



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ROSINEI APARECIDA DE SOUZA

**IMPACTO DA SOJA TRANSGÊNICA A IMIDAZOLINONAS E
DO MANEJO COM HERBICIDAS NA COMUNIDADE
MICROBIANA DO SOLO**

Londrina
2012

ROSINEI APARECIDA DE SOUZA

**IMPACTO DA SOJA TRANSGÊNICA A IMIDAZOLINONAS E
DO MANEJO COM HERBICIDAS NA COMUNIDADE
MICROBIANA DO SOLO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Guimarães

Co-orientador(a): Dr^a Mariangela Hungria

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S729i Souza, Rosinei Aparecida de.
Impacto da soja transgênica a imidazolinonas e do manejo com herbicidas na comunidade microbiana do solo / Rosinei Aparecida de Souza. – Londrina, 2012.
79 f.: il.

Orientador: Maria de Fátima Guimarães
Co-orientador: Mariangela Hungria.
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Microorganismos do solo - 2. Biomassa - 3. Plantas transgênicas – Teses - Impacto ambiental - 4. Soja – 5. Herbicidas – I. Guimarães, Maria de Fátima. II. Hungria, Mariangela. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 631.46

ROSINEI APARECIDA DE SOUZA

**IMPACTO DA SOJA TRANSGÊNICA A IMIDAZOLINONAS E DO
MANEJO COM HERBICIDAS NA COMUNIDADE MICROBIANA DO
SOLO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, da Universidade
Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Osmar Brito
UEL – Londrina – PR

Dr. Marco Antonio Nogueira
Embrapa Soja – Londrina – PR

Dra. Iêda de Carvalho Mendes
Embrapa Cerrados – Londrina – PR

Dra. Diva de Souza Andrade
IAPAR – Londrina – PR

Prof. Dr. Ricardo Ralisch (suplente)
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Débora Cristina Santiago (suplente)
UEL – Londrina – PR

Orientadora. Profa. Dra. Maria de Fátima
Guimarães
UEL – Londrina - PR

Co-orientadora. Dra. Mariangela Hungria
Embrapa Soja – Londrina - PR

Londrina, 13 de fevereiro de 2012.

A DEUS

OFEREÇO

O Mundo é feito de diversos tipos de mulheres...

Mulheres que curam com a força do seu amor...

Mulheres que aliviam dores com a sua
compaixão...

Mulheres que cantam o que a gente sente...

Mulheres que escrevem o que a gente sente...

Mulheres glamourosas...

Mulheres maravilhosas...

Mulheres que fazem a gente rir...

Mulheres batalhadoras...

Mulheres Talentosas...

O Mundo também é feito por outro tipo de

Mulheres, nem tão conhecidas ou famosas...

Mulheres que deixam para trás o que têm,

Para viver para a CIÊNCIA...

Mulheres que, todos os dias, se encontram diante

De um novo começo...

Mulheres que sofrem diante das injustiças...

Mulheres que sofrem diante de perdas

Inexplicáveis...

Mães...

Mulheres que devem se submeter a regras...

Mulheres que se perguntam qual

Será o seu destino...

Mulheres em cuja face estão escritos

Todos os dias de sua vida.

O Mundo é feito de

TODAS mulheres especiais...

Todas mulheres tão bonitas quanto
Qualquer Estrela,
Porque lutam todos os dias para fazer do
Mundo um lugar melhor pra se viver.
Parabéns... para as Mulheres da MINHA VIDA, às quais
DEDICO esta TESE de DOUTORADO

Minhas Orientadoras Maria de Fátima e Mariangela Hungria
Minha mãe Maria Aparecida e minha irmã Edinéia Cristina

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS meu criador pela força e sabedoria e por ter me dado condições de concluir mais uma etapa muito importante na minha vida.

À minha orientadora Dr^a Maria de Fátima Guimarães pela orientação, credibilidade, confiança, incentivo, convite para as confraternizações, 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.

A todos os funcionários e estagiários do laboratório de biotecnologia de solos da Embrapa Soja que me ajudaram na realização desse trabalho.

À EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja pela concessão do laboratório para a realização dos experimentos.

À Universidade Estadual de Londrina. Sem o trabalho dela, eu, como Doutora em Agronomia, simplesmente não existiria.

Aos professores do programa de pós-graduação em agronomia.

A todos os funcionários do centro de ciências agrárias, por estarem sempre prontos a nos ajudar.

A todos os membros da banca por aceitarem o convite.

À mulher mais importante da minha vida que me ajudou a descobrir a vida, companheira de caminhada, poetiza que sonha, profetiza e constrói, que acima de tudo, ama, minha amada mãe, Maria Aparecida. TE AMO!

Aos meus irmãos que tanto amo Edinéia Cristina e José Donisete pelo incentivo para levar adiante a concretização desta tarefa, que com certeza vocês estiveram ao meu lado a cada momento. Amo vocês! Muito obrigada meus amados irmãos, por todos os conselhos dados nos momentos de aflição e ansiedade. Vocês são exemplos de dignidade, bondade e caráter. Sei minha irmã que você se orgulha por eu ter atingido uma etapa que nenhum outro de nós tinha

atingido antes. E você meu irmão pela formação que me permitiu ter, com os sacrifícios que só você sabe quais foram.

Aos meus lindos e amados sobrinhos, Gustavo e Leonardo, por todas as horas de alegria e descontração e por me fazerem sorrir em momentos de angústia. Vocês são a razão da minha vida.

Ao meu grande amor Hamilton, por sempre estar ao meu lado, pelo companheirismo, dedicação, amizade, força, carinho e além de todo apoio e incentivo para a conclusão de mais esta etapa de nossas vidas que vamos construindo juntos. Obrigada por você existir e fazer parte da minha vida.

Aos meus queridos cunhados Sandra e Rodrigo e meu primo João por tudo que fizeram por mim e por estarem sempre me apoiando. Muito Obrigada! Até a data da defesa de minha tese o João “meu segundo pai” estava entre nós, hoje quando estou entregando a versão final infelizmente ele se foi, sentirei muita sua falta e muitas saudades, somente tenho a dizer que eu o amo muito e que o SENHOR NOSSO DEUS o receba de braços abertos.

Aos meus amados amigos de trabalho Patrícia Santoro, Cinthia, Íris, Ronaldo e em especial a Priscila e o Osvaldo que me deram apoio concreto em momentos difíceis. Minha eterna gratidão! Vocês moram em meu coração.

À minha grande amiga Mariana pela imensa colaboração e ajuda ao longo do curso e por sempre estar ao meu lado em momentos difíceis. Muito Obrigada! À querida amiga Luciana pela amizade e companhia de todas as horas, presença carinhosa nos momentos de ansiedade e incerteza.

À minha querida amiga Adriana pela amizade, carinho e incentivo.

Ao Dr. Marcos Antonio Pavan por ter me liberado do meu trabalho para terminar os créditos do doutorado.

À minha companheira de apartamento que se foi tão jovem, Selma dos Santos Pereira, pelas nossas longas conversas, descanse em paz amiga!

Sinto um sentimento de alívio como muito tempo não sentia a concretização de uma grande tarefa.

***“Confie no Senhor de todo o coração e não se apóie na sua própria inteligência.
Lembre de Deus em tudo o que fizer, e ele lhe mostrará o caminho certo” Provérbios 3:5-6***

***“Feliz o homem que encontrou a sabedoria e alcançou o entendimento,
porque a sabedoria vale mais do que a prata,
e dá mais lucro que o ouro.
Deus alicerçou a terra com sabedoria e firmou o céu com entendimento.
Provérbios” 3:13-19***

SOUZA, Rosinei Aparecida. **Impacto da soja transgênica a imidazolinonas e do manejo com herbicidas na comunidade microbiana do solo.** 2012. 79 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

O Brasil cultivou 25,4 milhões de hectares com culturas geneticamente modificadas (GM) em 2010, dos quais 17,8 milhões foram ocupados com soja resistente a herbicidas. Hoje o país já ocupa a posição de segundo maior produtor mundial de soja geneticamente modificada. Em um dos eventos de obtenção de soja transgênica, a engenharia genética desenvolveu plantas pela introdução do gene *ahas* de *Arabidopsis thaliana*, que confere tolerância aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas. O gene *ahas* codifica a proteína AHAS (aceto-hidroxiácido sintase), que é encontrada naturalmente em todas as plantas e que catalisa a primeira etapa da biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada. Nas plantas convencionais, a inibição da enzima AHAS pelos herbicidas à base de imidazolinona provoca uma deficiência de aminoácidos de cadeia ramificada e de outros compostos derivados dessa via, necessários a sua sobrevivência. Alguns trabalhos têm abordado os impactos ambientais de culturas transgênicas e do uso de herbicidas, contudo, poucos estudos referentes aos efeitos dessas culturas e dos herbicidas na biomassa microbiana do solo foram realizados. O objetivo desta tese foi o de avaliar o impacto da soja geneticamente modificada contendo o gene *ahas* e do herbicida Imazapyr do grupo das imidazolinonas na microbiota do solo. Ao todo foram avaliados vinte ensaios, conduzidos em três safras e nove municípios localizados em seis estados e no DF com soja convencional (cultivar Conquista) e transgênica (Soja Cultivance, evento 127). Os parâmetros avaliados foram, quantitativamente, o carbono e o nitrogênio da biomassa microbiana, pelo método de fumigação-extração) e a análise qualitativa da diversidade genética da comunidade bacteriana pelo método do DGGE (“Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”). As amostras foram coletadas na camada de 0-10 cm no pré-plantio e no estágio R2 do desenvolvimento da cultura. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com cinco tratamentos (T1: soja Cultivance - evento 127 (soja GM), com controle de plantas invasoras efetuado exclusivamente com herbicida imidazolinona; T2: soja Cultivance, evento 127 (soja GM), com controle de plantas invasoras efetuado com herbicidas convencionais; T3: cultivar parental da qual o evento 127 originou (Conquista) (soja convencional), com controle de plantas invasoras efetuado com herbicidas convencionais; T4: cultivar M-SOY 8001 (soja convencional da Monsoy), utilizada como padrão convencional, com controle de plantas invasoras efetuado com herbicidas convencionais; T5: variedade CD 217 (soja convencional da Coodetec), utilizada como padrão convencional, com controle de plantas invasoras efetuado com herbicidas convencionais), com quatro repetições. O herbicida imidazolinona utilizado foi o Imazapyr na dose de 70 g i.a ha⁻¹ e o convencional consistiu da mistura Bentazon + Acifluorfen-sódio, na dosagem recomendada para cada região. Em todos os ensaios avaliados não foram encontradas diferenças na biomassa microbiana do solo entre os tratamentos que pudessem ser atribuídas aos herbicidas, ou à transgenia. Também não houve efeito da transgenia, ou entre os diferentes herbicidas, na avaliação qualitativa da comunidade bacteriana do solo realizada pelo método do DGGE. Diferenças quantitativas e qualitativas foram atribuídas exclusivamente a diferenças entre locais, a estágios de desenvolvimento das plantas, a diferenças entre cultivares e a condições climáticas.

Palavras-chave: Biomassa microbiana do solo. DGGE. Gene *ahas*. Herbicidas. Soja transgênica.

SOUZA, Rosinei Aparecida. **Impact of transgenic soybean and management with imidazolinona herbicides on soil microbial community.** 2012. 79 p. Tese (Doctor in Agronomy) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

Brazil had 25.4 million hectares cropped with genetically modified (GM) plants In 2010 from which 17.8 million were occupied with soybean tolerant to herbicides. Nowadays the country is the second largest GM soybeans producer. In one event of genetic engineering GM soybean, a cultivar was developed with the introduction of the gene *ahas*, from *Arabidopsis thaliana*, which confers resistant to herbicides of the imidazolinone chemical group. The *ahas* gene encodes the AHAS protein (aceto-hydroxyacid synthase), which is found naturally in all plants and catalyzes the first step in the biosynthesis of branched chain amino acids. In conventional plants, the inhibition of the enzyme AHAS by herbicides of the group imidazolinone results in a deficiency of the branched chain amino acids and other compounds derived from this pathway necessary for their survival. Some studies have been performed about the environmental impacts of transgenic crops and their specific herbicides; however few studies about the effects of the transgeny and of specific herbicides on soil microbial biomass are available. The objective of this thesis was to evaluate the impact of GM soybean with the gene *ahas* and of the herbicide Imazapyr of the imidazolinone group on the soil microorganisms. A total of twenty field trials were performed for three crop seasons with the parental conventional (Conquista) and the transgenic (Cultivance) soybean cultivars, in nine cities located in six states and at the Federal District. The parameters evaluated were, quantitatively, the microbial biomass of carbon and nitrogen, determined by the soil fumigation-extraction method, and qualitatively the bacterial community by the method of DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Samples were collected at 0-10 cm layer at the pre-planting and the R2 stages of development of culture. The experimental was performed in a completely randomized block design, with five treatments (T1: Cultivance soybean - event 127 (GM soybean), with weed control carried out exclusively with imidazolinone herbicide; T2: soybean Cultivance, event 127 (GM soybean), with weed control carried out with conventional herbicides; T3: parental cultivar from which the event originated 127 (Conquest) (conventional soybeans), with weed control carried out with conventional herbicides; T4: cultivar M-SOY 8001 (Monsoy conventional soybeans), used as a conventional pattern, with weed control carried out with conventional herbicides; T5: CD 217 variety (conventional Coodetec soybean), used as conventional pattern, with weed control carried out with conventional herbicides), and four replications. The imidazolinone herbicide Imazapyr was used at a dose of 70 g i.a ha⁻¹ and the conventional herbicide consisted of a mixture of Bentazon + Acifluorfen-sodium with the recommended dosage for each region. In all trials, no differences in soil microbial biomass were detected that could be attributed to the transgeny, or the herbicides. Also, no effects of the transgeny or of the herbicides could be detected in the qualitative evaluation of bacterial community evaluated by DGGE. Quantitative and qualitative differences were attributed exclusively to the different locations, stage of plant development, genetic differences between cultivars, and climatic conditions.

Keywords: *Ahas* gene. DGGE. Herbicides. Soil microbial biomass. Transgenic soybean.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Locais de condução, safras, localização geográfica e classes de solo dos experimentos	41
Tabela 2 – Tratamentos utilizados nos ensaios	43
Tabela 3 – Biomassa microbiana de carbono (BMC) e nitrogênio (BMN) ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo seco) no estágio de pré-plantio, nos ensaios conduzidos na safra de verão de 2006/2007	47
Tabela 4 – Biomassa microbiana de carbono (BMC) e nitrogênio (BMN) ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo seco) no estágio R2, nos ensaios conduzidos na safra de verão de 2006/2007	48
Tabela 5 – Biomassa microbiana de carbono (BMC) e nitrogênio (BMN) ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo seco) no estágio de pré-plantio, nos ensaios conduzidos na safrinha de 2007.....	49
Tabela 6 – Biomassa microbiana de carbono (BMC) e nitrogênio (BMN) ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo seco) no estágio R2, nos ensaios conduzidos na safrinha de 2007.....	50
Tabela 7 – Biomassa microbiana de carbono (BMC) e nitrogênio (BMN) ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo seco) no estágio de pré-plantio, nos ensaios conduzidos na safra de verão de 2007/2008	51
Tabela 8 – Biomassa microbiana de carbono (BMC) e nitrogênio (BMN) ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo seco) no estágio R2, nos ensaios conduzidos na safra de verão de 2007/2008	51
Tabela 9 – Porcentagem de similaridade genética final obtida pela análise de agrupamento dos produtos obtidos por DGGE do DNA do domínio Bactéria do solo. Os valores são referentes às análises de agrupamento entre tratamentos em cada coleta e em cada local, no ensaio conduzido na safra 2006/2007	53
Tabela 10 – Porcentagem de similaridade genética final obtida pela análise de agrupamento dos produtos obtidos por DGGE do DNA do domínio Bactéria do solo. Os valores são referentes às análises de agrupamento entre tratamentos em cada coleta e em cada local, no ensaio conduzido na safrinha de 2007.....	55

Tabela 11 – Porcentagem de similaridade genética final obtida pela análise de agrupamento dos produtos obtidos por DGGE do DNA do domínio Bactéria do solo. Os valores são referentes às análises de agrupamento entre tratamentos em cada coleta e em cada local, no ensaio conduzido na safra de 2007/200857

