultural systems. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E., eds. **Nitrogen fixation**: from molecules to crop productivity. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 519-524.

PERRY, J.N.; ROTHERY, P.; CLARK, S.J.; HEARD, M.S.; HAWES, C. Design, analysis and statistical power of the Farm-Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. **Journal of Applied Ecology**, v.40, p.17-31, 2003.

PFENNING, L.; EDUARDO, B.P.; CERRI, C.C. Os métodos da fumigação-incubação e fumigação-extração na estimativa da biomassa microbiana dos solos da Amazônia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.16, p.31-37, 1992.

PINHO, C. A soja é pop. **Isto é**, São Paulo, v.1796, p.80-81, 2004.

PIPKE, R.N.; AMRHEIN, N.; JACOB, G.S.; SCHAEFER, J.; KISHORE, G. M. Metabolism of glyphosate in an *Arthrobacter* sp. GLP-1. **European Journal of Biochemistry**, v.165, p.267-273, 1987.

RAMALHO, M.A.P.; FERREIRA, D.F.; OLIVEIRA, A.C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2005. 322p.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environmental. **Research in Microbiology**, v.151, p.167-177, 2000.

REBER, H.H. Simultaneous estimates of the diversity and the degradative capability of heavy-metal-affected soil bacterial communities. **Biology and Fertility of Soils**, v.13, p.181-186, 1992.

REDDY, K.N. Glyphosate resistant soybean as a weed management tool: Opportunities and challenges. **Weed Biology and Management**, v.1, p.193-202, 2001.

REDDY, K.N.; WHITING, K. Weed control and economic comparisons of glyphosate-resistant, sulfonylurea-tolerant, and conventional soybean (*Glycine max*) systems. **Weed Technology**, v.14, p.204-211, 2000.

REDDY, K.N.; ZABLOTOWICZ, R.M. Glyphosate-resistant soybean response to various salts of glyphosate and glyphosate accumulation in soybean nodules. **Weed Science**, v.51, p.496-502, 2003.

RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola). **Relato da VI Reunião da Rede de Laboratórios para a Recomendação de Estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium***, 09 e 10 de junho de 1994. Disponível em: <<http://www.relare.org.br/rtfatas/3c38808cc8e0166e715ab6061ee91783.rtf>>. Acesso em 28 dez. 2005.

RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola). **Relato da IX Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola**, 16 a 18 de maio de 2000. Disponível em: <<http://www.relare.org.br/rtfatas/3077c4972fef320a47e17bff91c68dc.rtf>>. Acesso em 28 dez. 2005.

RICE, C.W.; MOORMAN, T.B.; BEARE, M. Role of microbial biomass carbon and nitrogen in soil quality. In: DORAN, J.W.; JONES, A.J., eds. **Methods for assessing soil quality**. Madison, Soil Science Society of America, 1996. p. 203-215. (SSSA Special Publication, 49).

RITZ, K.; DIGHTON, J.; GILLER, K.E. **Beyond the biomass composition and functional analysis of soil microbial communities**. Chichester: John Wiley & Sons, 1994. 275p.

RODRIGUES, E.F.G.; GUERRA, J.G.M.; ALMEIDA, D.L.; DE-POLLI, H. Biomassa microbiana de carbono de solos de Itaguaí (RJ): comparação entre os métodos fumigação-incubação e fumigação-extração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.18, p.427- 432, 1994.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F. Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C.; NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C. eds. **Recursos genéticos e melhoramento**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002. p. 99-147.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia**, v.28, p.135-147, 1997.

ROSWALL, T. Nitrogen losses from terrestrial ecosystems: global, regional and local considerations. In: **INTERNATIONAL MEET. GLOBAL IMPACTS OF APPLIED MICROBIOLOGY BANKOK**, 5., 1979. p.17-26.

ROVIRA, A.D. Microbiology of pasture soil and some effects of microorganisms on pasture plants. In: WILSON, J.R., ed. **Plant relations in pastures**. Melbourne: CSIRO, 1978. p.95-110.

SANTOS, M.A.; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, 2006. (no prelo).

SAS (SAS Institute Inc). **Proprietary of software**, Version 6, 4th ed. Cary, NC: SAS Institute, 1999.

SCAPIM, C.A.; CARVALHO, C.G.P.; CRUZ, C.D. Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p.683-686, 1995.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R.C.; REIS, M.S. Melhoramento da soja. In: Borém, A.(ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV p. 488-533, 1999.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotechnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília, Ministério da Educação e Cultura, 1988. p.191-204 (Série Agronomia).

SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Ecologia do solo. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. (eds). **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002a. p.81-153.

SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Fixação Biológica do Nitrogênio atmosférico. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. (eds). **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002b. p.399-471.

SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Matéria orgânica do solo. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. (eds). **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002c. p.191-241.

SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Metabolismo e Biomassa Microbiana. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. (eds). **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002d. p.153-190.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**. San Francisco, CA: Freeman, 1973. 573p.

SPARLING, G.P. Soil microbial biomass, activity and nutrient cycling as indicators of soil health. In: PANKHURST, C.; DOUBE, B.M.; GUPTA, V.V.S.R., eds. **Biological indicators of soil health**. Cambridge: CAB International, 1997. p.97-120.

SPRENT, J. I. Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some Leguminosae. **Plant Cell Environment**, v. 3, p.35-43, 1980.

SQUIRE, G.R.; BROOKS, D.R.; BOHAN, D.A.; CHAMPION, G.T.; DANIELS, R.E.; HAUGTON, A.J.; HAWES, C.; HEARD, M.S.; HILL, M.O.; MAY, M.J.; OSBORNE, J.L.; PERRY, J.N.; ROY, D.B.; WOIWOD, I.P.; FIRBANK, L.G. On the rationale and interpretation of the farm scale evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v.358, p.1779-1799, 2003.

SUETT, D.L.; FOURNIER, J.C.; MOURIDOU, E.P.; PUSSEMIER, L.; SMELT, J. Accelerated degradation: the European dimension. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, p.1741-1748, 1996.

TATÉ, R.; PATRIARCA, E.J.; RICCIO, A.; DEFEZ, R.; IACCARINO, M. Development of *Phaseolus vulgaris* root nodules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.7, p.582-589, 1994.

TOPP, E.; VALLAEYS, T.; SOULAS, G. Pesticides: microbial degradation and effects on microorganisms. In: VAN ELSAS, J.D.; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H., eds. **Modern soil microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1997. p.547-575.

TORSTENSSON, N.T.L.; HAMISSEPP, A. Detoxification of glyphosate in soil. **Weed Research**, v.17, p.209-212, 1977.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environment Microbiology**, v.56, p.782-787, 1990

TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos da qualidade dos solos. In: ALVAREZ, V.H.; SCHAEFER, C. E. G. R.; BARROS, N. F.; MELO, J. W. V.; COSTA, L.M. (eds). **Tópicos em ciência do solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. v.2, p.196-264.

TSAI, S.M.; BARAIBAR, A.V.L.; ROMANI, V.L.M. Efeitos de fatores físicos e químicos sobre os microrganismos do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (eds). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.59-72

UNIVERSITY OF AMSTERDAM. **The correlation coefficient**. Disponível em: <<http://www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics.html>>. Acesso em 28/12/2005.

UNKOVICH, M.J.; PATE, J.S. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. **Field Crops Research**, v.65, p.211-228, 2000.

VAN BRUGGEN, A.H.C.; SEMENOV, A.M. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. **Applied Soil Ecology**, v.15, p.13-24, 2000.

VAN KESSEL, C.; HARTLEY, C. Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation? **Field Crops Research**, v.65, p.165-181, 2000.

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

VARGAS, L.K.; SCHOLLES, D. Nitrogênio da biomassa microbiana, em solo sob diferentes sistemas de manejo, estimado por métodos de fumigação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.22, p.411-417, 1998.

VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do N₂ na cultura da soja. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M., eds. **Biologia dos solos de Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p.297-360.

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford, UK: Blackwell, 1970. 164p. (IBP Handbook, 15).

VOGELS, S.G.D.; VAN DER DRIFT, C. Differential analysis of glyoxylate derivatives. **Analytical Biochemistry**, v.33, p.143-157, 1970.

WARDLE, D.A. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. **Biological Reviews**, v.67, p.321-358, 1992.

WARDLE, D.A. Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: a global scale synthesis. **Soil Biology & Biochemistry**, v.30, p.1627-1637, 1998.

WARDLE, D.A. Impacts of disturbance on detritus food webs in agro-ecosystems of contrasting tillage and weed management practices. In: BEGON, M.; FITTER, A.H., eds. **Advances in ecological research**. London: Academic Press, 1995. p.105-185.

WARDLE, D.A. Metodologia para quantificação da biomassa microbiana do solo. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S., eds. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa SPI, 1994. p. 419-430.

WARDLE, D.A.; HUNGRIA, M. A biomassa microbiana do solo e sua importância nos ecossistemas terrestres. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M., eds. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.195-216.

WARDLE, D.A.; PARKINSON, D. Relative importance of the effects of 2,4-D, glyphosate and environmental variables on the soil microbial biomass. **Plant and Soil**, v.134, p.209-219, 1991.

WARDLE, D.A.; YEATES, G.W.; WATSON, R.N.; NICHOLSON, K.S. Response of soil microbial biomass and plant litter decomposition to weed management strategies in maize and asparagus cropping systems. **Soil Biology & Biochemistry**, v.25, p.857-868, 1993.

WATSON, J.D.; CRICK, F.H.C. Molecular structure of nucleic acids. **Nature**, n.4356, p.737-738, 1953.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.697-703, 1991.

WOESE, C.R. Bacteria evolution. **Microbiology Reviews**, v.51, p.221-271, 1987.

WOOMER, P.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1112-1116, 1988.

YONEYAMA, T. Partitioning and metabolism of nitrate, asparagine, and allantoin in the soybean shoots at the grain-filling stage. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.30, p.583-587, 1984b.

YONEYAMA, T. Partitioning and metabolism of nitrogen supplied as nitrate, amides and allantoin to detached vegetative shoots of soybeans via transpiration stream. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.30, p.333-343, 1984a.

YOUNG, P. Major microbial diversity initiative recommended. **ASM News**, v.3, p.417-421, 1997.

ZABLOTOWICZ, R.M.; REDDY, K.N. Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. **Journal of Environmental Quality**, v.33, p.825-831, 2004.

ZANLORENZI, M. R. P. Os custos sociais da política comercial brasileira para a soja, 1992. Dissertação de mestrado – ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ZAWOZNIK, M.S.; BENAVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. Effect of herbicide diuron on growth and symbiotic behaviour of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. **European Journal of Soil Biology**, v.31, p.183-188, 1995.

Tabela 1 – Localização, clima e tipo de solo nos municípios onde os experimentos foram conduzidos¹

Local		Clima	Latitud e (S)	Longitud e (W)	Solo ¹
<i>Ensaio 1: Plantio comercial com soja convencional, safra 2002/2003</i>					
São Luiz Gonzaga	RS	mesotérmico brando, super úmido sem seca	28°24'	54°57'	Latossolo Vermelho
Passo Fundo	RS	mesotérmico brando, super úmido sem seca	28°15'	52°24'	Latossolo Bruno
Ponta Grossa	PR	mesotérmico brando, super úmido sem seca	25°05'	50°09'	Latossolo Vermelho
Cascavel	PR	subquente, super úmido, subseca	24°57'	53°27'	Nitossolo Vermelho
Londrina	PR	subquente, super úmido, subseca	23°18'	51°09'	Nitossolo Vermelho
Dourados	MS	subquente, úmido, 3 meses secos	22°13'	54°48'	Latossolo Vermelho
<i>Ensaio 2: Experimento com evento transgênico e soja convencional, safra 2004/2005</i>					
Ponta Grossa	PR	mesotérmico brando, super úmido sem seca	25°05'	50°09'	Latossolo Vermelho
Londrina	PR	subquente, super úmido, subseca	23°18'	51°09'	Latossolo roxo
Santo Antonio da Posse	SP	subquente, super úmido, subseca	22°37'	46°54'	Argilossolo Vermelho-Amarelo
Sete Lagoas	MG	subquente, úmido, 3 meses secos	19°27'	44°14'	Argissolo Vermelho
Santo Antônio de Goiás	GO	subquente, semi-úmido, 4 a 5 meses secos	16°29'	49°18'	Argissolo Vermelho
Brasília	DF	quente, semi-úmido, 4 a 5 meses secos	15°46'	47°55'	Latossolo Vermelho
Planaltina	DF	quente, semi-úmido, 4 a 5 meses secos	15°27'	47°36'	Latossolo Vermelho

¹ Fonte: Embrapa (1999) e IBGE (2005).

Tabela 2 – Data de semeadura, precipitação (mm) e temperatura média mensal (°C) nos sete locais do *Ensaio 2*, com evento transgênico e soja convencional na safra 2004/2005¹.

Local	Data	Novembr		Dezembr		Janeiro		Fevereiro		Março		Abril		Maio	
		mm	°C	mm	°C	mm	°C	mm	°C	mm	°C	mm	°C	mm	°C
Ponta Grossa	05/11/04	189	18,5	187	19,7	215	19,2	64	20,1	81	20,2	159	20,5	1	15,4
Londrina	03/11/04	127	22,9	179	22,9	376	23,4	52	23,4	48	24,2	48	24,5	91	21,5
Santo Antonio da Posse	10/11/04	220	23,0	200	23,4	313	22,5	123	23,5	169	23,4	83	23,3	0	19,5
Sete Lagoas	03/12/04	n.d.	n.d.	385	28,2	281	29,2	148	28,9	275	29,8	36	28,5	0	25,9
Santo Antônio de Goiás	04/12/04	n.d.	n.d.	297	24,7	223	24,3	154	24,9	93	24,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Brasília	24/11/04	n.d.	21,7	175	21,6	361	21,5	363	21,7	189	21,1	68	21,9	n.d.	20,2
Planaltina	23/11/04	45	22,0	237	22,2	195	22,2	190	22,9	297	21,1	n.d.	22,8	n.d.	20,8

¹ n.d., dados não disponibilizados.

Tabela 3 – Classificação¹ dos coeficientes de variação (CV) segundo as estimativas das médias aritméticas (\bar{x}) e do desvio padrão (s) das médias dos CVs obtidos nas avaliações realizadas nos *Ensaio 1 e 2*.

Parâmetro ²	n°. de informa ções	\bar{x}	s	CV				
				Baix o	Médio	Alto	Muito alto	
<i>Parâmetros com alta variabilidade</i>								
CBM	56	21,86	11,77	<10,09	10,09 33,63	a	33,63 45,40	a >45,40
NBM	45	23,85	11,83	<12,01	12,01 35,69	a	35,69 47,53	a >47,53
NN	25	24,88	12,84	<12,03	12,03 37,73	a	37,73 50,58	a >50,58
MNS	25	20,72	11,87	< 8,84	8,84 32,60	a	32,60 44,47	a >44,47
<i>Parâmetros com baixa variabilidade</i>								
Log nódulos	no. 25	4,93	2,47	< 2,46	2,46 7,40	a	7,40 9,86	a > 9,86
MPAS	25	11,97	5,95	< 6,01	6,01 17,93	a	17,93 23,89	a >23,89
% NPA	25	8,55	3,26	< 5,29	5,29 11,81	a	11,81 15,07	a >15,07
NTPA	25	13,11	5,11	< 8,00	8,00 18,22	a	18,22 23,34	a >23,34
% N-ureídos	25	3,36	1,80	< 1,56	1,56 5,17	a	5,17 6,97	a > 6,97
NTU	25	15,56	5,66	< 9,90	9,90 21,23	a	21,23 26,89	a >26,89

¹Segundo Garcia (1989).