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mapa indicando os nove locais onde foram conduzidos os ensaios com a cultura da soja transgênica resistente ao herbicida Imazapyr do grupo das imidazolinonas no Brasil nas safras de 2006/2007, safrinha 2007 e 2007/2008 em duas épocas (PP-pré-plantio e R2-Florescimento)42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVO GERAL	19
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 A CULTURA DA SOJA	20
3.2 MICROBIOTA DO SOLO	21
3.3 DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO	26
3.4 ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS.....	28
3.4.1 Efeito da Aplicação de Agrotóxicos sobre a Comunidade Microbiana do Solo	28
3.4.2 Efeito de Plantas Geneticamente Modificadas sobre a Microbiota do Solo	33
4 ARTIGO: EFEITO DA TRANSGENIA COM O GENE <i>ahas</i> E DE HERBICIDAS ASSOCIADOS À CULTURA DA SOJA NA POPULAÇÃO MICROBIANA DO SOLO	37
4.1 INTRODUÇÃO	38
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.2.1 Local e Condução do Experimento	40
4.2.2 Amostragem do Solo.....	43
4.2.3 Avaliação Quantitativa da Biomassa Microbiana do Solo.....	44
4.2.3.1 Biomassa microbiana de carbono (BMC)	44
4.2.3.2 Biomassa microbiana de nitrogênio (BMN).....	44
4.2.4 Avaliação Qualitativa da Microbiota do Solo	45
4.2.4.1 Extração do DNA total do solo.....	45
4.2.4.2 Amplificação da região <i>16S rRNA</i> e eletroforese pela técnica do DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)	45
4.2.5 Análise Estatística	46
4.3 RESULTADOS	46

4.3.1 Avaliação Quantitativa da Biomassa Microbiana de Carbono (BMC) e de Nitrogênio (BMN).....	46
4.3.1.1 Resultados dos experimentos conduzidos em sete locais na safra 2006/2007	46
4.3.1.2 Resultados dos experimentos conduzidos em seis locais na safra 2007-safrinha	49
4.3.1.3 Resultados dos experimentos conduzidos em sete locais na safra 2007/2008	50
4.3.2 Avaliação Qualitativa da Microbiota do Solo	52
4.4 DISCUSSÃO	58
4.4.1 Efeito dos Herbicidas na Microbiota do Solo	58
4.4.2 Efeito da Transgenia na Microbiota do Solo.....	61
4.4.3 Avaliação Qualitativa da Microbiota do Solo pelo Método do DGGE	63
4.5 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66
CONSIDERAÇÕES FINAIS	79

1 INTRODUÇÃO

As primeiras plantas transgênicas foram desenvolvidas na década de 1980, quando um gene codificante para a resistência contra o antibiótico canamicina foi introduzido em plantas de fumo. Desde então, várias pesquisas foram desenvolvidas visando utilizar a biotecnologia para melhorar o abastecimento alimentar no mundo. Após longos períodos de descobertas, pesquisas, testes e revisão regulatória mundial, as sementes de diversas culturas, tolerantes a herbicidas e insetos, foram disponibilizadas aos produtores, tendo como marco inicial o ano de 1996. Desde então, genes de bactérias ou vírus têm sido inseridos em diversas plantas que passam a expressar novas características (LACERDA, 2006).

Há genes inseridos em plantas que codificam proteínas capazes de inativar a ação dos herbicidas. Desse modo, culturas contendo esses genes podem se tornar resistentes ao herbicida, facilitando o controle de plantas daninhas (LACERDA, 2006). Plantas daninhas constituem um dos principais fatores limitantes à produção agrícola da cultura da soja. Dependendo das espécies daninhas prevalentes, herbicidas como a trifluralina, o metribuzin e outros são aplicados. Como exemplo, a soja RR (*Roundup Ready*), obtida pela Monsanto via transformação gênica, foi desenvolvida para ser tolerante ao herbicida glifosato (BORÉM, 2005), enquanto que a soja contendo o gene *ahas* obtida pela BASF foi desenvolvida para ser tolerante ao herbicida Imazapyr do grupo das imidazolinonas.

Em 2010, o Brasil cultivou 25,4 milhões de há e ultrapassou a Argentina (22,9 milhões de hectares), ficando atrás apenas dos E.U.A. (66,8 milhões) no cultivo de culturas geneticamente modificadas (GM), sendo responsável por 16% dos 148 milhões de ha de transgênicos cultivados no mundo naquele ano. Dos 25,4 milhões de ha de culturas GM (geneticamente modificadas) cultivadas no Brasil, 17,8 foram ocupados com soja tolerante a herbicida, ultrapassando os 16,2 milhões de ha cultivados em 2009 (JAMES, 2010).

Com o cultivo de culturas GM no período de 1996 a 2008, a redução do uso de defensivos agrícolas foi avaliada em 268 milhões de kg de ingredientes ativos (i.a.), uma economia de 6,9%. Somente em 2008, a redução da emissão de CO₂ na atmosfera com as culturas GM foi estimada em 14,4 bilhões de kg de CO₂.

Estimam-se, ainda, ganhos econômicos da ordem de US\$ 5,9 bilhões, gerados em razão dos menores custos de produção (BROOKES e BARFOOT, 2010).

Uma das questões que ainda permanece pendente quanto aos OGMs (organismos geneticamente modificados) refere-se aos impactos e riscos da liberação em larga escala de plantas transgênicas ao meio ambiente. Os genes, quando liberados no ambiente, podem interagir com a microbiota do solo, podendo causar efeitos indesejáveis. As comunidades microbianas são bastante complexas e sensíveis a alterações ambientais. A biomassa microbiana é responsável pela decomposição e mineralização dos resíduos vegetais e animais no solo, sendo considerada como um reservatório de nutrientes e de energia potencialmente disponível para as plantas (JENKINSON; LADD, 1981), sendo então fundamental para a qualidade do solo. Algumas pesquisas têm avaliado 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; KOWALCHUK; van VEEN, 2003).

O presente estudo foi conduzido com o intuito de avaliar o efeito da soja transgênica contendo o gene *ahas* de resistência a herbicidas do grupo químico das imidazolinonas na microbiota do solo. Para isso, foi comparado o efeito da cultivar transgênica Cultivance (evento 127) resistente a herbicida do grupo das imidazolinonas com a parental não transgênica (cultivar Conquista), sobre a microbiota do solo. As avaliações foram realizadas em vinte ensaios de campo conduzidos no Brasil, em nove locais distintos, em três safras (safra 2006/2007, safrinha 2007 e safra 2007/2008), com duas avaliações por ensaio (pré-plantio e florescimento).

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da soja transgênica contendo o gene *ahas* de resistência a herbicidas do grupo químico das imidazolinonas e do manejo com herbicidas utilizados com a cultura da soja na microbiota do solo.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar quantitativamente a BMC (Biomassa Microbiana de Carbono) e de BMN (Biomassa Microbiana de Nitrogênio) comparando a cultivar transgênica Cultivance (evento 127) resistente a herbicida do grupo das imidazolinonas e a parental não transgênica (cultivar Conquista);
- Avaliar qualitativamente a diversidade genética do domínio Bactéria do solo pela técnica de DGGE, comparando a cultivar transgênica Cultivance (evento 127) resistente a herbicida do grupo das imidazolinonas e a parental não transgênica (cultivar Conquista).
- Avaliar o efeito do herbicida Imazapyr do grupo das imidazolinonas e do herbicida convencional (mistura Bentazon + Acifluorfen-sódio) na microbiota do solo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A CULTURA DA SOJA

A soja (*Glycine max.* (L.) Merrill) é usada na alimentação humana há cerca de cinco mil anos, podendo relacioná-la à origem do povo chinês. A mais antiga referência da soja no Brasil data de 1882, na Bahia. Atualmente a soja é cultivada em mais de 80 países e, na safra de 2010/2011, a produção de grãos ultrapassou 253 milhões de toneladas, tendo como os maiores produtores os Estados Unidos (32%), seguido por Brasil (28%), Argentina (21%), China (7%) e Índia (4%). O Brasil, segundo maior produtor e exportador dessa leguminosa é responsável por mais de 1/4 da produção mundial e um 1/3 das vendas globais da oleaginosa (USDA, 2011), com produção de cerca de 75 milhões de toneladas em 2010/11. As exportações brasileiras do complexo soja (grão, farelo e óleo) evoluíram de US\$ 4,2 bilhões em 2000 para US\$ 22,80 bilhões em 2011 (CONAB, 2011).

A soja é um produto de elevado valor biológico e com alto teor de proteína nos grãos, cerca de 40%. As proteínas presentes no grão em maior quantidade são as de reserva glicinina e β -conglucina, lipoxigenases, inibidor de tripsina Kunitz, inibidores de protease de baixo peso molecular (dos quais o mais estudado é o inibidor Bowman-Birk), lectina e urease. Dessas, a glicinina e a β -conglucina são as predominantes, perfazendo cerca de 70% das proteínas do grão (HILL; BREIDENBACH, 1974).

A principal fonte de óleo e de proteína, tanto para humanos, quanto para uso em rações destinadas à alimentação animal, é proveniente da soja, que também é utilizada como constituinte em muitos alimentos processados (BORÉM, 2005), além de integrar produtos como farinha, sabão, cosméticos, resinas, tintas, solventes e biodiesel (BERTRAND; LAURENT; LECLERCQ, 1987).

Um atributo importante da soja é a sua capacidade de se associar simbioticamente com bactérias denominadas rizóbios, e formar nódulos radiculares onde ocorre o processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N_2) (VARGAS e HUNGRIA, 1997). As leguminosas contêm altos teores de nitrogênio (N) em seus tecidos no período de floração, o que pode significar uma contribuição acima de 150 kg ha^{-1} ano de N, com um percentual de 60 a 80% do N proveniente da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (GILLER, 2001).

A cultura da soja possui potencial para exercer múltiplas funções em sistemas de produção. O principal papel é como produção de grãos, mas também desempenha papel relevante como adubo verde, que resulta em maior aporte de nitrogênio, melhoria nas características químicas, físicas e biológicas do solo, com aumento da retenção de nutrientes, no controle de plantas invasoras, de parasitas e da erosão do solo (CALEGARI, 1995).

3.2 MICROBIOTA DO SOLO

O solo é considerado um sistema vivo e dinâmico, que possui uma fração biológica composta por comunidades de pequenos animais e microrganismos que estão intimamente associados à matéria orgânica, utilizando-a como fonte de energia e de nutrientes necessários à biossíntese celular, principalmente dos microrganismos. A fração orgânica do solo representa um sistema complexo, constituído de diversas substâncias, sendo sua dinâmica determinada pela incorporação de material vegetal e animal ao solo e pela transformação destes, por meio da ação de distintos grupos de microrganismos, de enzimas e da fauna do solo (MENDONÇA; LEITE, 2006). As relações e interações entre as diferentes comunidades de organismos do solo contribuem para a manutenção da vida do solo, e para diversos outros processos que, por sua vez, estão intimamente ligados à cadeia trófica (ARAUJO; HUNGRIA, 1994).

A biomassa microbiana do solo é definida como a parte viva da matéria orgânica do solo, composta pelos organismos menores que $5 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^3$, como fungos, bactérias (incluindo actinomicetos), leveduras e protozoários (SIQUEIRA; MOREIRA, 2002), representa, em média, de 2 a 5% do carbono (C) orgânico (JENKINSON; LADD, 1981) e de 1 a 5% do nitrogênio (N) total do solo (SMITH; PAUL, 1990), é proporcionalmente a menor fração do C orgânico do solo e constitui uma parte significativa e potencialmente mineralizável do N que pode ser disponibilizado para as plantas (GAMA-RODRIGUES et al., 2005).

A comunidade microbiana do solo é influenciada pela temperatura, umidade e aeração, disponibilidade de nutrientes e pelos substratos orgânicos (BALOTA et al., 1998; FRANCHINI et al., 2007). 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, 1998).

A comunidade microbiana do solo desempenha um papel fundamental na dinâmica de nutrientes em diferentes ecossistemas, afetando as transformações de C, N e fósforo (P) (DÍAZ-RAVIÑA; ACEA; CARBALLAS, 1993). A biomassa microbiana atua como um tampão do N no solo, controlando a disponibilidade desse nutriente por meio dos processos de mineralização e imobilização (VARGAS; SCHOLLES, 1998; GAMA-RODRIGUES et al., 2005). Dentre os indicadores do solo capazes de representar a população microbiana, a biomassa microbiana destaca-se devido à sua relação com a matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e fluxo de energia (DORAN; PARKIN, 1996; DE-POLLI; GUERRA, 1999; WAKELIN et al. 2008; WANG et al., 2009).

A manutenção e a produtividade dos agrossistemas dependem, em grande parte, do processo de decomposição da matéria orgânica no solo, realizado pelos microrganismos e da consequente mineralização dos nutrientes. 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. Além disso, pode fornecer um índice das condições de fertilidade do solo, sendo considerada como um reservatório de nutrientes, imobilizando-os temporariamente e reduzindo as perdas por lixiviação, o que possibilita seu uso posterior pelas plantas, desempenhando um papel ativo na prevenção de perdas de nutrientes (JENKINSON; LADD, 1981; DRINKWATER; SNAPP, 2007).

O reconhecimento da importância dos microrganismos do solo tem levado a um aumento no interesse em mensurar os elementos contidos nas células microbianas, como o C e o N, como indicadores da biomassa. A estimativa da biomassa de microrganismos fornece dados úteis sobre mudanças nas propriedades biológicas do solo decorrentes de práticas agrícolas, tais como: manejo de solo, efeito de fertilizantes e biocidas em geral. Além disso, pode indicar mudanças na matéria orgânica total do solo muito antes de mudanças nos teores de C e N totais do solo serem detectáveis (HENROT; ROBERTSON, 1994; FRANCHINI et al., 2007; KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2011; KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010).

A determinação da biomassa microbiana do solo permite avaliar as mudanças edáficas de maneira mais rápida do que as baseadas em análises químicas do solo e pode ser usada como indicativo da qualidade do solo (BENDING et al., 2004; POWLSON; BROOKES; CHRISTENSEN, 1987; FRANCHINI et al.,

2007; SOUZA et al., 2008a; SOUZA et al., 2008b), auxiliando na avaliação e no estabelecimento de um novo equilíbrio biodinâmico do solo, além de fornecer subsídios para o planejamento do uso da terra.

Trannin, Siqueira e Moreira (2007), estudando o efeito da aplicação de diferentes doses de bio sólido nas características biológicas indicadoras de qualidade do solo, constataram favorecimento de forma consistente das características estudadas, aumentando as concentrações de C e N da biomassa microbiana e os processos bioquímicos indicadores de qualidade do solo.

Modificações mensuráveis na biomassa microbiana têm sido observadas em razão das práticas de preparo do solo, do manejo de plantas, e da adubação. Diferenças na dinâmica da comunidade microbiana, incluindo aumento da biomassa bacteriana e fúngica foram relatadas logo no primeiro ano da conversão do sistema de plantio convencional para o direto (MINOSHIMA et al., 2007). Assim, Muruganandam et al. (2010) verificaram que o sistema de plantio direto proporciona, a longo prazo, um aumento nos teores de nutrientes do solo, com incremento da biomassa microbiana, assim como também foi observado por Mendes et al. (2003).

Marchiori Júnior (1998), analisando o C microbiano, encontrou, em áreas cultivadas com algodoeiro por 10 anos, reduções superiores a 60% no C microbiano em relação à mata natural.

A mineração é outro fator que reduz consideravelmente a biomassa microbiana. Estudos realizados em solos de mineração de bauxita no estado de Minas Gerais mostraram decréscimos de até 99% nos teores de biomassa microbiana. No entanto, a revegetação das áreas mineradas promoveu a recuperação total dos atributos bioquímicos do solo (CARNEIRO et al., 2008).

A rotação de culturas, aliada ao manejo correto do solo, faz com que o solo seja biologicamente mais ativo e com maior potencial produtivo. Esse efeito se deve à conjunção de fatores como, proteção do solo mediante cobertura viva ou morta, maior retenção de umidade, efeito rizosférico das culturas, maior disponibilidade de matéria orgânica e melhores condições físicas do solo (CATTELAN; GAUDÊNCIO; SILVA, 1997; VENZKE FILHO et al., 2008).

Silva et al. (2010) afirmam que o manejo mais intensivo do solo e o uso frequente de agrotóxicos podem reduzir os teores de C-microbiano e aumentar os valores de qCO_2 , indicando condição de estresse para a comunidade microbiana. Frazão et al. (2010) citam que sistemas com menor intensidade de manejo do solo

apresentam maior atividade respiratória da biomassa microbiana, e, portanto, a respiração basal funciona como indicador das alterações da atividade microbiana do solo.

Em um trabalho realizado em plantações comerciais de eucalipto com uma seqüência de idades de 1, 3, 5 e 13 anos sob condições edafoclimáticas semelhantes, Barreto et al. (2008) encontraram maiores teores de C e N microbiano na serapilheira do que no solo, para todas as idades avaliadas, sugerindo que a serapilheira seria uma importante reserva de C e N microbiano em povoamentos de eucalipto.

Geraldes, Cerri e Feigl (1995), avaliando a biomassa microbiana do solo sob pastagens na Amazônia, observaram que após 4 anos de implantação, houve aumento de 37 g de C e 3,6 g de N por m² de solo em relação à mata natural. Isso se deve, possivelmente, ao aumento no teor de C do solo ocasionado pelo maior aporte de raízes nas pastagens mais jovens. No entanto, com o decorrer do tempo de cultivo da pastagem, houve diminuição da biomassa microbiana do solo. Os autores atribuíram essa diminuição às modificações causadas na estrutura do solo pela compactação provocada pelo pisoteio pelos bovinos e verificada pelo aumento da densidade global medida nesse solo. Segundo Souza et al. (2010), quanto maior a presença de raízes, maior deve ser a exsudação de compostos orgânicos, que servirão como fonte de C e energia à BMS, causando maior estímulo à atividade microbiana.

Solos sob sistemas conservacionistas, como no plantio direto na palha, apresentam maiores quantidades de biomassa microbiana do que aqueles sob preparo intensivo (SIQUEIRA; MOREIRA, 2002; FRANCHINI et al., 2007; HUNGRIA et al., 2009). Em geral, quanto mais conservacionista o sistema, maior o acúmulo de N imobilizado na biomassa microbiana na superfície (FIGUEIREDO et al., 2007).

Em áreas sob pastagem cultivada em diferentes regiões do Brasil, os dados disponíveis apontam para valores de C da biomassa microbiana, em cerca de 50% inferiores aos observados sob vegetações nativas. (SIQUEIRA; MOREIRA, 2002) observaram-se valores entre 66 e 739 mg de BMC kg⁻¹ solo, com média de 287 mg de BMC kg⁻¹ solo. Na Amazônia, solos sob floresta apresentam biomassa microbiana de até 1300 mg C kg⁻¹, enquanto em solos sob pastagens de gramíneas estes valores situam-se entre 203 e 754 mg C kg⁻¹ de solo. Em geral, em solos

ácidos sob florestas encontram-se baixos valores de biomassa microbiana, indicando condições adversas ao crescimento microbiano. Em estudos conduzidos na Embrapa Agropecuária Oeste, em um Latossolo Vermelho distroférico típico, constatou-se teores de C da biomassa microbiana mais elevados no sistema natural, seguido pelo sistema de integração lavoura-pecuária, plantio direto e, por último, pelo sistema convencional (MERCANTE; FABRICIO; GUIMARÃES, 2000). Ciclos de culturas anuais com pastagens (integração lavoura-pecuária) garantem maiores aportes de resíduos e taxas elevadas de acúmulo de matéria orgânica do solo, favorecendo ao incremento da biomassa microbiana (VILELA et al., 2003; SALTON, 2005). Sistemas de integração lavoura-pecuária em plantio direto mantêm a qualidade biológica do solo, por outro lado, solos sob alta intensidade de pastejo apresentam perdas nessa qualidade em condições de estresse hídrico (SOUZA et al., 2010).

Vários trabalhos indicam que a distribuição da biomassa microbiana no perfil do solo não é uniforme (OADES; JENKINSON, 1979; HELGASON et al., 2010), sendo importante que seja verificada em diferentes profundidades. A quantidade de biomassa microbiana do solo decresce com a profundidade, independentemente do tempo e sistema de manejo (VAN GESTEL; LADD; AMATO, 1992). Os maiores teores de C-microbiano em diferentes sistemas de manejo do solo foram observados na profundidade de 0 - 10 cm, onde são maiores a presença e a atividade da microbiota do solo (SILVA et al., 2010). Na mata nativa esses teores são ainda maiores, indicando uma condição mais favorável à microbiota do solo, devido ao maior aporte de substratos orgânicos (CARDOSO et al. 2009).

Em experimento realizado em Latossolo Amarelo na Amazônia, Cerri, Volkoff e Eduardo (1985), observaram que a biomassa microbiana apresentou distribuição mais uniforme nos primeiros 15 cm do solo, começando a decrescer a partir desta profundidade, tornando-se praticamente nula abaixo de 30 cm.

Ferreira et al. (2007), estudando a influência de diferentes sistemas de manejo do solo na dinâmica do C da biomassa microbiana, em diferentes épocas e diferentes profundidades, observaram que os teores de C microbiano foram menores nas camadas mais profundas. No solo sob sistema de plantio direto os teores de C microbiano decresceram das camadas mais superficiais para as mais profundas e de forma mais acentuada do que no solo sob sistemas convencionais. Esses resultados corroboram com os encontrados por Babujia et al. (2010), que

observaram em um experimento conduzido por 20 anos sob plantio direto e convencional em um Oxisol no sul do Brasil, maiores valores de C microbiano nas camadas mais superficiais e, também, um incremento de 35% no C-BM no sistema de plantio direto comparado com o convencional.

Wortmann et al. (2008) encontraram mudanças significativas na composição da comunidade microbiana com a profundidade em sistemas de plantio direto. Essas mudanças podem ser atribuídas à redistribuição do C ao longo do perfil do solo. Nesse sentido, Fuka et al. (2009) observaram que a diversidade de bactérias proteolíticas em solo agrícola foi maior na camada superficial devido à maior quantidade e heterogeneidade de substratos. Desta forma, vários estudos têm demonstrados os benefícios do sistema de plantio direto nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (Balota et al., 1998; Franchini et al., 2007; Hungria et al., 2009).

Reduções na biomassa microbiana de solos de cerrados sob uso agrícola em relação à mata nativa foram observadas por Mendes et al. (2002). As áreas sob vegetação nativa são mais favoráveis à biomassa, devido à ausência de preparo do solo e a maior diversidade florística favorecendo maior acúmulo da serrapilheira na superfície do solo, melhorando as condições de temperatura e umidade.

Apesar do crescente interesse por aspectos relacionados com o funcionamento biológico do solo sob sistemas naturais e agrícolas, estudos sobre o impacto de diferentes sistemas de manejo do solo e das culturas na biomassa e atividade microbiana são recentes.

3.3 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, mas as espécies menos abundantes contribuem para a diversidade biológica (ATLAS; BARTHA, 1997).

A diversidade biológica, ou biodiversidade, pode ser 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). Assim, uma elevada diversidade elevada de espécies contribui para o uso mais eficiente dos recursos disponíveis.

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

Inicialmente a detecção e a identificação de bactérias eram feitas por meio de técnicas tradicionais, com meios de culturas e observação direta via microscópio. Essas metodologias forneciam informações limitadas, levantando a necessidade do desenvolvimento de técnicas mais refinadas. Tótola; Chaer (2002) com base em dados de DNA extraído do solo estimaram que o número de genomas em um grama de solo estaria em torno de 10.000, e que somente uma pequena fração destes (de 0,1 a 10%) teria capacidade de crescer em meio de cultivo em laboratório.

A partir de então, foram desenvolvidas várias técnicas moleculares, destacando aquelas baseadas nos ácidos nucleicos. 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. De todos os genes ribossomais, o *16S rRNA* é utilizado, atualmente, como método padrão para identificação de famílias, gêneros e espécies de bactérias (GARRITY; HOLT, 2001). Nos estudos sobre diversidade estrutural de comunidades microbianas, o gene *16S rRNA* é muito utilizado por apresentar características como alto grau de conservação e presença de regiões variáveis entre as espécies (HEUER; SMALLA, 1997).

A variabilidade nas seqüências de *16S rRNA* pode ser avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) que permite analisar produtos de PCR de acordo com suas seqüências de pares de bases e não pela diferenças no tamanhos dos produtos, uma vez que moléculas de DNA com seqüências diferentes apresentam taxas de migração diferentes em geis desnaturantes (MUYZER et al., 1993). Essa metodologia é

considerada uma excelente ferramenta para estudos de impacto ambiental sobre a diversidade microbiana associada a determinado ambiente.

Segundo Tótola e Chaer (2002), quanto maior a diversidade, maior é a estabilidade dos ecossistemas, pois o uso dos recursos disponíveis é mais eficiente, sendo menor o gasto de energia para sustentar a biomassa microbiana ali presente. A diversidade microbiana tem efeito positivo na eficiência de ciclagem de nutrientes, contribuindo para o incremento de processos ecológicos diretamente ligados à qualidade do solo ecossistema.

3.4 ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

3.4.1 Efeito da Aplicação de Agrotóxicos sobre a Comunidade Microbiana do Solo

A revolução na ciência nas últimas décadas é proveniente do avanço no conhecimento de como as células e os organismos funcionam em nível molecular, bioquímico e fisiológico, e do desenvolvimento de técnicas que permitem a transferência de genes específicos de um organismo para outro. Isto significa que é possível obter uma planta transgênica pela transferência de um ou poucos genes identificados com precisão e com função conhecida.

A transformação genética ou engenharia genética tornou possível, também, a remoção ou a inativação de genes indesejáveis, bem como a modificação de genes da própria planta, que atuam em rotas metabólicas específicas para melhorar a qualidade do produto (ex. tomates geneticamente modificados que permanecem firmes por períodos mais longos na prateleira).

Os organismos geneticamente modificados (OGMs) são organismos vivos, plantas, animais ou microrganismos, cujo material genético foi alterado por engenharia genética, seja pela introdução de sequências de DNA exógenas, que podem ser originárias de qualquer organismo vivo, inclusive de organismos filogeneticamente distantes à espécie a ser modificada (TOZZINI, 2004), seja pela inativação de genes endógenos (TERADA, 2002).

Em geral, são vários os motivos que determinam a necessidade de manipulação nos genes dos organismos. Como exemplo, em plantas, pode-se citar o aumento do valor bioquímico, acrescentando nutrientes que antes não estavam presentes, a eliminação ou diminuição do uso de agrotóxicos, adicionando toxinas

que matam os predadores. Muitos pesquisadores afirmam 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 (GIANOTTO et al., 2010).

Há previsões de 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, acredita-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 glifosato, o bromoxynil, a sulfonilurea e as imidazolinones apresentam tais características (ARAÚJO, 2001).

A soja geneticamente modificada pela Monsanto (soja Roundup Ready, ou "RR") foi liberada para o plantio pela primeira vez nos Estados Unidos em 1996, com a área plantada ampliando-se de 2% para 81% em 2003 e, depois, no Canadá, na Argentina e no México. Com aproximadamente 81,9 milhões hectares é a cultura que ocupa a maior área plantada no mundo. Dos 29 países que cultivam lavouras transgênicas, em 2010, o Brasil apresentou a segunda maior área plantada, com 17,8 milhões de hectares cultivados com a soja transgênica (JAMES, 2010).

A Soja RR transgênica resistente ao Roundup, herbicida à base de glifosato, contém material genético da *Agrobacterium*, uma bactéria do solo (NODARI; GUERRA, 2001). O glifosato é um aminofosfonato análogo ao aminoácido natural glicina, e que ocupa o lugar desta na síntese proteica. Seu nome é uma contração de glicina + fosfato. Esse produto mata as plantas por inibir a enzima 5-enolpiruvoil-shikimato-3-fosfato sintetase (EPSPS), que sintetiza os aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano. O mecanismo de ação do glifosato consiste na inibição da enzima EPSPS, que catalisa a condensação do ácido shiquímico a fosfoenolpiruvato (OLIVEIRA JR. et al., 2008). Os aminoácidos aromáticos são usados também para produzir metabólitos secundários como folatos, ubiquinonas e naftoquinas. A via do shikimato não está presente em animais (JAWORSKI, 1972; ZABLOTOWICZ; REDDY, 2004). Os quais retiram da dieta os produtos aromáticos que necessitam. Já as plantas são obrigadas a produzir esses

aminoácidos essenciais para sua sobrevivência e multiplicação (GRUYS; SIKORSKI, 1999). A enzima EPSPS de todas as plantas, fungos e da maioria das bactérias isoladas e caracterizadas é inibida pelo glifosato. Alguns microrganismos possuem uma forma de EPSPS resistente ao glifosato. A versão usada nas culturas geneticamente modificadas foi isolada da cepa C4 da *Agrobacterium*, resistente ao glifosato. Então, o gene CP4 EPSPS foi clonado e inserido na soja (ZABLOTOWICZ; REDDY, 2004).

A rápida translocação do glifosato das folhas da planta tratada para as raízes, rizomas e meristemas apicais é uma das mais importantes características do glifosato. Esta propriedade sistêmica resulta na destruição total de plantas daninhas perenes, difíceis de serem eliminadas (SPRANKLE; MEGGITT; PENNER, 1975; FRANZ, 1985; GRUYS; SIKORSKI, 1999).

O glifosato não apresenta ação residual no solo, pois ele é firmemente adsorvido às suas partículas e é rapidamente metabolizado pelos microrganismos do solo produzindo, no final, ácido fosfórico, amônia e dióxido de carbono (FRANZ, 1985).

As imidazolinonas pertencem a outro grupo de herbicidas que controlam um amplo espectro de plantas daninhas. Esses herbicidas são absorvidos pelas raízes e folhas das plantas, sendo transportados pelo floema e xilema, acumulando-se nos pontos de crescimento. O controle é proporcionado pela inibição da enzima *acetolactato sintetase (ALS)*, primeira enzima na via metabólica de biossíntese dos aminoácidos alifáticos de cadeia ramificada da leucina, valina e isoleucina. O efeito fitotóxico das imidazolinonas é causado pela deficiência desses aminoácidos, interrompendo a síntese proteica que, por sua vez, interfere na síntese do DNA, afetando assim a divisão celular e a translocação de fotossintatos aos pontos de crescimento. Esses processos provocam reduções no crescimento das plantas e no alongamento das folhas e cloroses entre as nervuras foliares (SHANER; SINGH, 1993; BRIGHENTI et al., 2002; TAN; EVANS; SINGH, 2006).

Os herbicidas integrantes do grupo das imidazolinonas são os imazapyr, imazapic, imazethapyr, imazamox, imazamethabenz e imazaquin, que contêm em suas moléculas uma estrutura em comum, o imidazol, separando-se em três subgrupos, com base em uma segunda estrutura cíclica (KRAEMER et al., 2009).

Outros grupos químicos de herbicidas que inibem a enzima acetolactato sintase (ALS) são as sulfoniluréias (SUL), as triazolopirimidina sulfonilidas (TRS) e o pirimidil-oxi-tiobenzoato (POT).

Há poucos estudos sobre os efeitos dos herbicidas nas variedades de soja transgênica cultivadas no Brasil, assim como sobre sua influência na comunidade de microrganismos do solo.

A aplicação de herbicidas pode alterar a atividade microbiana do solo, dependendo do herbicida aplicado, do tipo de solo, da espécie da planta e da microbiota e suas interações (SANTOS et al., 2005; WEAVER, 2007; REIS et al., 2009). A biomassa microbiana também pode sofrer, parcialmente, a inibição por alguns agrotóxicos aplicados ao solo. Contudo, microrganismos tolerantes sobressaem em detrimento dos sensíveis, não havendo alteração na biomassa microbiana total (REIS et al., 2009).

Os herbicidas à base de glifosato e imazaquim aplicados em plantas de soja geneticamente modificadas e convencionais são considerados de moderada toxicidade, devido à sua baixa mobilidade. Entretanto, esses herbicidas podem interferir na estrutura da comunidade microbiana do solo, seja pela ação direta em um determinado grupo microbiano, seja por vantagens competitivas que conferem a outros (DESCALZO et al., 1998; KREMER; MEANS; KIM, 2005).

Zilli et al. (2008), com o objetivo de avaliar alterações provocadas pela aplicação de herbicidas à base de glifosato e imazaquin no teor de C da biomassa microbiana do solo observaram que ambos os herbicidas não ocasionaram alterações significativas nesse parâmetro. Os efeitos de herbicidas à base de glifosato sobre o BMC estão frequentemente associados à capacidade de alguns microrganismos, principalmente fungos (KREMER; MEANS; KIM, 2005), utilizarem a molécula do produto como fonte de C e N (HANEY et al., 2000). No entanto, Li, Allen e Wollum (2004) observaram, em condições de campo, redução da biomassa microbiana do solo e, também, da mineralização de compostos orgânicos pela aplicação do ingrediente ativo Imazapyr, pertencente ao grupo químico das imidazolinonas.

Objetivando avaliar o efeito da aplicação sequencial do nicosulfuron sobre os microrganismos do solo, Oliveira et al. (2009) verificaram efeito negativo no C da biomassa microbiana que, segundo os autores, pode ser o resultado direto da intoxicação pelo princípio ativo testado (nicosulfuron) sobre seu metabolismo, ou

pelo efeito dos constituintes do produto comercial. A aplicação de agrotóxicos no solo influencia toda a dinâmica do ecossistema, agindo sobre as formas de vida e suas relações.