² Carbono (CBM) e nitrogênio (NBM) da biomassa microbiana, número (NN) e massa (MNS) de nódulos secos, massa da parte aérea seca (MPAS), % de N (%NPA), N total (NPA), % de N sob a forma de ureídos (%N-ureídos) e N total sob a forma de ureídos (NTU) na parte aérea de soja.

Tabela 4 – Carbono da biomassa microbiana (CBM, $\mu\text{g C g}^{-1}$ solo seco), respiração basal (RB, $\mu\text{g de C-CO}_2 \text{ g}^{-1}$ solo seco dia^{-1}) e quociente metabólico, [$q\text{CO}_2$, $\mu\text{g de CO}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{ C microbiano h}^{-1}$) $\times 10^4$] em solos de seis locais do Brasil. Solos coletados nos estádios V4 e R2 da cultura da soja. Médias e coeficiente de variação (CV%) de três repetições. *Ensaio 1*, soja convencional, safra 2002/2003¹.

Local		V4			R2		
		CBM	RB	$q\text{CO}_2$	CBM	RB	$q\text{CO}_2$
S.L.Gonzaga	Média	203,0	2,10	3,48	968,7	3,80	1,71
	CV	56,7	59,8	49,7	31,5	7,9	23,1
P. Fundo	Média	398,3	2,57	2,79	500,7	2,78	2,31
	CV	33,0	26,5	24,0	22,7	23,7	3,9
Cascavel	Média	642,3	2,52	1,69	209,3	1,14	2,33
	CV	31,2	10,3	18,3	13,7	15,0	28,0
P. Grossa	Média	229,7	1,05	1,92	300,3	1,26	1,75
	CV	14,6	7,2	11,2	12,8	11,1	1,7
Londrina	Média	248,3	1,04	1,76	427,3	1,97	1,94
	CV	16,7	6,4	13,2	11,7	2,6	11,2
Dourados	Média	1485,7	4,48	1,27	226,0	1,77	3,38
	CV	15,6	2,8	11,8	22,6	2,0	24,5

¹ Duas análises por repetição.

Tabela 5 – Coeficientes¹ de correlação entre os parâmetros de carbono da biomassa microbiana (CBM), respiração basal (RB) e quociente metabólico (qCO_2) avaliados em solos com soja nos estádios V4 e R2 e os parâmetros de crescimento e N acumulado em soja no estádio R2. As legendas dos parâmetros para a soja correspondem às descritas nas Tabelas 4 e 6. *Ensaio 1*, com soja convencional e três repetições, na safra 2002/2003.

	V4			R2		
	CBM	RB	qCO_2	CBM	RB	qCO_2
CBM – V4	1,00					
RB –V4	0,83	1,00				
qCO_2 –V4	-0,54	-0,03	1,00			
CBM – R2	-0,44	-0,27	0,42	1,00		
RB – R2	-0,26	0,02	0,55	0,90	1,00	
qCO_2 – R2	0,87	0,78	-0,31	-0,51	-0,21	1,00
Cél. log	0,20	0,12	-0,18	-0,42	-0,44	0,19
NN	-0,30	-0,21	0,14	0,21	0,15	-0,34
MNS	-0,54	-0,38	0,34	0,36	0,26	-0,50
MPAS	0,52	0,40	-0,39	-0,59	-0,59	0,39
NTPA	0,32	0,12	-0,50	-0,38	-0,48	0,15
NU%	0,40	0,37	-0,11	0,12	0,24	0,29
NTU	0,42	0,23	-0,48	-0,29	-0,34	0,23
ENNT	0,80	0,57	-0,54	-0,49	-0,39	0,67
ENNU	0,81	0,59	-0,53	-0,44	-0,33	0,67

¹ $r \geq 0,61$, para $p < 0,01$ e $r \geq 0,48$ para $p < 0,05$.

Tabela 6 – Número de células de *Bradyrhizobium* no solo (g^{-1} solo seco); nodulação (número de nódulos, NN, n° . pl^{-1} ; massa de nódulos secos, MNS, mg pl^{-1}), ocupação dos nódulos pelas estirpes (%), crescimento e acúmulo de N na parte aérea [massa da parte aérea seca, MPAS, g pl^{-1} ; N total acumulado na parte aérea (NTPA, mg N pl^{-1}) e percentual do N total na forma de ureídeos (NU%) e N total na forma de ureídeos (NTU, $\text{mg N-ureído pl}^{-1}$); eficiência dos nódulos considerando o N total (ENNT, mg N g^{-1} nódulo) e o N na forma de ureídeos (ENNU, $\text{mg N-ureído g}^{-1}$ nódulo) em soja no estágio R2, coletada em seis áreas produtoras. Médias e coeficientes de variação (CV %) de três repetições. *Ensaio 1*, soja convencional, safra 2002/2003.

Local		Células rizóbios $\text{n}^{\circ}(\times 10^3)$	de (log)	de Nodulação ¹		Ocupação dos nódulos ²					Parte Aérea ¹				Efic. nódulos ¹	
				NN	MNS	587	5019	5079	5080	s/reação	MPAS	NTPA	NU%	NTU	ENNT	ENNU
S.L.Gonzaga	Média	7,74	3,81	114	241	43,1	36,3	55,1	6,7	6,6	2,44	95,4	77,8	74,3	0,40	0,31
	CV	77,7	8,1	16,2	14,8	11,0	7,3	8,9	17,7	20,8	6,8	11,1	1,9	12,8	4,2	2,4
P. Fundo	Média	5,95	3,74	125	258	43,0	42,5	44,9	12,1	4,6	2,42	97,1	77,2	75,3	0,38	0,29
	CV	49,0	5,2	15,4	14,6	8,3	5,0	10,4	44,4	46,5	9,5	12,4	4,5	16,6	4,1	2,6
Cascavel	Média	37,40	4,26	126	251	36,1	29,6	49,5	19,7	7,4	3,03	124,3	75,0	93,4	0,50	0,37
	CV	130,0	15,8	10,8	12,1	18,6	15,5	1,5	15,6	54,0	2,3	4,2	5,5	9,6	9,2	4,8
P. Grossa	Média	22,24	4,26	103	209	39,3	26,9	39,9	12,0	6,4	2,57	98,6	72,1	71,1	0,47	0,34
	CV	80,6	8,0	7,9	9,6	5,7	15,4	7,4	29,1	33,3	11,8	13,2	2,6	14,3	6,5	9,0
Londrina	Média	17,09	3,96	106	192	34,8	23,1	40,6	12,9	10,2	2,56	105,3	80,3	84,6	0,44	0,55
	CV	129,9	14,6	9,4	6,6	11,0	9,7	9,4	10,9	25,5	4,4	4,9	2,4	7,2	3,4	4,2
Dourados	Média	20,56	4,14	91	133	30,9	23,1	48,4	25,4	2,6	2,85	106,6	80,9	86,3	0,82	0,66
	CV	96,7	12,1	14,4	20,4	15,8	14,3	18,6	8,9	15,4	4,2	6,5	1,7	8,9	15,1	13,5

¹ Médias de 10 plantas por repetição.

² Médias de 40 nódulos retirados de 10 plantas por repetição.

Tabela 7 – Correlação¹ entre os parâmetros utilizados para avaliação da fixação biológica do N₂ no *Ensaio 1*, com soja convencional, em seis locais produtores. A soja foi coletadas no estágio R2 e as legendas dos parâmetros correspondem às descritas na Tabela 6. *Ensaio 1*, soja convencional, safra 2002/2003.