Pereira et al. (2008) observaram que a aplicação de glifosato não afetou a produção de CO₂ pela microbiota do solo, mas a aplicação do inseticida endosulfan, isolado ou em mistura com o glifosato, afetou a produção de CO₂, a biomassa microbiana e o quociente metabólico. As populações de microrganismos do solo são muito sensíveis a alterações causadas no ambiente, principalmente as causadas por substâncias tóxicas. O endosulfan quando aplicado pode atingir o solo, formando endosulfan diol e sulfato de endosulfan, que mostrou alta toxicidade para a comunidade microbiana. Esse resultado está de acordo com Wardle e Parkinson (1990), que também não observaram efeitos do glifosato nos microrganismos do solo, provavelmente devido à rápida inativação e degradação desse produto no solo.

Jakelaitis et al. (2007), estudando o impacto dos herbicidas atrazine e nicosulfuron não observaram alterações no carbono da biomassa microbiana. De acordo com esses autores, em solos com alta porcentagem de matéria orgânica, os herbicidas não foram capazes de fornecerem substrato para a microbiota do solo e não causaram efeito tóxico sobre os microrganismos a ponto de alterar esse indicador de qualidade do solo. Já no trabalho de Santos et al. (2005), os herbicidas fluazifop-p-butyl e fomesafen e a mistura comercial destes promoveram efeito negativo sobre a biomassa microbiana. Uma possível causa da toxicidade do fomesafen aos microrganismos pode ser atribuída ao seu mecanismo de ação, pois é inibidor da enzima protoporfirinogênio oxidase (protox), provocando acúmulo de protoporfirina em células tratadas com esse herbicida, ocasionando interação com o oxigênio para produção de formas reativas e, conseqüentemente, peroxidação dos lipídeos e morte celular. O fluazifop-p-butyl, apesar de ter sido menos tóxico para a microbiota, é um potente inibidor da síntese de acetil coenzima A carboxilase (ACCase), presente também no metabolismo microbiano.

Santos et al. (2007), avaliando o efeito da aplicação de três marcas comerciais, formulados de glyphosate – Roundup Ready e R. Transorb, formuladas à base do sal de isopropilamina, e Zapp Qi, à base do sal potássico – sobre a soja transgênica (variedade CD 219RR) tolerante ao glifosato, observaram que o Roundup Transorb à base do sal de isopropilamina foi mais prejudicial às plantas de

soja, reduzindo o número de nódulos radiculares e foi a única entre as formulações testadas que promoveu efeito negativo sobre a microbiota do solo, sendo o carbono da biomassa microbiana (C-BM) diminuído para valor abaixo de $87 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo, enquanto que no solo sem aplicação do herbicida esse valor foi superior a $130 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo. Segundo Reddy e Zablutowicz (2003), tais efeitos negativos do glifosato sobre a soja transgênica podem ser atribuído a surfactantes presentes na formulação ou ao tipo de sal presente que podem agir por intoxicação direta dos microrganismos.

3.4.2 Efeito de Plantas Geneticamente Modificadas sobre a Microbiota do Solo

Com relação ao cultivo de plantas transgênicas, uma das grandes preocupações está relacionada aos possíveis efeitos que os genes ou seus produtos podem causar à microbiota do solo. Eles possivelmente serão liberados no solo, podendo ocorrer interação com a comunidade microbiana. Além do efeito direto decorrente da expressão da proteína introduzida durante a transformação, existe a probabilidade de aparecimento de efeitos não esperados que resultam da inserção do transgene no genoma, como por exemplo, alterações na síntese de proteínas que podem se refletir nas vias metabólicas, produzindo modificações imprevisíveis (CELLINI et al., 2004).

Dentre os potenciais efeitos do uso de plantas transgênicas sobre a microbiota do solo estão: alterações na atividade e diversidade de microrganismos em resposta à mudanças na quantidade e composição de exsudados radiculares; alterações provocadas por mudanças no manejo como aplicações de pesticidas e preparo do solo; mudanças genéticas e funcionais resultantes da transferência horizontal de genes das plantas transgênicas para microrganismos do solo (DUNFIELD; GERMIDA, 2004; MOTAVALLI et al., 2004). A transferência de genes entre espécies próximas pode ocorrer em muitas situações, como por exemplo, entre o arroz cultivado e o arroz vermelho, beterraba cultivada e beterraba não domesticada (WILSON, 1990).

O fluxo genético entre plantas de canola (*Brassica napus*) resistentes ao glifosato foi determinado por Hall et al., (2000), revelando que novas combinações de resistência podem ser expressas. Por outro lado, no Brasil não

existe nenhuma espécie nativa ou silvestre que possa intercruzar com *Glycine* spp., o que torna impossível o fluxo gênico entre a soja RR e alguma planta daninha.

Os efeitos das plantas geneticamente modificadas no solo ainda foram pouco estudados, mas já existem relatos do impacto dessas plantas na microbiota do solo. A diversidade de microrganismos no solo rizosférico é determinada pela composição dos exsudatos da raiz da planta. Dessa forma, as plantas transgênicas podem alterar a dinâmica microbiana, pois exsudam toxinas pelas raízes, estando disponíveis para a degradação pelos microrganismos. Além disso, essas toxinas podem ainda afetar organismos responsáveis pela ciclagem da matéria orgânica (fragmentadores e decompositores), reduzindo a degradação de compostos como celulose, hemicelulose, quitina e lignina, entre outros (CAPALBO et al., 2005). Autores como Castaldini; Turrini; Sbrana, (2005); Fang et al. (2005); Rasche et al. (2006) verificaram efeitos sobre a dinâmica funcional da microbiota do solo em diversos estudos e demonstraram que a transgênese pode alterar a composição da comunidade microbiana do solo e da rizosfera.

Donegan et al. (1995) verificaram que a adição de tecidos de plantas de algodão transgênico que produzem a toxina B.t.k. no solo causou estímulo de bactérias aeróbias e populações fúngicas. Segundo os autores, a manipulação genética de plantas pode produzir mudanças nas suas características, podendo influenciar o crescimento e a composição de espécies microbianas do solo.

Saxena; Flores; Stotzky, (1999) estudando a exsudação da toxina Bt pela raiz do milho transgênico, verificaram que pode ocorrer interação desses exsudatos com a microbiota do solo.

Compostos orgânicos liberados nos exsudatos de raízes de plantas transgênicas podem estimular o crescimento microbiano, atuando como promotores da comunidade microbiana (HAWES; BRIGHAM, 1992).

Por outro lado, existem relatos de que as toxinas liberadas por plantas transgênicas são rapidamente adsorvidas pelas partículas do solo e biodegradadas pelos próprios microrganismos.

Wei et al. (2008), comparando o arroz Bt expressando a proteína Cry1Ab com o não transgênico, com e sem aplicação de inseticida triazofos, sobre os processos bioquímicos do solo e a comunidade microbiana, observaram que não houve diferença na atividade da fosfatase, desidrogenase, respiração e composição

da comunidade fúngica da rizosfera do solo cultivado com arroz Bt e não transgênico com aplicação de triazofos.

Em um estudo com mamão transgênico resistente a vírus foram observados aumentos significativos no número de bactérias e fungos no solo, em relação ao solo com mamão convencional (WEI et al., 2006), provavelmente, devido às fontes de energia fornecidas para o crescimento microbiano pelos exsudatos das raízes da planta transgênica. Foram constatadas ainda alterações nas propriedades químicas, atividade enzimática e na comunidade microbiana do solo com mamão transgênico. Os produtos liberados no solo via exsudatos de plantas transgênicas podem mudar o ambiente rizosférico e a comunidade microbiana do solo. Nos solos cultivados com mamão transgênico ocorreram aumentos significativos de atividades de arilsulfatases, fosfatase alcalina, invertase e fosfodiesterases. No entanto, para as enzimas proteases, polifenoloxidasas e urease foram constatadas as maiores atividades em solo cultivado com mamão convencional. Para os autores, isso pode estar relacionado ao efeito da planta na rizosfera, às propriedades físico-químicas do solo ou à proliferação da bactéria após o cultivo do mamão transgênico.

Wu et al. (2004a) e Flores, Saxena e Stotzky (2005) relataram que mudanças na UFC de microrganismos e na atividade enzimática em solo com plantas transgênicas foram causadas por mudanças nas características da planta de mamão. Assim, estudos sobre os exsudatos de raízes e característica de crescimento do mamão transgênico, como metabolismo do nitrogênio e do enxofre, teor de clorofila e a taxa fotossintética são necessários para determinar se há efeito dos produtos liberados por essa planta na composição e atividade de microrganismos do solo.

Em outro estudo realizado por Asao, Arai, e Nishizawa (2003) com morangueiros transgênicos, os autores não observaram diferenças na microbiota do solo plantado com a planta transgênica e a não transgênica.

Avila (2007) observou maior atividade microbiana no solo de rizosfera de algodão Bt do que no solo de rizosfera de algodão convencional, nas fases de formação do botão floral e abertura dos capulhos. Acredita-se que nesse estágio da planta a expressão da proteína Cry seja maior, ocorrendo, portanto, maior exsudação da mesma no solo. A atividade microbiana estimada por hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) apontou para uma provável correlação com a

presença da proteína Cry, pois o aumento ou diminuição da atividade microbiana, na maioria das vezes, acompanhou os níveis de proteína Cry.

Devare, Jones e Thies (2004) não observaram alterações significativas na atividade da comunidade bacteriana associada ao milho Bt em relação à variedade não transgênica. Segundo Bruinsma, Kowalchuk, e van Veen (2003), os estudos de impacto têm resultados muito variáveis, cada planta e cada gene introduzido têm diferentes efeitos na comunidade microbiana da rizosfera. Já Griffiths et al. (2006), estudando a comunidade microbiana em dois tipos de solos cultivados com milho Bt, relataram que o principal efeito sobre a microbiota foi o tipo de solo e observaram que não houve efeitos da característica Bt na estrutura da comunidade microbiana.

A variação nas respostas pode estar relacionada à influência de outros fatores na interação planta-microrganismo, como por exemplo, edafo-climáticos, idade da planta, heterogeneidade do local e variedade. Esses fatores, de acordo com Wu, Ye e Min (2004b), são mais determinantes a atividade microbiana do que propriamente os efeitos de transgenias.

4 ARTIGO:

EFEITO DA TRANSGENIA COM O GENE *ahas* E DE HERBICIDAS ASSOCIADOS À CULTURA DA SOJA NA POPULAÇÃO MICROBIANA DO SOLO

Resumo: O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja geneticamente modificada. Contudo, há poucos relatos sobre eventuais efeitos relacionados à transformações genéticas para resistência a herbicidas e o respectivo uso de herbicidas específicos sobre a microbiota do solo nas condições edafoclimáticas do Brasil. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da soja transgênica contendo o gene *ahas* de resistência a herbicidas do grupo imidazolinona na microbiota do solo. Foram conduzidos vinte ensaios de campo durante três safras (2006/2007, 2007 safrinha e 2007/2008), em nove municípios localizados em seis estados e no DF. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com cinco tratamentos e quatro repetições. O herbicida imidazolinona utilizado foi o Imazapyr na dose de 70g i.a. ha⁻¹ e o herbicida convencional consistiu da mistura Bentazon + Acifluorfen-sódio, na dosagem recomendada para cada região. A amostragem do solo foi feita na camada de 0-10 cm no pré-plantio e no estágio R2 de desenvolvimento da cultura. Foram avaliados parâmetros quantitativos (C e N da biomassa microbiana do solo) e qualitativos, pela análise do perfil de DNA do domínio Bactéria do solo amplificado com “primers” para a região do 16S rDNA e avaliado em gel com gradiente desnaturante (DGGE) (“Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”). A cultivar transgênica não afetou quantitativamente e qualitativamente a microbiota do solo, quando comparada com a cultivar convencional parental e também não houve diferenças que pudessem ser atribuídas ao uso dos herbicidas.

Palavras-chave: Biomassa microbiana. Imidazolinonas. Soja transgênica. DGGE. Diversidade microbiana

EFFECTS OF THE TRANSGENE *ahas* AND OF HERBICIDES ASSOCIATED WITH THE SOYBEAN CROP IN THE SOIL MICROBIAL POPULATION

Abstract: Brazil is the second largest producer of genetically modified soybeans. However, effects related to genetic transformation and to the use of herbicides on soil microbes under different soil and climatic conditions are still rare. The objective of this study was to evaluate the effect of transgenic soybeans resistant to herbicides (gene *ahas*) on soil microbial community. A total of twenty field experiments were conducted for three seasons (2006/2007, 2007 off season and 2007/2008) in nine locations at six Brazilian States and in the Federal District. The experiments were performed in completely randomized block design with four replicates. The imidazolinone herbicide was Imazapyr used at a dose of 70 g i.a. ha⁻¹ and the mixture of conventional herbicides consisted of Bentazon + Acifluorfen-Sodium at the recommended dosage for each region. Soil was sampled at the 0-10 cm layer at the pre-planting and at the R2 stage of the soybean development. Evaluations included quantitative analyses of soil microbes (microbial biomass of C and N) and qualitative analysis of the profile of total soil DNA amplified with "primers" for the 16S rDNA and evaluated by electrophoresis by the method of DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) in the soil microbiota. The transgenic cultivar did not affect quantitatively and qualitatively soil microbiota, compared to conventional parental cultivar and also no differences were observed that could be attributed to the herbicides.

Keywords: Microbial biomass. Imidazolinone. Transgenic soybeans. DGGE.

4.1 INTRODUÇÃO

A soja geneticamente modificada (GM) da Monsanto (soja Roundup Ready, ou "RR") foi liberada para comercialização pela primeira vez nos Estados Unidos em 1996. Em 2003, 81% da área cultivada já era ocupada com soja transgênica. Logo em seguida, o plantio foi liberado no Canadá, na Argentina e no México. Em 1997 também foi desenvolvida a soja transgênica contendo o gene *ahas* resistente a herbicidas do grupo químico das imidazolinonas, e atualmente outras construções genéticas para soja resistente a outros herbicidas estão em desenvolvimento. Com aproximadamente 81,9 milhões de ha, a soja é a cultura GM com maior área cultivada no mundo e, dos 29 países com lavouras transgênicas, o Brasil ocupou a segunda posição em 2010, com 17,8 milhões de ha (JAMES, 2010).

Com a liberação do cultivo de soja transgênica no Brasil, a intensidade do uso de herbicida na cultura passou a ser grande, com a possibilidade de realizar aplicações em pós-emergência sobre as plantas de soja geneticamente

modificadas (PETTER et al., 2007), sendo os herbicidas glifosato e os do grupo das imidazolinonas os mais utilizados para o controle de plantas daninhas na cultura da soja.

Os herbicidas do grupo das imidazolinonas controlam um amplo espectro de plantas daninhas, sendo absorvidos pelas raízes e folhas e translocados pelo floema e xilema, acumulando-se nos pontos de crescimento. Esse grupo de herbicidas atua inibindo a síntese da enzima acetolactato sintase (ALS), responsável pelo processo de biossíntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina. Essa inibição interrompe a síntese proteica que, por sua vez, interfere na síntese do DNA e no crescimento celular (SHANER; SINGH, 1993; BRIGHENTI et al, 2002; TAN, 2006).

Na soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida das imidazolinonas foi introduzido, em seu genoma, o gene *ahas*, de *Arabidopsis thaliana*, que codifica a proteína AHAS (aceto-hidroxiácido sintase), que é encontrada naturalmente em todas as plantas e que catalisa a primeira etapa da biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada.

Tuffi Santos et al. (2005) relataram que algumas plantas são capazes de exsudar no solo substâncias aplicadas via parte aérea. Os exsudados radiculares podem causar efeitos na biomassa microbiana do solo, fazendo com que plantas que liberam maior quantidade de compostos sejam mais impactantes no ambiente. Desse modo, são necessários estudos sobre os possíveis efeitos de plantas geneticamente modificadas sobre a comunidade microbiana do solo.

A biomassa microbiana é responsável por funções essenciais ao solo, como a decomposição de matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, controle biológico e a degradação de agrotóxicos no solo. Pequenas alterações na qualidade do solo estão associadas com mudanças em suas propriedades biológicas, as quais apresentam alta sensibilidade a perturbações advindas do manejo, dentre elas a aplicação de defensivo agrícola (WARDLE; HUNGRIA, 1994; KASCHUK et al., 2010, 2011). Em geral, os herbicidas afetam pouco os organismos do solo, mas há relatos na literatura de que a biomassa microbiana pode ser afetada pela aplicação de agrotóxicos (LI; ALLEN; WOLLUM, 2004; KINNEY; MANDERNACK; MOSIER, 2005; SANTOS et al. 2005).