Correlação	Cél.log	NN	MNS	MPAS	NTPA	NU%	NTU	ENNT	ENNU	587	5019	5079	5080	s/reação
Cél. log	1,00													
NN	-0,12	1,00												
MNS	-0,05	0,91	1,00											
MPAS	0,45	0,18	-0,02	1,00										
NTPA	0,29	0,50	0,27	0,88	1,00									
NU%	0,09	0,07	-0,16	0,18	0,22	1,00								
NTU	0,30	0,45	0,18	0,81	0,94	0,55	1,00							
ENNT	0,08	-0,65	-0,86	0,42	0,17	0,35	0,27	1,00						
ENNU	0,10	-0,61	-0,84	0,41	0,19	0,47	0,32	0,99	1,00					
587	-0,55	0,40	0,54	-0,53	-0,35	-0,29	-0,41	-0,61	-0,62	1,00				
5019	-0,15	0,48	0,65	-0,32	-0,26	-0,13	-0,28	-0,68	-0,66	0,50	1,00			
5079	0,01	0,00	0,04	-0,01	-0,08	0,06	-0,05	-0,03	-0,01	0,08	0,34	1,00		
5080	0,42	-0,31	-0,50	0,59	0,38	0,24	0,42	0,69	0,69	-0,62	-0,41	0,07	1,00	
s/reação	0,16	0,15	0,28	0,01	0,15	0,01	0,12	-0,30	-0,29	-0,04	-0,10	-0,31	-0,26	1,00

¹ $r \geq 0,61$, para $p < 0,01$ e $r \geq 0,48$ para $p < 0,05$.

Tabela 8 – C e N da biomassa microbiana (CBM/NBM, $\mu\text{g C ou N g}^{-1}$ solo seco) em solos de sete locais do Brasil, sob três tratamentos com soja e coletados nos estádios de pré-plantio, R2 e R8. *Ensaio 2*, safra 2003/2004¹.

Tratamento				Pré-plantio		R2		R8	
				CBM	NBM	CBM	NBM	CBM	NBM
Ponta Grossa									
Transgênico específico.	+	herb.	Média	857,7a	101,4a	626,4a	70,1a	395,4a	45,7a
			CV	14,4	26,4	5,6	6,8	18,7	10,6
Transgênico convenc.	+	herb.	Média	693,7b	83,8a	623,8a	59,0b	410,3a	43,6a
			CV	10,9	32,4	13,5	14,8	34,8	7,8
Conquista + herb. convenc.			Média	839,0a	92,2a	634,1a	73,1a	349,4a	50,8a
			CV	18,0	11,3	20,8	20,8	17,6	19,3
Londrina									
Transgênico específico	+	herb.	Média	543,3a	16,2b	390,2ab	38,7a	143,3b	14,6a
			CV	22,2	30,9	24,6	33,6	28,2	22,9
Transgênico convenc.	+	herb.	Média	453,7a	24,1a	433,5a	49,0a	341,0a	21,2a
			CV	37,0	31,2	21,3	45,3	46,6	66,2
Conquista + herb. convenc.			Média	253,7b	16,1b	305,6b	38,6a	407,6a	17,2a
			CV	52,2	11,8	45,9	33,8	26,8	36,2
Santo Antonio da Posse									
Transgênico específico	+	herb.	Média	329,6a	17,3a	305,0a	35,4a	374,4a	26,1a
			CV	9,6	24,2	22,3	19,4	19,2	26,2
Transgênico convenc.	+	herb.	Média	304,0a	15,6a	345,9a	37,3a	413,8a	24,8a
			CV	10,9	34,8	10,9	28,3	17,1	27,5
Conquista + herb. convenc.			Média	253,0b	17,6a	350,3a	35,6a	389,5a	28,4a
			CV	11,0	31,5	15,0	14,3	28,3	21,3
Sete Lagoas									
Transgênico específico	+	herb.	Média	578,9b	89,1a	146,8a	14,0a	562,6a	60,8a
			CV	16,6	27,2	4,3	18,1	7,4	16,8
Transgênico convenc.	+	herb.	Média	667,0a	97,2a	151,7a	15,1a	550,5a	54,8a
			CV	25,1	18,6	35,0	15,1	30,1	17,9
Conquista + herb. convenc.			Média	746,2a	107,6a	150,0a	12,3a	679,6a	55,5a
			CV	15,0	18,9	5,4	17,2	25,9	15,1
Planaltina									
Transgênico específico	+	herb.	Média	590,2a	65,5a	459,6a	43,3a		
			CV	7,5	20,3	7,4	20,7		
Transgênico convenc.	+	herb.	Média	549,9a	54,5a	440,3a	46,3a		
			CV	19,4	14,8	13,4	8,0		
Conquista + herb. convenc.			Média	597,4a	78,6a	441,5a	41,0a		
			CV	7,2	21,0	6,9	4,8		
Brasília									
Transgênico específico	+	herb.	Média	449,6a	34,4b	291,3a	40,5a	445,6a	26,4a
			CV	21,1	35,0	15,0	8,3	12,9	29,6
Transgênico convenc.	+	herb.	Média	442,2a	47,8a	267,4a	45,7a	384,3a	31,2a

		CV	18,6	10,9	29,8	12,1	19,0	34,3
Conquista + herb. convenc.		Média	451,9a	53,3a	322,2a	47,3a	374,3a	33,9a
		CV	32,8	20,5	37,4	29,8	23,9	32,4
<hr/>								
Santo Antonio de Goiás								
Transgênico + herb. específico		Média	335,4a	6,3a	343,9a	23,0a		
		CV	15,9	10,6	31,4	24,7		
Transgênico + herb. convenc.		Média	317,5a	9,0a	340,7a	25,2a		
		CV	6,5	34,6	33,7	18,9		
Conquista + herb. convenc.		Média	377,2a	7,3a	347,8a	19,8a		
		CV	27,0	31,3	28,9	24,6		

¹ Médias e coeficiente de variação (CV %) de quatro repetições, com duas avaliações por repetição. Valores seguidos pela mesma letra, na mesma coluna, para cada local, não diferem estatisticamente (Duncan, $p < 0,05$).

Tabela 9 – Similaridade genética final (%) obtida pela análise de agrupamento dos produtos obtidos por PCR-DGGE do DNA total do solo amplificado com "primers" para a região que codifica para o gene ribossomal 16S. Foram realizadas análises de agrupamento entre as repetições de cada tratamento e entre tratamentos em cada coleta. Os produtos de PCR foram analisados usando o programa Bionumerics com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard, com um nível de tolerância de 5%.

	<u>Entre repetições</u>		<u>Entre tratamentos</u>	
	Pré-plantio	R2	Pré-plantio	R2
Ponta Grossa				
Transgênico + herbicida específico	99,99	61,54 ¹		
Transgênico + herbicida convencional.	99,99	83,33	93,33	73,34 ²
Conquista + herbicida convencional.	99,99	81,82		
Londrina				
Transgênico + herbicida específico	99,99	99,99		
Transgênico + herbicida convencional.	99,99	99,99	99,99	99,99
Conquista + herbicida convencional.	99,99	99,99		
Santo Antonio da Posse				
Transgênico + herbicida específico	99,99	99,99		
Transgênico + herbicida convencional.	99,99	99,99	99,99	99,99
Conquista + herbicida convencional.	99,99	99,99		
Sete Lagoas				
Transgênico + herbicida específico	90,91	90,91		
Transgênico + herbicida convencional.	99,99	99,99	90,91	90,91
Conquista + herbicida convencional.	99,99	99,99		
Planaltina				
Transgênico + herbicida específico	90,01	89,89 ¹		
Transgênico + herbicida convencional.	99,99	90,01	90,91	90,01
Conquista + herbicida convencional.	99,99	89,89 ³		
Brasília				
Transgênico + herbicida específico	87,51	99,99		
Transgênico + herbicida convencional.	92,86	99,99	84,38 ³	99,99
Conquista + herbicida convencional.	99,99	99,99		
Santo Antonio de Goiás				
Transgênico + herbicida específico	99,99	99,99		
Transgênico + herbicida convencional.	99,99	99,99	99,99	99,99
Conquista + herbicida convencional.	99,99	99,99		

¹Considerado como 90%.