Algumas alterações na comunidade microbiana do solo, entretanto, não podem ser detectadas por métodos tradicionais, como a mensuração de C da

biomassa microbiana, respiração basal e quociente metabólico, necessitando de técnicas de avaliação da comunidade microbiana mais refinadas baseadas no DNA. Dentre essas técnicas, a avaliação da comunidade bacteriana, pela análise do gene ribossomal *16S rDNA*, por DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) tem se mostrado eficiente no diagnóstico de alterações da comunidade bacteriana associada à rizosfera de plantas (Souza et al., 2008a,b; Zilli et al., 2008; Ferreira et al., 2009).

No Brasil ainda são poucos os estudos que relatam os possíveis impactos da transgenia e da aplicação de herbicidas na microbiota do solo, notadamente em condições de campo. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar, em larga escala (20 ensaios de campo), os efeitos da soja transgênica contendo o gene *ahas* resistente a herbicidas do grupo das imidazolinonas na microbiota do solo.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

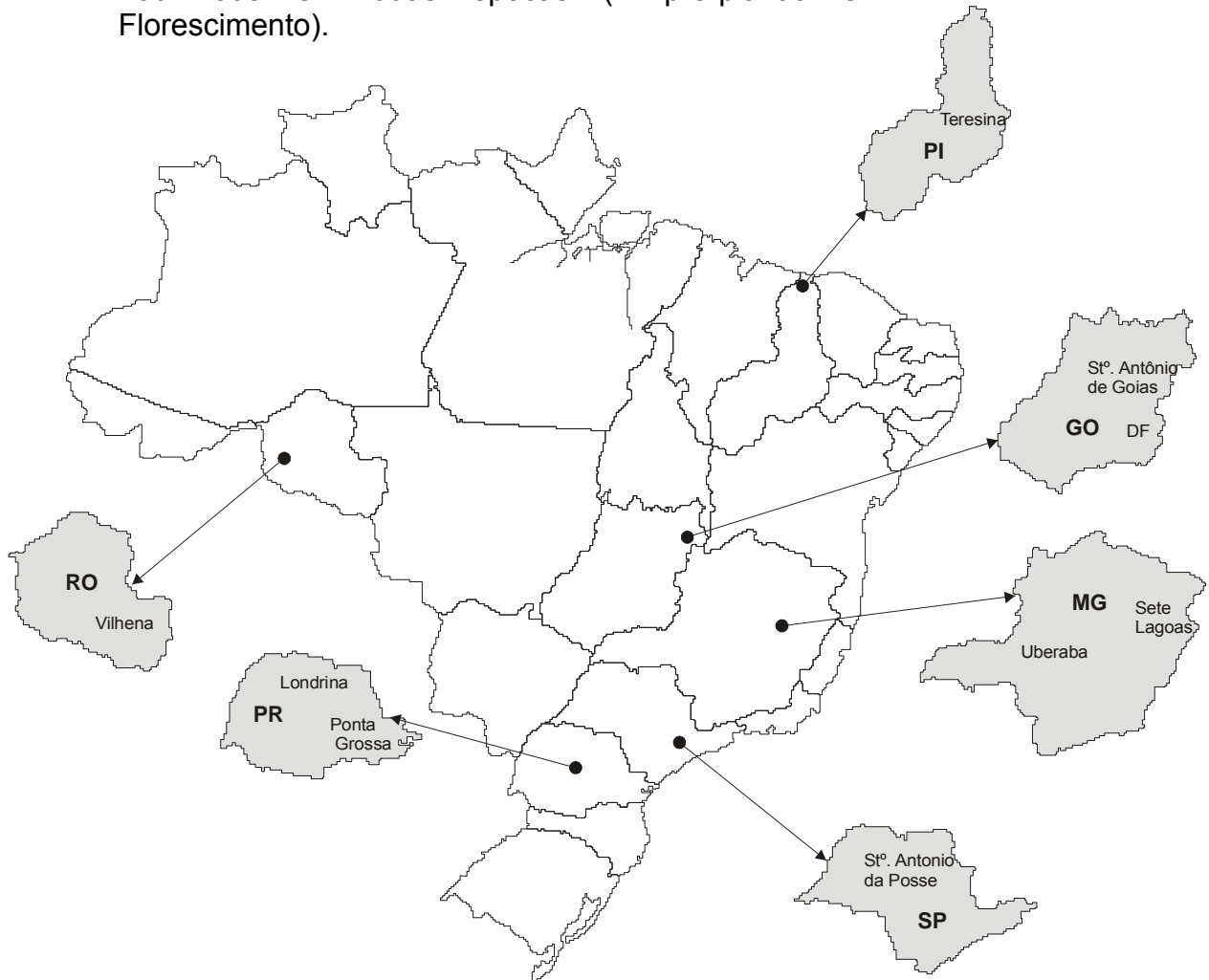
4.2.1 Local e Condução do Experimento

Os experimentos foram conduzidos por três safras [2006/2007, 2007 (safrinha) e 2007/2008] em nove locais, conforme indicado na Tabela 1 e figura 1. Os locais foram selecionados dentro das regiões representativas do cultivo da cultura da soja no Brasil e estão localizadas em regiões edafo-climáticas adequadas para o desenvolvimento da variedade Conquista (GM e convencional). Todas as estações experimentais possuem Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB).

Tabela 1 – Locais de condução, safras, localização geográfica e classes de solo dos experimentos.

Locais e siglas	Safras	Latitude (S)	Longitude (W)	Solo
Estação da BASF - Santo Antonio da Posse - SP (EEA)	2006/2007; 2007/2008	22°37'	46°54'	Argissolo Vermelho-Amarelo
Embrapa Transferência de Tecnologia - Ponta Grossa – PR (SNT)	2006/2007	25°05'	50°09'	Latossolo Vermelho
Embrapa Soja - Londrina - PR (CNPSo)	2006/2007; 2007/2008	23°18'	51°09'	Latossolo Vermelho
Embrapa/EPAMIG - Uberaba - MG (CTTP)	2006/2007; 2007-safrinha; 2007/2008	19°45'	47°55'	Latossolo Vermelho-Escuro
Embrapa Milho e Sorgo - Sete Lagoas - MG (CNPMS)	2006/2007; 2007-safrinha; 2007/2008	19°27'	44°14'	Argissolo Vermelho
Embrapa Arroz e Feijão - Santo Antonio de Goiás - GO (CNPAF)	2006/2007;2007-safrinha; 2007/2008	16°29'	49°18'	Argissolo Vermelho
Embrapa Hortaliças - Brasília - DF (CNPH)	2006/2007;2007-safrinha; 2007/2008	15°46'	47°55'	Latossolo Vermelho
Embrapa Meio Norte - Teresina - PI (EMN)	2007- safrinha	5°05'	42°48'	Argissolo Vermelho-Amarelo
Embrapa Rondônia - Vilhena - RO (ER)	2007-safrinha; 2007/2008	12°44'	60°08'	Latossolo Vermelho-amarelo

Figura 1 – Mapa indicando os nove locais onde foram conduzidos os ensaios com a cultura da soja transgênica resistente ao herbicida Imazapyr do grupo das imidazolinonas no Brasil nas safras de 2006/2007, safrinha 2007 e 2007/2008 em duas épocas (PP-pré-plantio e R2-Florescimento).



As avaliações foram realizadas em duas épocas de cultivo da soja, pré-plantio (PP) e R2 (50% das plantas no estágio de florescimento pleno, escala de Fehr e Caviness, 1977). Nos ensaios foram utilizadas três cultivares de soja convencionais e uma modificada geneticamente, em um total de cinco tratamentos (Tabela 2). Os ensaios foram conduzidos com quatro repetições, em delineamento experimental de blocos ao acaso. As parcelas úteis foram constituídas de quatro fileiras de 5 m de comprimento espaçadas em 0,5 m.

Todas as práticas de cultivo (fertilização, irrigação, controle de pragas, etc) foram aplicadas uniformemente nas áreas dos ensaios e seguiram as recomendações para a cultura da soja para cada região. A semeadura foi realizada

manualmente e concentrou-se no mês de novembro e início de dezembro (safras de 2006/2007 e 2007/2008) e em março (safrinha de 2007).

O herbicida imidazolinona utilizado foi o Imazapyr na dose de 70 g i.a. ha⁻¹ e o convencional constituiu da mistura Bentazon + Acifluorfen-sódio, na dosagem recomendada para cada região.

Tabela 2 – Tratamentos utilizados nos ensaios.

No.	Tratamento
T1	soja Cultivance - evento 127 (soja GM), com controle de plantas invasoras efetuado exclusivamente com herbicida imidazolinona
T2	soja Cultivance, evento 127 (soja GM), com controle de plantas invasoras efetuado com herbicidas convencionais
T3	cultivar parental da qual o evento 127 originou (Conquista) (soja convencional), com controle de plantas invasoras efetuado com herbicidas convencionais
T4	cultivar M-SOY 8001. (soja convencional da Monsoy), utilizada como padrão convencional, com controle de plantas invasoras efetuado com herbicidas convencionais
T5	variedade CD 217 (soja convencional da Coodetec), utilizada como padrão convencional, com controle de plantas invasoras efetuado com herbicidas convencionais

4.2.2 Amostragem do Solo

Em cada parcela e em cada coleta foram obtidas quatro amostras de solos na camada de 0-10 cm, segundo Andrade e Hamakawa (1994), para compor as amostras compostas, que depois de homogeneizadas e peneiradas em peneira 4 mm (5 mesh), foram acondicionadas em sacos plásticos (aproximadamente 200 g) e enviadas para a determinação da umidade, biomassa microbiana do solo e diversidade microbiana em laboratório.

4.2.3 Avaliação Quantitativa da Biomassa Microbiana do Solo

4.2.3.1 Biomassa microbiana de carbono (BMC)

A determinação da BMC do solo foi realizada pelo método de fumigação-extração (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987). A metodologia envolve a eliminação da microbiota do solo por fumigação com clorofórmio (CHCl_3), e seguida pela determinação do C liberado pela morte dos microrganismos por extração química.

Para cada amostra foi retirada uma subamostra de 10 g para determinação da umidade do solo e para correção do peso seco das amostras. Com base nos resultados obtidos de umidade, as amostras de solo foram uniformizadas para a umidade de 75% da capacidade de campo. A seguir, foram pesados 20 g, em frascos do tipo “snap-caps”, com duas repetições (duas fumigadas e duas não-fumigadas) e os procedimentos para incubação e extração foram realizados conforme descrito anteriormente (Franchini et al., 2007; Hungria et al., 2009).

Após o procedimento de incubação, cada amostra recebeu 50 mL do extrator sulfato de potássio (K_2SO_4) 0,5 M, foi agitada por 1 hora a 175 rpm, e centrifugada por 10 minutos a 2.500 rpm. O extrato obtido foi filtrado em papel filtro quantitativo. Os teores de C da BMC foram obtidos pela oxidação do C orgânico por permanganato de potássio (KMnO_4), segundo metodologia descrita por Bartlett e Ross (1988).

A biomassa microbiana de C foi calculada utilizando a fórmula: $\text{BMC} = (\text{C}_F - \text{C}_{\text{NF}}) / \text{K}_{\text{EC}}$, onde C_F e C_{NF} representa o C extraído das amostras fumigadas e não fumigadas. Utilizou-se o fator K_{EC} de 0,33, sugerido por Vance; Brookes; Jenkinson (1987).

4.2.3.2 Biomassa microbiana de nitrogênio (BMN)

Para a avaliação da BMN, 20 mL do extrato filtrado descrito no item 4.2.3.1 foram transferidos para tubos de digestão e, em seguida, foram adicionados: catalisador (K_2SO_4 + sulfato de cobre - CuSO_4 , 10:1) e 1,5 mL de H_2SO_4 concentrado (Bremner, 1965). Após a digestão sulfúrica, o N (NH_4^+) foi determinado espectrofotometricamente pelo método do azul de indofenol (FEIJE; ANGER, 1974).

A biomassa microbiana de N foi calculada utilizando a fórmula: $BMN = (N_F - N_{NF}) / K_{EN}$, onde N_F e N_{NF} representa o N extraído das amostras fumigadas e não fumigadas. Utilizou-se o fator K_{EN} de 0,45, (Brookes et al., 1985a,b).

4.2.4 Avaliação Qualitativa da Microbiota do Solo

4.2.4.1 Extração do DNA total do solo

A extração do DNA das amostras de solo foi realizada utilizando o "kit" "UltraClean™ soil DNA isolation kit" (Mobio Inc., Solana, CA, USA), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. O DNA total extraído do solo foi visualizado em gel de agarose a 2%, após corrida a 80 V, por 45 min. Como padrão de tamanho e quantidade de DNA, foi utilizado o marcador de massa DNA Massa Ladder (Life Sciences). Os géis foram corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

4.2.4.2 Amplificação da região 16S rRNA e eletroforese pela técnica do DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

O DNA obtido das amostras de solo foi amplificado por PCR ("polymerase chain reaction", reação da polimerase em cadeia) com "primers" (oligonucleotídeos iniciadores) para a região do 16S rDNA do domínio "Bacteria", descritos por Kozdrój & van Elsas (2001) e modificados por Souza et al. (2008a). Após a amplificação, cada amostra foi colocada para correr em um gel de eletroforese (1.5%, p/v de agarose), utilizando como padrão de tamanho e quantidade de DNA o marcador de massa DNA Massa Ladder (Life Sciences) e confirmou-se uma única banda de, aproximadamente, 700 pares de bases (pb).

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em um gel de acrilamida (CH₂CHCONH₂)-bisacrilamida [(H₂C=CHCONH) 2 CH₂] (37,5:1; m:m) a 6%, com gradiente desnaturante variando de 20% a 75%, usando duas soluções: uma solução desnaturante 100%, contendo uréia 7 M e 40% de formamida e uma solução 0% sem uréia e formamida (CH₃NO), em um aparato de DGGE da Bio-Rad (Bio-Rad DCode), conforme descrito anteriormente (Kozdrój & van Elsas, 2001; Hungria et al., 2003; Souza et al., 2009a). Os géis correram por 16 h, foram corados

com brometo de etídeo, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados. (Souza et al., 2008a).

4.2.5 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 verificou-se a significância pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Em relação à análise do gel de DGGE, 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%.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Avaliação Quantitativa da Biomassa Microbiana de Carbono (BMC) e de Nitrogênio (BMN)

4.3.1.1 Resultados dos experimentos conduzidos em sete locais na safra 2006/2007

Na avaliação de BMC realizada no pré-plantio, não houve diferença estatística entre os cinco tratamentos em nenhum dos sete locais avaliados (Tabela 3). Em R2 também, não foi constatada nenhuma diferença estatística entre os tratamentos no parâmetro de BMC nos sete locais. Os maiores e os menores valores de BMC foram detectados em Santo Antônio da Posse (EEA) e Brasília (CNPH), respectivamente (Tabela 4). Os baixos valores encontrados em CNPH podem refletir estresse ambiental, uma vez que houve um período prolongado de estiagem nesse local.

De modo similar, na avaliação da BMN realizada no pré-plantio, não houve diferença estatística entre os cinco tratamentos em nenhum dos sete locais avaliados e os maiores valores de BMN foram constatados em Ponta Grossa (SNT) (Tabela 3). Em R2 também, não foi constatada nenhuma diferença estatística entre

os tratamentos no parâmetro de BMN nos sete locais e cabe ressaltar que os maiores valores foram observados em Sete Lagoas (CNPMS) (Tabela 4).

Tabela 3 – Biomassa microbiana de carbono (BMC) e nitrogênio (BMN) ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo seco) no estágio de pré-plantio, nos ensaios conduzidos na safra de verão de 2006/2007.

Tratamento	Local														Média	
	EEA (SP)		SNT (PR)		CNPSo (PR)		CTTP (MG)		CNPMS (MG)		CNPAF (GO)		CNPB (DF)			
	BMC	BMN	BMC	BMN	BMC	BMN	BMC	BMN	BMC	BMN	BMC	BMN	BMC	BMN	BMC	BMN
T1	602,2	9,66	339,5	61,63	559,7	35,58	596,0	36,51	496,6	28,96	654,8	23,86	585,9	23,39	547,81	31,37
T2	599,3	15,99	263,2	47,66	502,7	20,63	578,3	34,62	508,4	16,02	502,9	15,64	484,7	9,96	491,36	22,93
T3	505,8	14,20	319,9	61,64	504,8	26,27	505,1	31,60	548,1	17,23	560,4	19,21	689,9	16,34	519,14	26,64
T4	507,2	12,72	557,5	58,67	467,5	24,76	497,0	18,08	585,0	29,45	566,5	21,20	816,1	35,42	570,97	28,61
T5	512,6	12,73	391,7	64,19	539,3	22,45	506,3	31,64	647,6	26,91	685,6	25,33	621,7	19,66	557,83	28,99
d.m.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CV(%)	46,7	48,3	37,2	57,6	25,0	41,8	45,8	31,80	31,0	46,5	36,3	57,5	29,7	68,3	35,96	50,26

Os dados representam médias de quatro repetições de campo e de análises realizadas em duplicata.