²Similaridade entre os tratamentos 2 e 3, 83,33% e deste agrupamento para o tratamento 1, 73,34%.

³Similaridade entre os tratamentos 2 e 3, 92,86% e deste agrupamento para o tratamento 1, 84,38%.

Tabela 10 – Nodulação (número, NN, n°. pl⁻¹ e massa de nódulos secos, MNS, mg pl⁻¹), massa da parte aérea seca (MPAS, g pl⁻¹), teor de N (%NPA), N total (NTPA, mg N pl⁻¹), teor de N-ureídeos (%NU) e N total na forma de ureídeos (NTU, mg N-ureído pl⁻¹) na parte aérea de três tratamentos com soja. Também eficiência dos nódulos considerando o N total (ENNT, mg N g⁻¹ nódulo) e o N na forma de ureídeos (ENNU, mg N-ureído g⁻¹ nódulo) em soja no estágio R2, coletada em sete áreas produtoras. *Ensaio 2*, safra 2004/2005.

Tratamento		Nodulação		Parte aérea				Eficiência dos nódulos		
		NN	MNS	MPAS	%NPA	NTPA	NU%	NTU	ENNT	ENNU
Ponta Grossa										
Transgênico+herb.trans g.	Média	136a	484a	37,8a	40,3a	1522a	86,8a	1327a	3,1a	2,7a
	CV	10,8	11,8	20,8	12,4	24,6	2,7	27,6	14,4	16,9
Transgênico+herb.conv.	Média	114a	383a	36,6a	41,4a	1514a	85,8a	1302a	4,0a	3,4a
	CV	23,8	17,5	10,4	8,3	11,2	2,6	13,7	23,3	25,2
Conquista+herb. conv	Média	97a	358a	37,2a	39,7a	1473a	85,2a	1255a	4,1a	3,5a
	CV	44,8	34,4	8,2	11,5	11,3	0,6	11,7	27,8	27,4
Londrina										
Transgênico+herb.trans g.	Média	87ab	184b	11,7a	41,0a	475b	73,5a	350a	2,6a	1,9a
	CV	42,6	27,9	13,8	13,2	6,8	3,9	10,2	41,6	45,7
Transgênico+herb.conv.	Média	109a	232a	14,4a	41,2a	586ab	74,0a	437a	2,5a	1,9a
	CV	5,8	8,7	26,9	9,4	20,4	5,8	25,7	29,0	35,1
Conquista+herb. conv	Média	63b	166b	14,6a	42,8a	624a	72,a8	456a	3,8a	2,7a
	CV	10,9	18,6	19,0	5,3	19,1	3,9	22,4	42,1	45,0
Santo Antonio da Posse										
Transgênico+herb.trans g.	Média	72a	234a	28,2a	36,1a	1007b	83,0a	838b	4,3b	3,6b
	CV	38,5	5,6	13,0	11,5	7,5	4,2	11,6	4,2	7,8
Transgênico+herb.conv.	Média	80a	200a	33,7a	36,2a	1221a	86,0a	1050a	6,1a	5,2a
	CV	24,7	25,6	8,4	8,8	12,7	0,9	13,1	42,8	42,8
Conquista+herb. conv	Média	69a	230a	29,9a	36,6a	1090b	85,5a	933b	4,7b	4,0b
	CV	40,1	10,4	15,7	12,3	16,6	0,7	17,1	9,4	9,4

Sete Lagoas										
Transgênico+herb.trans g.	Média	107a	223b	11,1b	36,4a	406a	73,8a	301a	1,8a	1,3a
	CV	42,3	31,8	7,7	12,9	20,1	4,0	23,8	38,4	41,1
Transgênico+herb.conv.	Média	126a	244a	11,9b	35,2a	420a	77,2a	323a	1,7a	1,3a
	CV	30,2	46,1	9,7	5,5	13,2	8,1	9,3	55,2	61,1
Conquista+herb. conv	Média	141a	322a	13,2a	35,6a	472a	72,8a	343a	1,5a	1,1a
	CV	23,5	13,5	7,2	8,8	14,9	3,9	15,2	6,6	4,7
Planaltina										
Transgênico+herb.trans g.	Média	87a	324a	18,0b	37,9a	682b	86,0a	590b	2,1a	1,8a
	CV	21,1	22,5	16,1	8,1	15,8	5,8	21,4	17,3	19,8
Transgênico+herb.conv.	Média	99a	352a	22,3a	37,9a	846a	88,2a	749a	2,4a	2,1a
	CV	25,8	28,2	12,6	2,6	14,0	3,7	17,7	42,3	45,9
Conquista+herb. conv	Média	90a	379a	19,3b	35,0a	672b	84,8a	572b	0,18a	1,5a
	CV	28,4	25,2	15,1	3,8	15,8	2,9	18,4	30,1	31,1
Brasília										
Transgênico+herb.trans g.	Média	0,4a	5a	17,7a	37,8a	671a				
	CV	126,7	129,2	12,1	12,9	20,0				
Transgênico+herb.conv.	Média	0,3a	3a	20,9a	37,0a	773a				
	CV	75,0	87,1	20,6	7,9	21,2				
Conquista+herb. conv	Média	1,0a	6a	14,7a	36,2a	535a				
	CV	128,2	109,1	12,4	7,8	16,9				
Santo Antonio de Goiás										
Transgênico+herb.trans g.	Média	26a	108b	17,6ab	37,6a	661ab	81,8a	541ab	6,1ab	5,0ab
	CV	42,7	41,0	7,2	6,1	9,6	1,5	10,9	46,4	44,9
Transgênico+herb.conv.	Média	20a	94b	19,5a	39,2a	761a	84,2a	644a	8,1a	6,8a
	CV	39,8	42,2	18,2	7,0	16,7	3,9	20,5	38,6	37,7
Conquista+herb. conv	Média	22a	132a	15,1b	39,7a	596b	82,0a	490b	4,5b	3,7b
	CV	26,9	7,7	18,3	6,2	11,9	2,8	14,6	9,7	11,6

¹ Médias e coeficiente de variação (CV %) considerando quatro repetições, com a avaliação de dez plantas por repetição. Valores seguidos pela mesma letra, na mesma coluna, para cada local, não diferem estatisticamente (Duncan, $p < 0,05$).

Tabela 11 – Correlações entre os parâmetros de carbono e N da biomassa microbiana (CBM e NBM), massa de nódulos (MNS) e da parte aérea (MPAS) secos e N total acumulado na parte aérea (NTPA) avaliados em R2. *Ensaio 2*, safra 2004/2005.

	CBM	NBM	MNS	MPAS	NTPA
Ponta Grossa					
CBM	1				
BMN	0,45	1			
MNS	0,02	-0,11	1		
MPAS	0,19	-0,04	0,25	1	
NTPA	0,32	-0,19	0,41	0,78	1
Londrina					
BMN	0,13	1			
MNS	0,26	-0,07	1		
MPAS	-0,54	0,12	-0,31	1	
NTPA	-0,49	0,38	-0,36	0,89	1
Santo Antônio da Posse					
BMN	0,11	1			
MNS	0,39	-0,55	1		
MPAS	0,22	0,15	0,27	1	
NTPA	0,15	0,27	-0,08	0,76	1
Sete Lagoas					
BMN	-0,42	1			
MNS	0,10	-0,04	1		
MPAS	0,39	-0,45	0,44	1	
NTPA	0,22	-0,46	0,26	0,85	1
Planaltina					
BMN	0,02	1			
MNS	-0,03	0,38	1		
MPAS	-0,05	0,16	-0,12	1	
NTPA	-0,13	0,26	-0,14	0,95	1
Brasília					
BMN	0,50	1			
MNS	0,11	0,13	1		
MPAS	0,13	0,15	-0,16	1	
NTPA	-0,13	-0,21	-0,28	0,90	1
Santo Antônio de Goiás					
BMN	-0,10	1			
MNS	-0,06	0,16	1		
MPAS	-0,24	0,13	-0,39	1	
NTPA	-0,30	0,13	-0,27	0,94	1

¹ $r \geq 0,79$, para $p < 0,01$ e $r \geq 0,65$ para $p < 0,05$.

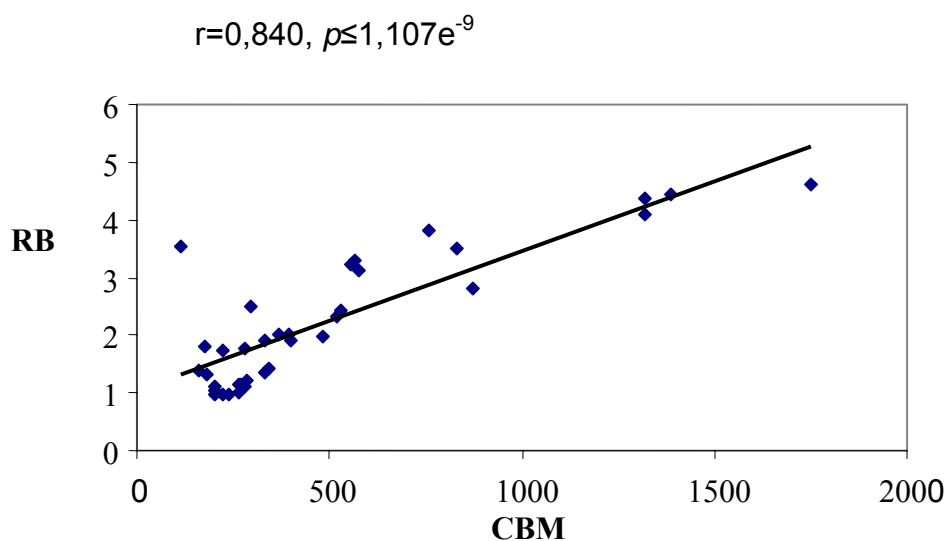


Figura 1 – Correlação entre o carbono da biomassa microbiana (CBM, $\mu\text{g C g}^{-1}$ solo seco) e a respiração basal (RB, $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1}$ solo dia^{-1}) em seis locais cultivados com soja (*Ensaio 1*). Os solos foram coletados nos estádios V4 e R2 do crescimento da soja.

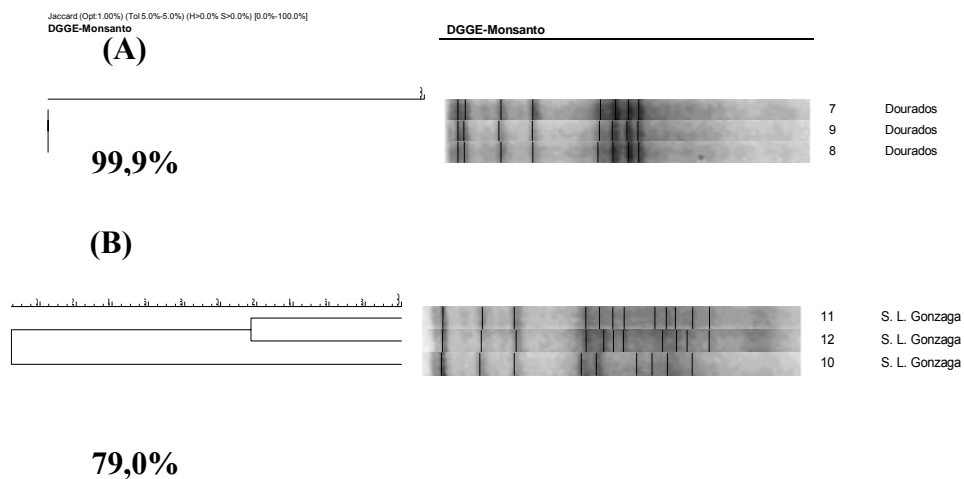
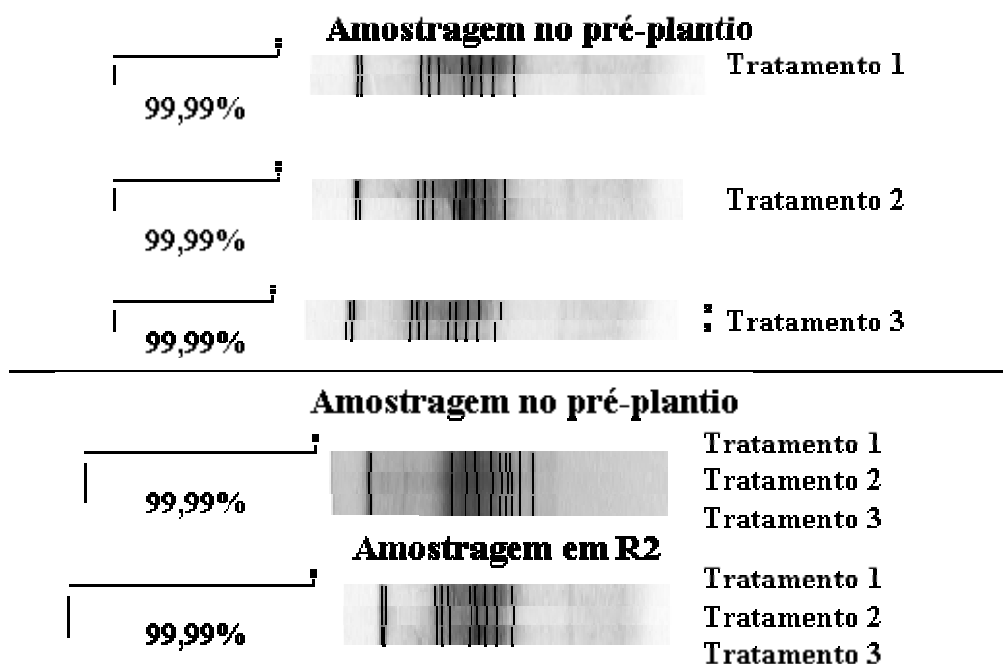


Figura 2 – Análise de agrupamento dos perfis de DNA total do solo após a amplificação com “primers” para a região do gene ribossomal 16S e eletroforese por DGGE. Perfis obtidos em cada uma das três repetições do *Ensaio 1*, em Dourados (A) e São Luiz Gonzaga (B), utilizando o programa Bionumerics, com o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e um índice de tolerância de 5%.