Tabela 4 – Biomassa microbiana de carbono (BMC) e nitrogênio (BMN) ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo seco) no estádio R2, nos ensaios conduzidos na safra de verão de 2006/2007.

Tratamento	Local															
	EEA (SP)		SNT (PR)		CNPSo (PR)		CTTP (MG)		CNPMS (MG)		CNPAF (GO)		CNPB (DF)		Média	
	BMC	BMN	BMC	BMN	BMC	BMN	BMC	BMN	BMC	BMN	BMC	BMN	BMC	BMN	BMC	BMN
T1	1.004,7	15,20	714,6	5,11	350,7	10,86	445,5	15,36	702,2	42,66	386,5	17,64	212,6	7,14	545,26	16,28
T2	1.007,0	27,24	519,7	8,85	323,6	7,72	378,5	11,85	696,5	28,62	455,0	12,14	255,1	6,66	519,34	14,72
T3	701,1	7,58	570,7	11,30	384,0	5,59	539,1	29,61	581,3	36,14	525,5	16,12	404,7	7,32	529,48	16,24
T4	798,5	14,93	667,0	6,62	432,4	6,30	497,4	9,81	602,7	36,00	478,0	9,10	305,4	10,85	540,20	13,37
T5	891,3	9,08	623,9	13,69	420,0	6,89	397,2	18,89	620,7	36,28	411,4	12,43	290,6	11,24	522,16	15,5
d.m.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CV(%)	31,6	71,2	32,2	78,2	26,0	53,7	32,0	59,5	46,9	30,8	39,0	51,4	51,8	29,8	37,07	53,51

Os dados representam médias de quatro repetições de campo e de análises realizadas em duplicata.

4.3.1.2 Resultados dos experimentos conduzidos em seis locais na safra 2007-safrinha

Na safra 2006-2007, no pré plantio (PP) (Tabela 5) e em R2 (Tabela 6), foram detectadas diferenças estatísticas entre os tratamentos nos parâmetros de BMC e BMN. No PP, os valores de BMC variaram, claramente, em função do local, com os maiores valores observados em Vilhena (ER) e os menores em Brasília (CNPB) e Uberaba (CTTP) (Tabela 5).

Em R2, os menores valores de BMC foram observados em Brasília (CNPB) (Tabela 6), área que também apresentou valores bastante baixos no PP, podendo refletir problemas de estresse ambiental, uma vez que houve um período de seca prolongada nessa área.

Em relação à BMN, os maiores valores em PP foram observados em Vilhena (ER), enquanto os menores valores foram observados em Brasília (CNPB) o que, conforme comentado pode ser relacionado a fatores climáticos (Tabela 5). Em R2, os maiores valores foram observados em Uberaba (CTTP) (Tabela 6).

Tabela 5 – Biomassa microbiana de carbono (BMC) e nitrogênio (BMN) ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo seco) no estágio de pré-plantio, nos ensaios conduzidos na safra de 2007.

Tratamento	Local													
	EMN (PI)		CNPB (DF)		ER (RO)		CTTP (MG)		CNPMS (MG)		CNPB (GO)		Média	
	BM C	BM N	BM C	BM N	BMC	BM N	BM C	BM N	BM C	BM N	BM C	BM N	BMC	BM N
T1	668,6	14,3	302,6	9,0	1218,9	23,1	297,4	20,5	793,6	24,2	420,7	20,4	616,97	18,58
T2	806,4	14,0	355,7	8,0	1081,7	23,8	377,2	13,9	630,0	15,2	590,3	11,6	640,22	14,42
T3	703,8	23,5	264,0	11,0	1201,0	21,2	219,9	15,2	712,9	17,6	673,4	16,7	629,17	17,53
T4	728,7	9,2	288,0	14,4	1175,6	20,4	354,5	22,6	631,9	11,7	452,0	10,8	605,12	14,85
T5	838,3	8,3	237,3	4,4	1268,4	16,7	362,2	18,6	869,2	21,7	586,4	15,2	693,63	14,15
d.m.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CV(%)	15,4	97,4	24,2	66,0	18,4	35,3	59,7	28,3	16,11	33,3	40,2	58,5	29,00	53,13

Os dados representam médias de quatro repetições de campo e de análises realizadas em duplicata. Médias

Tabela 6 – Biomassa microbiana de carbono (BMC) e nitrogênio (BMN) ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo seco) no estádio R2, nos ensaios conduzidos na safrinha de 2007.

Tratamento	Local													
	EMN (PI)		CNPB (DF)		ER (RO)		CTTP (MG)		CNPMS (MG)		CNPAP (GO)		Média	
	BM C	BM N	BM C	BM N	BM C	BM N	BM C	BM N	BM C	BM N	BM C	BM N	BMC	BM N
T1	468,1	25,4	169,9	9,0	636,3	27,7	509,4	47,6	597,3	15,7	546,8	22,4	487,97	24,63
T2	540,8	16,6	148,7	7,8	789,6	26,5	543,8	53,0	706,1	23,7	600,8	23,2	554,97	25,13
T3	467,6	24,4	168,9	13,2	748,1	29,5	552,1	38,9	720,4	27,7	525,9	27,9	530,50	26,93
T4	497,2	14,0	180,8	19,8	818,2	27,0	393,7	47,2	594,9	21,9	445,0	19,3	488,30	24,87
T5	519,0	21,9	205,4	12,0	824,4	26,1	541,8	52,3	686,0	29,0	608,7	27,6	564,22	28,15
d.m.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CV(%)	24,5	35,9	37,1	77,2	24,8	17,9	19,5	22,7	18,9	30,3	21,9	47,7	24,45	38,62

Os dados representam médias de quatro repetições de campo e de análises realizadas em duplicata.

4.3.1.3 Resultados dos experimentos conduzidos em sete locais na safra 2007/2008

Não houve diferença estatística entre os cinco tratamentos no estádio de PP na BMC em nenhum dos sete locais avaliados. Os valores de BMC no PP foram elevados em todos os locais, com um destaque para Londrina (CNPSo) e Sete Lagoas (CNPMS), e a exceção, com valores bastante baixos, foi observada em Uberaba (CTTP) (Tabela 7).

Mais uma vez não foi constatada, em R2, diferença estatística entre os tratamentos, em nenhum dos locais, no parâmetro de BMC, com maiores observados em Vilhena (ER) (Tabela 8).

A ausência de qualquer diferença associada à transgenia ou aos herbicidas na BMN avaliada no PP foi constatada nos sete locais avaliados. Os maiores valores de BMN no PP foram observados em Londrina (CNPSo) e os menores em Santo Antônio da Posse (EEA) (Tabela 7). Em R2 também não foram constatadas diferenças entre os cinco tratamentos na BMN, para nenhum dos locais analisados, e os valores mais elevados de BMN foram constatados em Brasília Brasília (CNPB)(Tabela 8).

Tabela 7 – Biomassa microbiana de carbono (BMC) e nitrogênio (BMN) ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo seco) no estágio de pré-plantio, nos ensaios conduzidos na safra de verão de 2007/2008.

Tratamento	Local															
	EEA (SP)		ER (RO)		CNPSo (PR)		CTTP (MG)		CNPMS (MG)		CNPFAF (GO)		CNPB (DF)		Média	
	BM C	B M N	BM C	B M N	BM C	B M N	BM C	B M N	BM C	B M N	BM C	B M N	BM C	B M N	BM C	BM N
T1	58 2,6	13, 3	69 5,9	25, 7	942, 1	31, 8	356, 52	24, 8	748, 9	8,6	85 9,6	21, 3	71 3,2	22, 3	699, 83	21, 11
T2	76 9,5	13, 2	75 9,5	23, 7	110 6,4	40, 8	217, 45	24, 7	864, 3	29, 1	88 6,0	17, 8	67 0,2	31, 6	753, 35	25, 84
T3	69 5,3	8,4	70 3,2	30, 6	114 2,8	44, 4	302, 50	28, 0	924, 9	22, 4	83 0,2	17, 3	51 0,9	34, 7	729, 97	26, 54
T4	72 5,2	12, 1	48 7,2	21, 5	111 8,9	41, 6	224, 02	23, 0	107 5,8	16, 6	70 4,4	17, 6	72 5,2	34, 2	722, 96	23, 80
T5	82 8,3	11, 8	60 2,9	20, 9	107 9,1	47, 5	301, 34	28, 9	112 5,1	22, 4	55 8,8	18, 2	59 3,4	34, 5	726, 99	26, 31
d.m.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CV(%)	45, 6	81, 4	25, 1	35, 1	20,8	43, 2	31,4	25, 8	43,9	91, 6	39, 3	24, 3	42, 8	44, 4	35,5 6	49, 40

Os dados representam médias de quatro repetições de campo e de análises realizadas em duplicata.

Tabela 8 – Biomassa microbiana de carbono (BMC) e nitrogênio (BMN) ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo seco) no estágio R2, nos ensaios conduzidos na safra de verão de 2007/2008.

Tratamento	Local															
	EEA (SP)		ER (RO)		CNPSo (PR)		CTTP (MG)		CNPMS (MG)		CNPFAF (GO)		CNPB (DF)		Média	
	BM C	B M N	BM C	B M N	BM C	BM N	BM C	BM N	BM C	B M N	BM C	B M N	BM C	B M N	BM C	BM N
T1	39 9,2	10, 7	63 5,1	17, 3	24 5,5	33, 9	25 9,3	8,8	27 2,2	17, 2	23 6,7	34, 5	53 0,3	44, 1	368, ,33	23, 78
T2	43 9,1	10, 5	53 0,2	23, 7	23 2,0	11, 8	29 8,3	13, 9a	26 4,8	20, 9	28 0,6	32, 5	30 9,7	80, 6	336, ,38	27, 70
T3	49 5,8	10, 3	59 0,6	20, 9	27 6,4	14, 2	18 9,8	10, 3	17 4,1	22, 2	26 6,1	35, 5	50 8,4	26, 5	357, ,31	19, 98
T4	40 0,3	10, 5	52 3,8	15, 5	26 1,7	19, 2	26 0,5	9,5	30 7,5	21, 6	24 8,2	21, 3	40 6,0	67, 5	344, ,00	23, 58
T5	28 4,9	10, 6	60 9,2	17, 0	29 5,9	19, 3	28 0,5	13, 8	97, 4	36, 5	21 6,5	23, 3	44 9,4	33, 8	319, ,11	22, 04
d.m.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CV(%)	33, 8	3,7	11, 8	47, 8	59, 5	10 5,2	45, 2a	38, 9	90, 3	63, 3	25, 7	62, 7	38, 8	75, 5	43, 58	56, 73

Os dados representam médias de quatro repetições de campo e de análises realizadas em duplicata. Médias seguidas de letras diferentes, nas colunas, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3.2 Avaliação Qualitativa da Microbiota do Solo

Na safra de verão de 2006/2007 um dos objetivos foi validar o procedimento metodológico, a amostragem e a análise do DNA do domínio Bactéria do solo por DGGE. Esse procedimento consistiu em analisar cada repetição, com a extração do DNA do solo e a análise por DGGE dessas amostras. A seguir, procedeu-se a extração e à análise do DNA de uma amostra composta de duas repetições e, finalmente, pela extração e análise do DNA de uma amostra composta das quatro repetições. Esse procedimento foi testado nas amostras e vários controles com perfis conhecidos foram incluídos, sendo possível observar que a análise por DGGE é sensível e a repetibilidade é elevada. Quando existe homogeneidade na área, essa é refletida em homogeneidade nos perfis de DNA, o que permite com que as amostras de cada repetição possam ser unidas, resultando em um padrão semelhante ao de todas as repetições. Segundo proposto por Souza et al. (2008a,b), estabelecendo-se a tolerância do programa Bionumerics em 5%, o nível de dissimilaridade máximo aceitável entre tratamentos deveria ser de 5%, o que também foi confirmado neste estudo.

Os resultados obtidos em todos os locais na safra 2006/2007, na avaliação realizada no PP e em R2, confirmaram que as áreas eram bastante homogêneas, uma vez que não foram constatadas diferenças superiores a 5% nos níveis de similaridade genética entre todos os tratamentos (Tabela 9).

Tabela 9 – Porcentagem de similaridade genética final obtida pela análise de agrupamento dos produtos obtidos por DGGE do DNA do domínio Bactéria do solo. Os valores são referentes às análises de agrupamento entre tratamentos em cada coleta e em cada local, no ensaio conduzido na safra 2006/2007.

Tratamentos	T1	T2	T3	T4	T5
Santo Antônio da Posse -SP- (EEA)					
Pré-plantio					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
R2					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
Ponta Grossa -PR- (SNT)					
Pré-plantio					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
R2					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
Londrina -PR- (CNPSo)					
Pré-plantio					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
R2					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
Uberaba -MG- (CTPP)					
Pré-plantio					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
R2					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
Sete Lagoas -MG- (CNPMS)					
Pré-plantio					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100

R2					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
Santo Antônio de Goiás -GO- (CNPAF)					
Pré-plantio					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
R2					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
Brasília -DF- (CNPH)					
Pré-plantio					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
R2					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100

Nos ensaios conduzidos na safrinha 2007, em Teresina (EMN), Sete Lagoas (CNPMS), Santo Antônio de Goiás (CNPAF) e Brasília (CNPH) também não foram detectadas diferenças entre os perfis de cada tratamento, em nenhuma das coletas analisadas (PP e R2), apresentando um nível de 100% de similaridade final entre os tratamentos (Tabela 10).

Em Vilhena (ER), não houve diferença nos níveis de similaridade genética entre os tratamentos com a soja Conquista e a Cultivance, contudo, os três primeiros tratamentos com essas cultivares diferiram daqueles com as cultivares Msoy 8001 e CD 217, nas coletas do PP e em R2. Desse modo, os resultados indicam diferenças causados pelos genótipos das plantas, mas não pela transgenia (Tabela 10).

Em Uberaba (CTTP) foram constatadas diferenças nos níveis de similaridade genética entre os tratamentos. No PP, os níveis de similaridade de todos os tratamentos foram distintos, indicativo de que a área não estava homogênea (Tabela 10). Na coleta R2, as diferenças nos níveis de similaridade genética entre os tratamentos foram menores do que no PP, indicando uma maior

homogeneidade, principalmente entre os tratamentos com a Conquista e a Cultivance, que apresentaram uma distância genética máxima de 80%. Nessa coleta, a similaridade genética entre os tratamentos T2 e T3, com soja Cultivance e Conquista tratadas com herbicida convencional foi elevada, de 90% (Tabela 10).

Tabela 10 – Porcentagem de similaridade genética final obtida pela análise de agrupamento dos produtos obtidos por DGGE do DNA do domínio Bactéria do solo. Os valores são referentes às análises de agrupamento entre tratamentos em cada coleta e em cada local, no ensaio conduzido na safreinha de 2007.

Tratamentos	T1	T2	T3	T4	T5
Teresina -PI- (EMN)					
Pré-plantio					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
R2					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
Vilhena -RO- (ER)					
Pré-plantio					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	75	75	75	100	
T5	78,6	78,6	78,6	80	100
R2					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	84,6	84,6	84,6	100	
T5	80	78,6	84,6	90,9	100
Uberaba -MG- (CTTP)					
Pré-plantio					
T1	100				
T2	69,2	100			
T3	71,4	81,8	100		
T4	80	64,3	78,6	100	
T5	66,7	52,9	64,7	82,4	100
R2					
T1	100				
T2	88,9	100			
T3	80	90	100		
T4	80	90	100	100	
T5	76,2	85,7	95,2	95,2	100
Sete Lagoas -MG- (CNPMS)					
Pré-plantio					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
R2					
T1	100				
T2	100	100			

T3	100	100	100			
T4	100	100	100	100		
T5	100	100	100	100	100	100
Santo Antônio de Goiás -GO- (CNPAP)						
Pré-plantio						
T1	100					
T2	100	100				
T3	100	100	100			
T4	100	100	100	100		
T5	100	100	100	100	100	100
R2						
T1	100					
T2	100	100				
T3	100	100	100			
T4	100	100	100	100		
T5	100	100	100	100	100	100
Brasília -DF- (CNPB)						
Pré-plantio						
T1	100					
T2	100	100				
T3	100	100	100			
T4	100	100	100	100		
T5	100	100	100	100	100	100
R2						
T1	100					
T2	100	100				
T3	100	100	100			
T4	100	100	100	100		
T5	100	100	100	100	100	100

Na safra de 2007/2008, em Santo Antônio da Posse (EEA), Vilhena (ER), Londrina (CNPSo), Santo Antônio de Goiás (CNPAP) e Brasília (CNPB) não foram encontradas diferenças qualitativas na comunidade de bactérias do solo que pudessem ser atribuídas às cultivares, ou aos herbicidas, ou às coletas, verificando-se que os tratamentos apresentaram entre si um nível de similaridade genética de 100% (Tabela 11).