Santo Antonio da Posse



Brasília

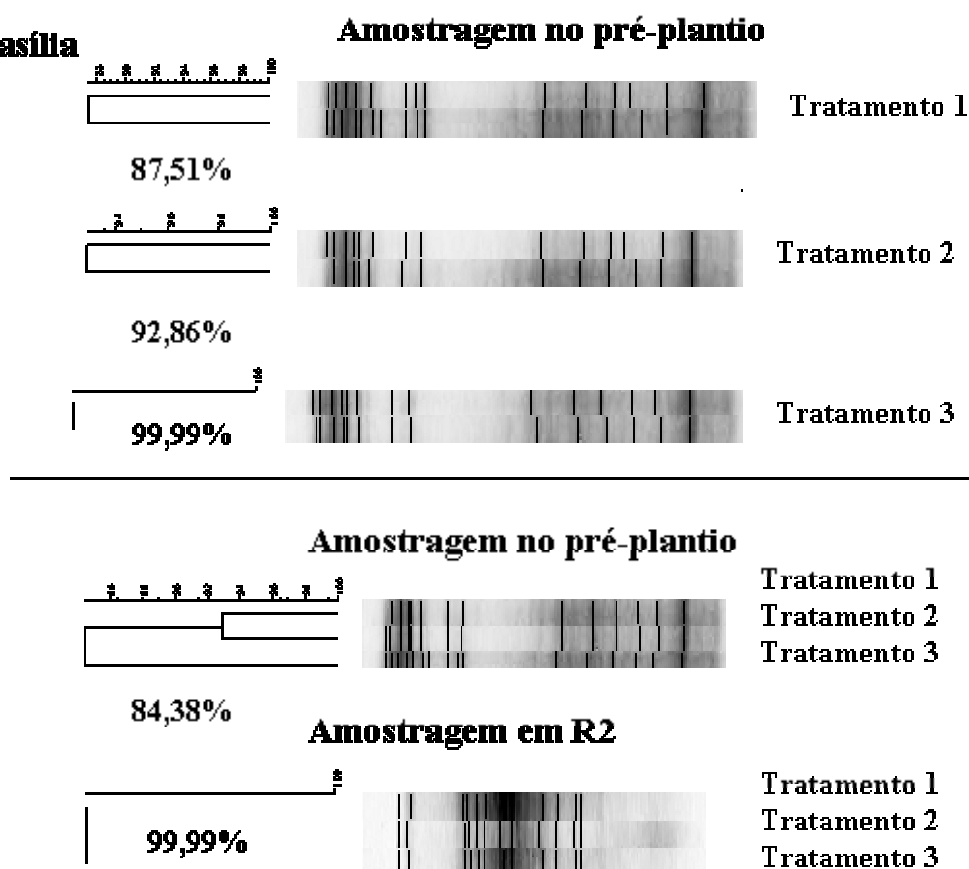


Figura 3 – Similaridade genética (%) entre os perfis de DNA total do solo obtidos em cada uma das sete áreas do *Ensaio 2*, nas coletas realizadas no pré-plantio e em R2. Perfis obtidos após a amplificação com “primers” para a região do gene ribossomal 16S e eletroforese por DGGE. Os produtos foram analisados utilizando o programa Bionumerics, com o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e um índice de tolerância de 5%.

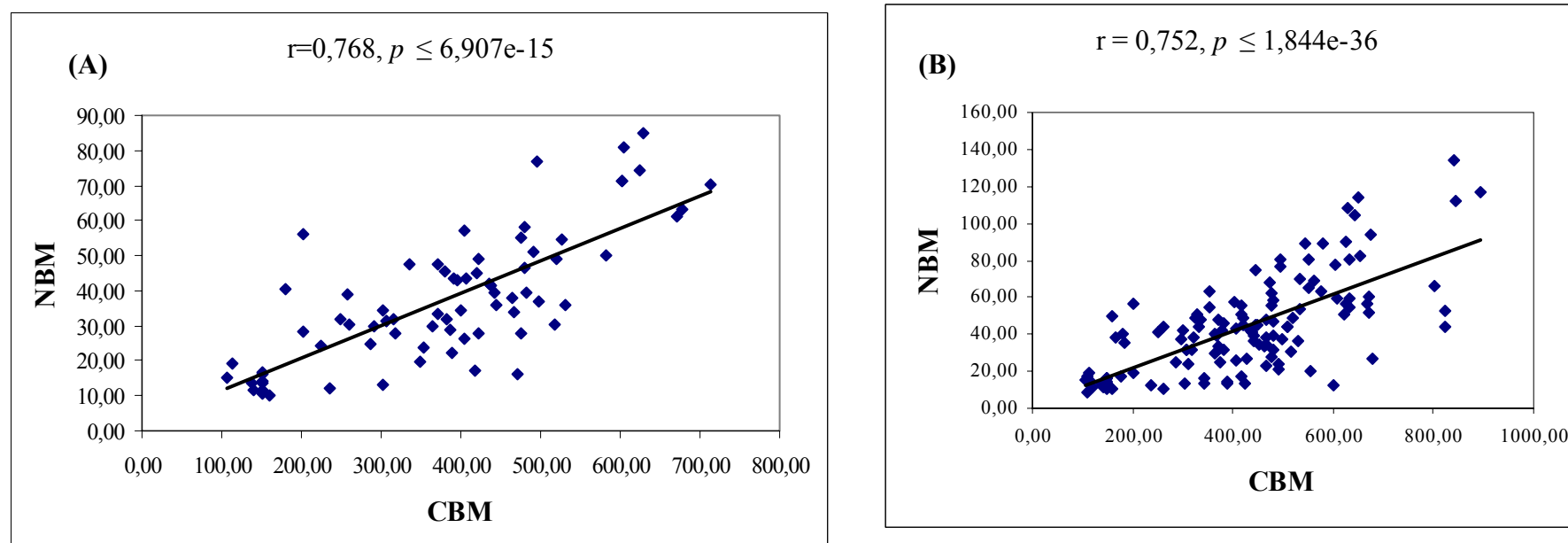


Figura 4 – Correlações entre o carbono (CBM) e o nitrogênio (NBM) da biomassa microbiana do solo ($\mu\text{g C ou N g}^{-1}$ de solo seco) em sete locais amostrados (*Ensaio 2*): (A) Dados obtidos nos sete locais na coleta realizada em R2; (B) Dados obtidos em sete locais nas coletas no pré-plantio e em R2 e em cinco locais em R8.

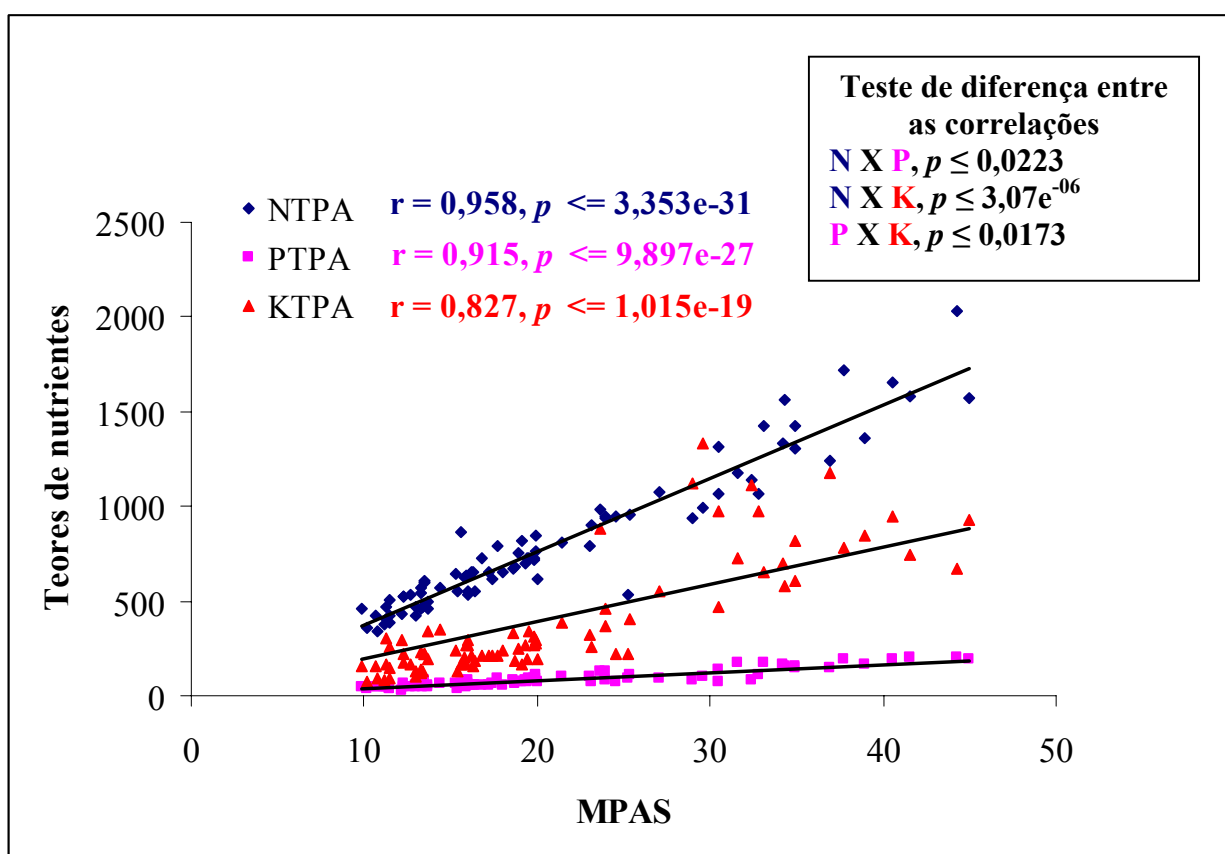


Figura 5 – Correlações entre a massa da parte aérea seca (MPAS, $g\ pl^{-1}$) e o N total, P total e K total acumulados na parte aérea (NTPA, PTPA, KTPA, $mg\ planta^{-1}$) de soja cultivada em sete locais (*Ensaio 2*), inoculada com *Bradyrhizobium* e sem receber fertilizante nitrogenado. Plantas coletadas no estágio R2.