Em Uberaba (CTTP), não foi constatada diferença nos níveis de similaridade genética no PP, entre os cinco tratamentos estudados. Contudo, em R2, o tratamento 5, com a variedade CD 217, apresentou perfil distinto dos demais (Tabela 11).

Em Sete Lagoas (CNPMS), foram constatadas diversas diferenças nos níveis de similaridade genética entre os tratamentos no pré-plantio e na coleta em R2, constatando-se que os tratamentos T1 e T2 diferiram dos demais (Tabela 11).

Tabela 11 – Porcentagem de similaridade genética final obtida pela análise de agrupamento dos produtos obtidos por DGGE do DNA do domínio Bactéria do solo. Os valores são referentes às análises de agrupamento entre tratamentos em cada coleta e em cada local, no ensaio conduzido na safra de 2007/2008.

Tratamentos	T1	T2	T3	T4	T5
Santo Antônio da Posse -SP- (EEA)					
Pré-plantio					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
R2					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
Vilhena -RO- (ER)					
Pré-plantio					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
R2					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
Londrina -PR- (CNPSo)					
Pré-plantio					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
R2					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
Uberaba -MG- (CTPP)					
Pré-plantio					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
R2					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	81,3	81,3	81,3	81,3	100
Sete Lagoas -MG- (CNPMS)					
Pré-plantio					
T1	100				
T2	72,7	100			
T3	90,9	80	100		
T4	81,8	88,9	90	100	
T5	90,9	80	100	90	100

R2					
T1	100				
T2	81,8	100			
T3	90	90,9	100		
T4	90	90,9	100	100	
T5	90	90,9	100	100	100
Santo Antônio de Goiás -GO- (CNPAF)					
Pré-plantio					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
R2					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
Brasília -DF- (CNPH)					
Pré-plantio					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100
R2					
T1	100				
T2	100	100			
T3	100	100	100		
T4	100	100	100	100	
T5	100	100	100	100	100

4.4 DISCUSSÃO

4.4.1 Efeito dos Herbicidas na Microbiota do Solo

Sabe-se que a biomassa microbiana é considerada um agente de transformação da matéria orgânica do solo e um reservatório lábil de nutrientes para as plantas. Essa biomassa microbiana, porém, pode sofrer mudanças causadas pela temperatura, umidade e aeração do solo, disponibilidade de nutrientes e pelos substratos orgânicos (BALOTA et al., 1998; FRANCHINI et al., 2007) provocando, assim, alterações nas taxas de ciclagem e disponibilidade de nutrientes (WANG et al. 2009). As determinações de biomassa microbiana do solo são, em geral, bastante sensíveis a alterações ambientais e a diferentes práticas agrícolas, razão pela qual existe uma forte tendência de utilização desses parâmetros em ensaios de avaliação de qualidade do solo, ou de monitoramento ambiental (BALOTA et al., 1998, 2003, 2004; BENDING et al., 2004; FRANCHINI et al., 2007; MENDES et al. 2003; SOUZA et al., 2008a,b; HUNGRIA et al., 2009; KASCHUK et al., 2010).

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam a sensibilidade dos parâmetros de biomassa microbiana às alterações edafo-climáticas e dão suporte a sua utilização em estudos de monitoramento ambiental, ou como bioindicadores de qualidade do solo. Houve, por exemplo, bastante sensibilidade para a detecção de diferenças entre os locais, em resposta a estresses hídricos e mesmo indicação de áreas experimentais pouco homogêneas. 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 (WARDLE; HUNGRIA, 1994; BALOTA et al., 1998; BALOTA et al., 2003; FRANCHINI et al., 2007; HUNGRIA, et al., 2009; SILVA et al., 2010).

Alguns trabalhos têm relatado que práticas culturais, como a aplicação de agrotóxicos, podem interferir diretamente na estrutura da comunidade microbiana do solo e naquela associada às raízes das plantas, tanto de forma negativa como positiva (KENNEDY, 1999; BUSSE et al. 2001; HANEY, SENSEMAN e HONS 2002; ARAÚJO, MONTEIRO e ABARKELI 2003; ZILLI et al. 2008). Contudo, nesse contexto, diversos 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, como por exemplo, os fungicidas (WARDLE, 1992; WARDLE; HUNGRIA, 1994; WARDLE, 1995; TOPP; VALLAEYS; SOULAS, 1997).

Uma proporção significativa dos herbicidas do grupo das imidazolinonas, quando aplicados nas lavouras, atinge o solo, onde são passíveis de serem absorvidos pelas raízes, sorvidos aos coloides do solo ou dissolvidos na sua solução, podendo sofrer fotólise, hidrólise, degradação microbiana ou lixiviação. Quando as condições ambientais favorecem ao desenvolvimento dos microrganismos, a degradação das imidazolinonas aumenta, sendo que o principal mecanismo de dissipação das imidazolinonas no solo é por meio da degradação microbiana (FLINT; WITT, 1997).

Neste trabalho, considerando os vinte ensaios conduzidos nos nove locais, nas três safras e em duas épocas de amostragem, não foram encontradas diferenças na BMC e na BMN que pudessem ser atribuídas ao uso dos herbicidas Imazapyr ou a mistura convencional de Bentazon + Acifluorfen-sódio. Zilli et al. (2008) também observaram que os herbicidas à base de glifosato e imazaquin não

ocasionaram alterações significativas no teor de BMC. Do mesmo modo, em condições de campo, Liphadzi et al. (2005) não detectaram alterações na BMC ao comparar a utilização do herbicida glifosato na dose de 1120 g i.a ha⁻¹ com outros herbicidas recomendados para a cultura de milho (*Zea Mays L.*) e soja. Já em outro trabalho realizado na Georgia e no Texas - EUA, Haney, Senseman e Hons (2002) chegaram a observar incremento significativo na BMC quando o glifosato foi adicionado na dosagem de 234 mg i.a kg⁻¹, em nove tipos de solos, com diferentes valores de pH e teores de carbono orgânico e argila. Segundo os autores solos com maior conteúdo de matéria orgânica tendem a mineralizar o glifosato mais rapidamente, possivelmente devido à maior biomassa microbiana. Na mesma linha de resultados, Kremer, Monteiro e Tornisielo (2005) afirmam que a aplicação de glifosato em plantas de soja promove aumento na quantidade e alterações na composição do material exsudado, o que pode aumentar a biomassa microbiana associada a essas plantas, possivelmente devido a uma fonte seletiva de C e N com altos níveis de carboidratos solúveis e aminoácidos em plantas de soja tratadas com glifosato. Contudo, no caso deste estudo, porém isso não foi observado para com o herbicida Imazapyr em comparação com a mistura convencional.

Pereira et al. (2008) observaram que a biomassa microbiana de solos com soja transgênica RR foi menor nos tratamentos submetidos à aplicação de endossulfan isolado e em mistura com glifosato, em comparação com aqueles submetidos à aplicação somente de glifosato isolado e com a testemunha. A biota do solo é capaz de metabolizar o glifosato, enquanto que, o endossulfan, em contato com o solo, pode formar endossulfan diol e sulfato de endossulfan, que apresentam alta toxicidade à comunidade microbiana do solo. Do mesmo modo, Li, Allen e Wollum (2004) observaram, em condições de campo, redução da biomassa microbiana do solo e da mineralização de compostos orgânicos com a aplicação do ingrediente ativo Imazapyr, pertencente ao grupo químico das imidazolinonas. A redução da biomassa microbiana pela aplicação de herbicidas como prosulfuron também foi sido demonstrada por outros autores (KINNEY; MANDERNACK; MOSIER, 2005; SANTOS et al. 2005).

No presente trabalho, as diferenças devidas aos locais dos experimentos e a estresses ambientais causou maior impacto à biomassa microbiana do que propriamente a aplicação dos herbicidas. Os efeitos dos herbicidas foram nulos quando comparados aos efeitos das áreas. De fato, conforme

observado por Wallis et al. (2010), dependendo do solo, da região, das condições de cultivo (a campo, em casa de vegetação, em vasos ou *in vitro*), das dosagens e da época de aplicação de herbicidas, pode ou não haver efeito do herbicida sobre o comportamento biológico do solo, bem como resíduos de herbicidas no solo. Em conclusão, os resultados obtidos nesta avaliação não indicam diferença entre o herbicida Imazapyr do grupo das imidazolinonas e do herbicida convencional (mistura Bentazon + Acifluorfen-sódio) utilizados nas doses de 70g i.a ha⁻¹ e na dosagem recomendada para cada região, respectivamente, na microbiota do solo. A ausência de efeito dos herbicidas pode estar relacionada a sua rápida adsorção no solo, pois estando adsorvidos aos colóides, a ação inibitória sobre os microrganismos fica reduzida.

4.4.2 Efeito da Transgenia na Microbiota do Solo

As plantas geneticamente modificadas podem expressar proteínas ou produtos do metabolismo que serão liberados pelos exsudatos radiculares e seus efeitos podem ser avaliados pelas alterações que ocorrem nos microrganismos da rizosfera (Ávila, 2007). No presente trabalho, em todos os ensaios avaliados não foi possível verificar efeito da transgenia na microbiota do solo.

Bohm e Rombaldi (2010) concluíram, após revisão de vários trabalhos, realizados em condições edafoclimáticas distintas dos ecossistemas de cultivo de soja no Brasil, que o efeito da soja geneticamente modificada resistente ao herbicida glifosato, sobre a microbiota de solos, tem gerado informações variáveis em função do tipo de solo e das condições de manejo. Verificaram-se ainda, que a aplicação desse herbicida pode, em alguns casos, estimular ou inibir o processo de mineralização de compostos orgânicos no solo. No caso de inibição, os efeitos tóxicos do glifosato sobre microrganismos do solo provavelmente se devem à ação dessa molécula sobre a enzima EPSPS dos microrganismos. De modo geral, os trabalhos analisados apresentaram algumas características comuns, como por exemplo, analisaram poucas variáveis a partir de simulação com ensaios em casa de vegetação ou *in vitro*. Nessa compilação de dados, observou-se que a transformação genética não afeta os microrganismos do solo.

Em contraste, Dunfield e Germida (2004), relatam que a comunidade microbiana do solo pode ser alterada quando associada com plantas transgênicas.

Segundo os autores, existe a possibilidade de que os transgenes possam ser transferidos para os microrganismos nativos do solo através da transferência horizontal de genes, além disso, novas proteínas podem ser liberadas a partir de plantas transgênicas para o ecossistema do solo e sua presença pode influenciar a biodiversidade da comunidade microbiana por estimular seletivamente o crescimento de organismos. No entanto, esses efeitos são menores em comparação com os efeitos proporcionados por fatores como o solo, local, clima e data de amostragem.

Segundo Ávila (2007), a interação microrganismo-planta em diferentes estádios fenológicos e tipos de solo deve ser considerada, dadas as diferenças no comportamento dos produtos da transgenia sobre esses fatores. Nesse mesmo estudo, o autor demonstrou diferenças no número de bactérias associadas às raízes da planta de algodão (*Gossypium sp.*) Bt e do algodão (*Gossypium sp.*) não-Bt, apenas nos estádios iniciais de desenvolvimento da cultura. Na rizosfera do algodão Bt foram observadas maiores densidades de *Pseudomonas spp.* e bactérias totais nas fases de estabelecimento e formação do botão floral, respectivamente, em relação ao algodão convencional. Dessa forma, a planta transgênica estaria estimulando o crescimento de alguns grupos bacterianos da rizosfera, nos estádios iniciais do desenvolvimento da planta.

Em um trabalho realizado por Dunfield e Germida (2001), com variedades de canola geneticamente modificada, uma resistente ao glifosato e três resistentes ao glufosinato de amônio, em comparação com quatro variedades não transgênicas, em quatro regiões no Canadá, relataram que nenhuma das variedades de canola afetou significativamente o número total de unidades formadoras de colônia da rizosfera. Entretanto, esses autores observaram que a variedade transgênica resistente ao glifosato (Quest) apresentou uma comunidade microbiana, associada a sua rizosfera diferente das outras (transgênicas e não transgênicas). No entanto, as mudanças foram temporárias e não persistiram nas avaliações posteriores (DUNFIELD; GERMIDA, 2003). Outros estudos também relatam o aumento da microbiota em solo cultivado com plantas transgênicas em relação a plantas convencionais (DONEGAN et al. 1995; WEI et al. 2006).

Os resultados deste estudo estão, provavelmente, entre os mais abrangentes em termos de número de avaliações e indicam que a transgenia para o gene *ahas* nas condições edafoclimáticas de oxissóis em regiões tropicais e subtropicais não causaram diferenças significativas na BMC e na BMN.

4.4.3 Avaliação Qualitativa da Microbiota do Solo pelo Método do DGGE

O uso de técnicas mais refinadas baseadas na extração direta e análise do DNA provenientes de amostras de solo têm demonstrado que o impacto sobre a comunidade microbiana pode ser expressivo. Um método para análise da comunidade microbiana de amostras ambientais é o DGGE (gel com gradiente desnaturante), que através da separação de fragmentos de DNA, pode elucidar o efeito da transgenia na comunidade microbiana do solo.

Em um estudo realizado por Zilli et al. (2007), comparando os efeitos de herbicidas à base de glifosato, imazaquin e trifluralin na comunidade bacteriana associada ao rizoplane de soja, os autores observaram que o imazaquin alterou o perfil bacteriano analisado por DGGE de forma mais intensa que o glifosato. Em um outro trabalho de Zilli et al. (2008), os autores observaram que os herbicidas à base de glifosato e imazaquin ocasionaram alterações na comunidade bacteriana associada ao rizoplane de soja em todas as coletas realizadas (14, 30 e 62 dias após a aplicação dos herbicidas), alterações estas também detectadas por meio dos perfis eletroforéticos de DGGE.

Nesse estudo, observou-se que não houve qualquer efeito diferencial entre os herbicidas, ou da transgenia na comunidade bacteriana do solo, utilizando a técnica de DGGE para o domínio Bactéria. Foram constatadas diferenças nos perfis de DGGE, atribuídas à época de amostragem, pela comparação dos resultados obtidos em PP e em R2. Também foi verificada diferença em caso de falta de homogeneidade da área, por exemplo, em Sete Lagoas (CNPMS) na safra de 2007/2008. Diferenças entre os locais foram as mais abundantes. Finalmente, foram observadas diferenças entre os materiais genéticos, por exemplo, entre as cultivares Conquista e a Cultivance, em relação às cultivares Msoy 8001 e CD 217, na safrinha de 2007. Essas diferenças podem ser explicadas pelo efeito da rizosfera de diferentes cultivares, que podem exsudar compostos distintos, que alterarão a composição da microbiota do solo, também já relatado por outros autores (Gomes et al., 2001; Milling et al., 2004). Estudos de campo realizados por Heuer et al. (2002), em duas áreas distintas, por três anos, com plantas de batata transgênica T4-lisozima com fragmentos amplificados do gene *16rRNA*, provenientes do DNA extraído da rizosfera, pela técnica de DGGE, confirmaram que parâmetros como a cultivar, o tipo de solo, as mudanças climáticas

sazonais e a idade da planta podem ser mais expressivos na microbiota do solo do que a transgenia. Contudo, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a transgenia e os herbicidas não afetaram qualitativamente a microbiota do solo.

Em Uberaba, foi observada pequena diferença entre os tratamentos, na safrinha 2007, estimada em 10% de dissimilaridade genética entre a cultivar Conquista e a Cultivance tratadas com herbicida convencional na avaliação realizada em R2, e uma dissimilaridade ainda mais elevada entre os tratamentos foi constatada no pré-plantio. Uma explicação para isso seria que no florescimento, ocorre exsudação máxima na rizosfera, uma vez que a biota do solo é estimulada pelos exsudatos das plantas. As raízes das plantas influenciam fortemente a disponibilidade de C e N na rizosfera via rizodeposição e absorção de nutrientes (KORANDA et al., 2011), o que pode alterar a composição bacteriana. Entretanto, essa diferença entre os tratamentos pode ser atribuída à variabilidade da área e não por um efeito da transgenia ou dos herbicidas.