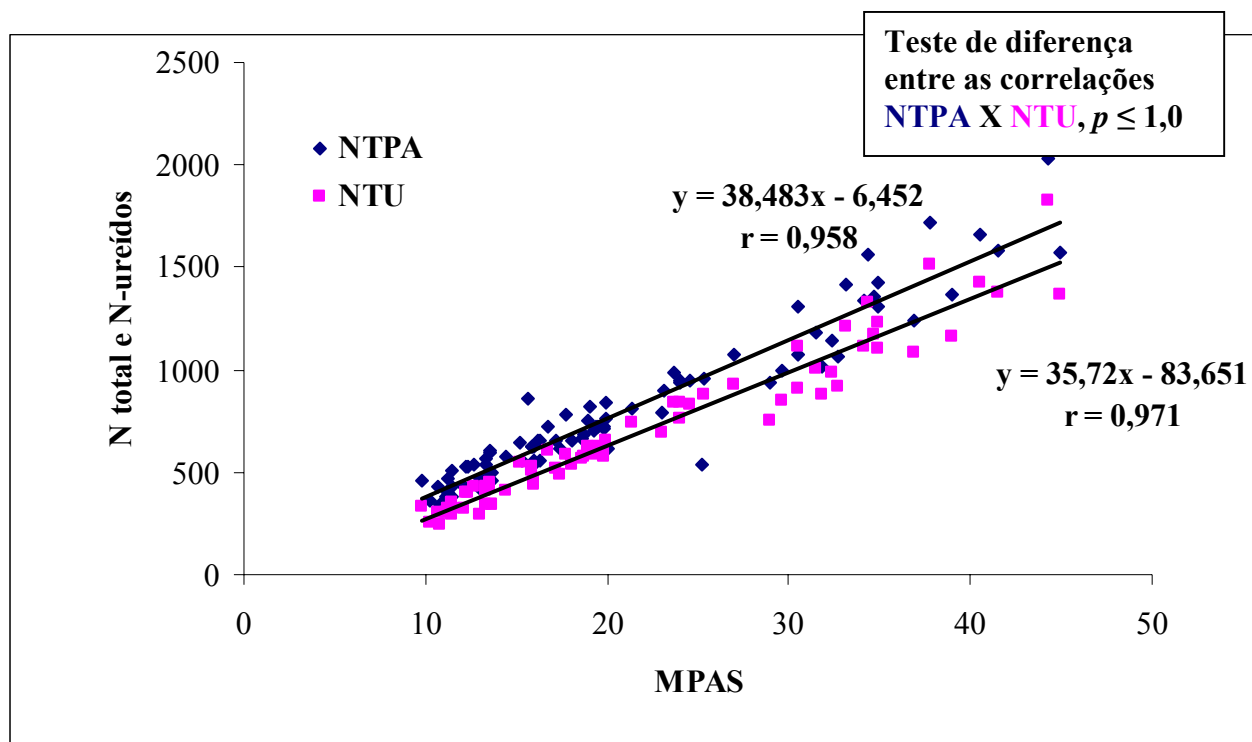


Figura 6 – Correlações entre a massa da parte aérea seca (MPAS, g plant^{-1}) e o N total (NTPA) e N na forma de ureídos (NTPA, NTU, mg planta^{-1}) de soja cultivada em sete locais (*Ensaio 2*), inoculada com *Bradyrhizobium* e sem receber fertilizante nitrogenado. Os valores de NTU não foram estimados para Brasília, pela falta de nodulação. Plantas coletadas no estágio R2.

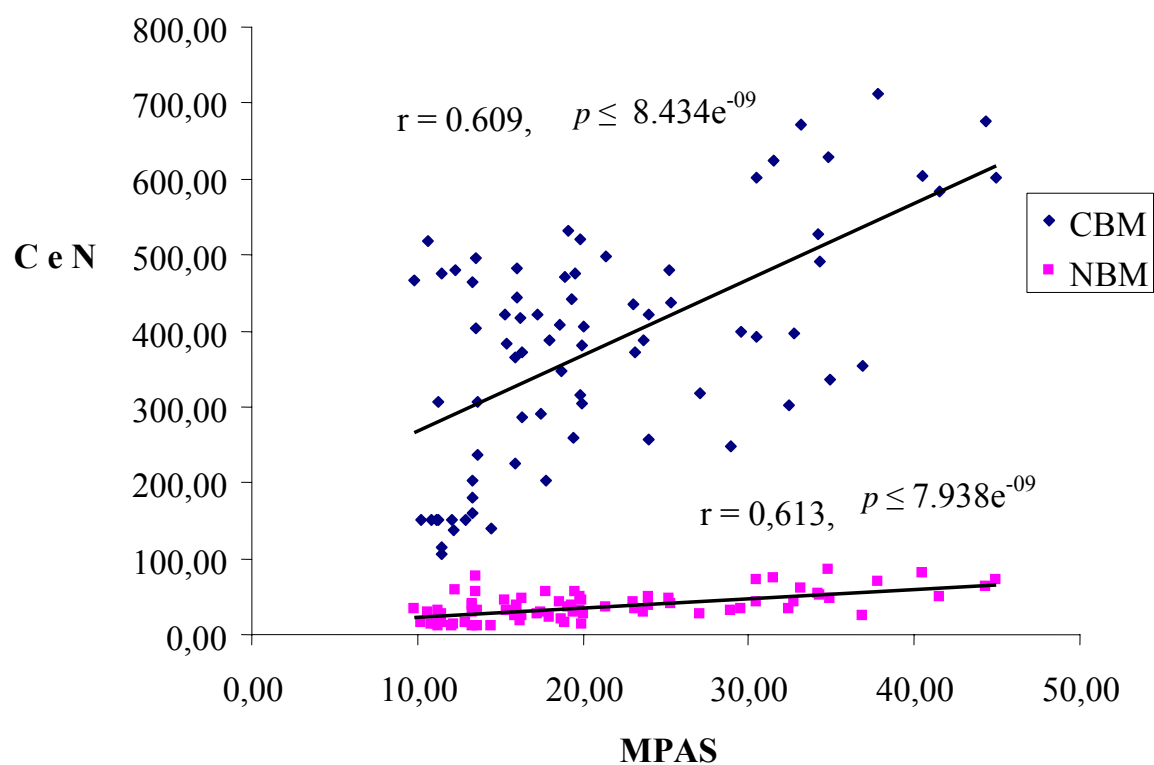


Figura 7 – Correlação entre o C e o N da biomassa microbiana (BM) ($\mu\text{g C e N g}^{-1}$ de solo seco) e a massa da parte aérea seca (MPAS, g planta^{-1}) de soja cultivada em sete locais (*Ensaio 2*). Avaliações realizadas no estágio R2.