Shen et al. (2006), também não constataram efeitos na atividade da comunidade microbiana avaliada nas fases vegetativa, reprodutiva, de senescência e após a colheita na rizosfera do algodão Bt em relação ao algodão não-Bt. Após revisão de vários trabalhos Bruinsma et al. (2003) concluíram que a maioria das plantas transgênicas não foi capaz de causar efeito significativo da transgenia na biota do solo. Por exemplo, nenhum efeito de plantas geneticamente modificadas foi encontrado na população de fungos micorrízicos da espécie *Glomus mosseae* associada a plantas de tabaco. Wei et al. (2006) verificaram aumento da comunidade bacteriana em solo sob cultivo de mamão transgênico resistente à mancha-anelar (*Papaya ringspot virus* -PRSV).

Em um estudo realizado por Knupp et al. (2009) com feijoeiro geneticamente modificado resistente ao *Bean Golden Mosaic Vírus*, BGMV (Olathe M1-4) e com plantas convencionais (Olathe Pinto), os autores observaram que os agrupamentos obtidos dos perfis de 16S rDNA por DGGE indicaram alterações na comunidade bacteriana associada às raízes das plantas nos estádios V4 e R6 do desenvolvimento da planta.

Segundo Knupp et al. (2009), o monitoramento constante ao longo do ciclo de cultivo de plantas geneticamente modificadas é necessário para verificar se as alterações ocorridas na comunidade microbiana da rizosfera e do solo são mantidas ao longo do ciclo da planta. Milling et al. (2004) observaram efeitos

variáveis nos perfis da comunidade bacteriana entre os estágios de desenvolvimento da planta. Os resultados obtidos nesse trabalho também são consistentes em demonstrar que não houve efeito da transgenia. Conseqüentemente, os dados obtidos neste trabalho, com a obtenção de perfis da comunidade bacteriana (16S *rDNA*) analisados por DGGE, complementam as informações obtidas com a avaliação da biomassa microbiana, relacionadas aos efeitos da transgenia e dos herbicidas sobre a microbiota do solo. Os resultados confirmam que não houve efeito da soja transgênica resistente a herbicidas do grupo das imidazolinonas sobre a comunidade microbiana do solo nos nove locais, nas três safras e nas duas épocas avaliadas. Os resultados obtidos, porém, não se descartam a possibilidade de que estudos mais aprofundados com técnicas mais avançadas de biologia molecular possam indicar diferenças, e estudos dessa natureza devem ser estimulados, visando obter sempre maior compreensão dos efeitos do transgene relacionados com os aspectos funcionais da microbiota do solo.

4.5 CONCLUSÕES

1. A transgenia com o gene *ahas* de tolerância ao herbicida Imazapyr do grupo das imidazolinonas na variedade Cultivance não afetou quantitativamente a microbiota do solo, quando comparada com a parental Conquista.

2. Não foi constatado efeito do herbicida Imazapyr do grupo das imidazolinonas, nas doses de 70g i.a. ha⁻¹, na microbiota do solo, em comparação com o manejo com o herbicida convencional (mistura Bentazon + Acifluorfen-sódio).

3. Não houve efeito da transgenia, ou entre os diferentes herbicidas na estrutura genética da comunidade bacteriana do solo, avaliada pela análise do gene 16S rDNA do domínio Bactéria do DNA do solo pelo método do DGGE.

REFERÊNCIAS

- 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.
- ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R.T.R.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, v.52, p.799-804, 2003.
- 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.
- ASAO, H.; ARAI, S.; NISHIZAWA, Y. Environmental risk evaluation of transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene. **Seibutsu-Kogaki Kaishi**, v.81, p.57-63, 2003.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4.ed. California: Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1997. 694p.
- AVILA, L.A. **Efeitos do algodão Bt (Bollgard Evento 531) na comunidade bacteriana da rizosfera**. 2007. 90p (Dissertação de mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 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.; DICK, R.P. Long-term tillage and crop rotation effects on microbial biomass and C and N mineralization in a Brazilian Oxisol. **Soil and Tillage Research**, v.77, p.137-145, 2004.
- 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.
- BARRETO, P.A.B.; GAMA-RODRIGUES, E.F.; GAMA-RODRIGUES, A.C.; BARROS, N.F.; FONSECA, S. Atividade microbiana, carbono e nitrogênio da biomassa microbiana em plantações de eucalipto, em seqüência de idades. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.611-619, 2008.
- 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.
- BENDING, G.D.; TURNER, M.K.; RAYNS, F.; MARX, M.C.; WOOD, M. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, p.1785–1792, 2004.

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

BOHM, G.M.B.; ROMBALDI, C.V. Transformação genética e aplicação de glifosato na microbiota do solo, fixação biológica de nitrogênio, qualidade e segurança de grãos de soja geneticamente modificada. **Ciência Rural**, v.40, p.213-221, 2010.

BORÉM, A. Variedades transgênicas e meio ambiente. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.1, p.91-99, 2005.

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

BRIGHENTI, A.M.; ADEGAS, F.S.; BORTOLUZI, E.S.; ALMEIDA, L.A.; VOLL, E. Tolerância de genótipos de soja aos herbicidas trifluralin e imazaquin. **Planta Daninha**, v.20, p.63-69, 2002.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. Global impact of biotech crops: Environmental effects, 1996-2008. **AgBioForum**, v.13, p.76-94, 2010.

BROOKES, P.C.; KRAGT, J.F.; POWLSON, D.S.; JENKINSON, D.S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen. **Soil Biology and Biochemistry**, v.17, p.831-835, 1985a.

BROOKES, P.C.; KRAGT, J.F.; POWLSON, D.S.; JENKINSON, D.S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.17, p.837-847, 1985b.

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.

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

BUSSE, M.D.; RATCLIFF, G.A.; SHESTAK, C.J.; POWERS, R.F. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control and soil on soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p.1777-1789, 2001.

CALEGARI, A. Leguminosas para adubação verde no Paraná. Londrina : IAPAR, 1995. 118p. (IAPAR. Circular, 80).

CAPALBO, D.M.F.; VILAS-BÔAS, G.T.; ARANTES, O.M.N.; SUZUKI, M.T. *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.34, p.78-85, 2005.

CARDOSO, E.L.; SILVA, M.L.N.; MOREIRA, F.M.S.; CURI, N. Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em pastagem cultivada e nativa no Pantanal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.631-637, 2009.

CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; SOARES, A.L.L. Carbono orgânico, nitrogênio total, biomassa e atividade microbiana do solo em duas cronosseqüências de reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p. 621-632, 2008.

CASTALDINI, M.; TURRINI, A.; SBRANA, C. Impact of Bt corn on rhizospheric and on beneficial mycorrhizal symbiosis and soil eubacterial communities in experimental microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.6719-6729, 2005.

CATTELAN, A.J.; GAUDÊNCIO, C.A.; SILVA, T.A. Sistemas de rotação de culturas em plantio direto e os microrganismos do solo, na cultura da soja, em Londrina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.21, p.293-301, 1997.

CELLINI, F.; CHESSON, A.; COLQUHOUN, I.; CONSTABLE, A.; DAVIES, H.V.; ENGEL, K.H.; GATEHOUSE, A.M.R.; KARENLAMPI, S.; KOK, E.J.; LEGUAY, T.J.; LEHESRANTA, S.; NOTEBORN, H.P.J.M.; PEDERSEN, J.; SMITH, M. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. **Food and Chemical Toxicology**, v.42: p.1089-1125, 2004.

CERRI, C.C.; VOLKOFF, B.; EDUARDO, B.P. Efeito do desmatamento sobre a biomassa microbiana em Latossolo amarelo na Amazônia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.9, p.1-4, 1985.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos – safra 2010/2011**, décimo levantamento – julho/2011. Brasília: CONAB, 2011.

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

DE-POLLI, H.; GUERRA, J.G.M. Carbono, nitrogênio e fósforo na biomassa microbiana do solo. In: SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A. de O., eds. **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Gênese, 1999. p.389-411.

DESCALZO, R.D.; PUNJA, Z.K.; LÉVESQUE, C.A.; RAHE, J.E. Glyphosate treatment of bean seedlings causes short- term increases in *Pythium* populations and damping off potential in soils. **Applied Soil Ecology**, v.8, p.25-33, 1998.

DÍAZ-RAVIÑA, M.; ACEA, M.J.; CARBALLAS, T. Microbial biomass and its contribution to nutrient in forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.25, p.25-31, 1993.

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

DORAN, J.W.; PARKIN, T.B. Quantitative indicators of soil quality: a minimum data set. In: DORAN, J.W.; JONES, A.J. Methods for assessing soil quality. **Soil Science Society of America**, 1996. p.27-31.

DRINKWATER, L.E.; SNAPP, S.S. Nutrients in agroecosystems: rethinking the management paradigm. **Advances in Agronomy**, v.92, 163-186, 2007.

DUNFIELD, K.E.; GERMIDA, J.J. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. **FEMS Microbiological Ecology**, v. 38, p.1-9, 2001.

DUNFIELD, K.E.; GERMIDA, J.J. Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities. **Journal of Environmental Quality**, v.38, p.806-815, 2004.

DUNFIELD, K.E.; GERMIDA, J.J. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p. 7310-7318, 2003.

FANG, M.; KREMER, R.J.; MOTAVALLI, P.P.; DAVIS, G. Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.4132-4136, 2005.

FEHR, W. R. AND CAVINESS, C. E. 1977. Stages of soybean development. Ames, IA. **Agriculture and Home Economics Experiment Station**, Iowa State University of Science and Technology, 1977 (Special report, 80).

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

FERREIRA, E.A.B.; RESCK, D.V.S.; GOMES, A.C.; RAMOS, M.L.G. Dinâmica do carbono da biomassa microbiana em cinco épocas do ano em diferentes sistemas de manejo do solo no cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1625-1635, 2007.

FERREIRA, E.P. de B.; DUSI, A.N.; COSTA, J.R.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Assessing insecticide and fungicide effects on the culturable soil bacterial community by analyses of variance of their DGGE fingerprinting data. **European Journal of Soil Biology**, v.45, p.466-472, 2009.

FIGUEIREDO, C.C.; RESCK, D.V.S.; GOMES, A.C.; FERREIRA, E.A.B.; RAMOS, M.L.G. Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana em resposta a diferentes sistemas de manejo em um latossolo vermelho no cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.551-562, 2007.

FLINT, J. L.; WITT, W. W. Microbial degradation of imazaquin and imazethapyr. **Weed Science**, v. 45, p. 586-591, 1997.

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

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 and Tillage Research**, v.92, p.18-29, 2007.

FRANZ, J.E. Discovery, development and chemistry of glyphosate. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths & Co. Ltda., 1985. p. 3-17.

FRAZÃO, L.A.; PICCOLO, M.C.; FEIGL, B.J.; CERRI, C.C.; CERRI, C.E.P. Inorganic nitrogen, microbial biomass and microbial activity of a sandy Brazilian Cerrado soil under different land uses. **Agriculture, Ecosystems and Environmental**, v.135, p.161-167, 2010.

FUKA, M.M.; ENGEL, M.; HAGN, A.; MUNCH, J.C.; SOMMER, M.; SCHLOTTER, M. Changes of diversity pattern of proteolytic bacteria over time and space in an agricultural soil. **Microbial Ecology**, v. 57, 391-401, 2009.

GAMA-RODRIGUES, E.F.; BARROS, N.F.; GAMA-RODRIGUES, A.C.; SANTOS, G.A. Nitrogênio, carbono e atividade da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.393-901, 2005.

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.

GERALDES, A.P.A.; CERRI, C.C.; FEIGL, B.J. Biomassa microbiana de solo sob pastagens na Amazônia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.19, p.55-60, 1995.

GIANOTTO, D.; FEITOZA, L.; COLLET, T.; GASPAR, V. **Alimentos transgênicos**. Disponível em: <<http://www.dbi.uem.br/transgênicos.pdf>>. Acesso: 13 de abril de 2010.

GILLER, K.E. **Nitrogen fixation in tropical cropping systems**. 2nd ed. Wallingford: CAB International, 2001. 448p.

GOMES, N.C.M.; HEUER, H.; SCHONFELD, J.; COSTA, R.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, v.232, p.167-180, 2001.

GRIFFITHS, B.S.; CAUL, S.; THOMPSON, J.; NICHOLAS, A.; BIRCH, E.; SCRIMGEOUR, C.; CORTET, J.; FOGGO, A.; HACKETT, C.A.; KROGH, P.H. Soil microbial and faunal community responses to Bt maize and insecticide in two soils. **Journal of Environmental Quality**, v.35, p.734-741, 2006.

GRUYS, K.J.; SIKORSKI, A. Inhibitors of tryptophan, phenylalanine, and tyrosine biosynthesis as herbicides. In: SINGH, B.K. (ed.). **Plant amino acids - biochemistry and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999. p.357-365.

HALL, L.; TOPINKA, K.; HUFFMAN, J.; DAVIS, L.; GOOD, A. Pollen flow between herbicide-resistant *Brassica napus* is the cause of multiple-resistant *B. napus* volunteers. **Weed Science**, v.48, p.688-694, 2000.

HANEY, R.L.; SENSEMAN, S.A.; HONS, F. M. Bioremediation and Biodegradation: Effect of Roundup Ultra on Microbial Activity and Biomass from Selected Soils. **Journal of Environmental Quality**, v.31, p.730-735, 2002.

HANEY, R.L.; SENSEMAN, S.A.; HONS, E.M.; ZUBERER, D.A. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. **Weed Science**, v.48, p.89-93, 2000.

HAWES, M.C.; BRIGHAM, L.A. Impact of root border cells of microbial populations in the rhizosphere. **Advances in Plant Pathology**, v.8, p.119-149, 1992.

HELGASON, B.L.; WALLEY, F.L.; GERMIDA, J.J. Long-term no-till management affects microbial biomass but not community composition in Canadian prairie agroecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v.42, p.2192-2202, 2010

HENROT, J.; ROBERTSON, G.P. Vegetation removal in two soils of the humid tropics: effect on microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.111-116. 1994.

HEUER, H.; KROPPESTED, T.R.M.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1325-1335, 2002.

HEUER, H.; SMALLA, K. Application of denaturing gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: ELSAS, J.D. van; WELLINGTON, E.M.H.; TREVORS, J.T.; DEKKER, M. (Ed.). *Modern soil microbiology*. New York: Marcel Dekker Publisher, 1997. p. 353-373.

HILL, J.E.; BREIDENBACH, R.W. Proteins of soybean seeds. II. accumulation of the major protein components during seed development and maturation. **Plant Physiology**, v.53, p.747-751, 1974

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. 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.; FRANCHINI, J.C.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; KASCHUK, G.; SOUZA, R.A. Soil microbial activity and crop sustainability in a long-term experiment with three soil-tillage and two crop-rotation systems. **Applied Soil Ecology**, v.42, p.288-296, 2009.

JAKELAITIS, A.; SANTOS, J.B.; VIVIAN, R.; SILVA, A.A. Atividade microbiana e produção de milho (*Zea mays*) e de *Brachiaria brizantha* sob diferentes métodos de controle de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v.25, p.71-78, 2007.

JAMES, C. **Global status of commercialized Biotech/GM crops: 2010**. Ithaca: ISAAA, 2010. 16 p.

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

JAWORSKI, E.G. Mode of action of N-phosphonomethylglycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.20, p.1195-1198, 1972.

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.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Quantifying effects of different agricultural land uses on soil microbial biomass and activity in Brazilian biomes: inferences to improve soil quality. **Plant and Soil**, v.338, p.467-481, 2011.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology and Biochemistry**, v.42, p.1-13, 2010.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v.74, p.65-76, 1999.

KINNEY, C. A.; MANDERNACK, K. W.; MOSIER, A. R. Laboratory investigations into the effects of the pesticides mancozeb, chlorothalonil, and prosulfuron on nitrous oxide and nitric oxide production in fertilized soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 837-850, 2005.

KNUPP, A.M., MARTINS, C.M.; FARIA, J.C.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. Comunidade bacteriana como indicadora do efeito de feijoeiro geneticamente modificado sobre organismos não alvo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.1692-1699, 2009.

KORANDA, M.; SCHNECKER, J.; KAISER, C.; FUCHSLUEGER, L.; KITZLER, B.; STANGE, C.F.; SESSITSCH, A.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; RICHTER, A. Microbial processes and community composition in the rhizosphere of European beech and the influence of plant C exudates. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, p.551-558, 2011.

KOWALCHUK, G.A.; BRUINSMA, M.; VAN VEEN, J.A. Assessing responses of soil microorganisms to GM plants. **Trends in Ecology and Evolution**, v.18, p.403-410, 2003.

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.

KRAEMER, A.F.; MARCHESAN, E.; AVILA, L.A.; MACHADO, S.L.O.; GROHS, M. Destino ambiental dos herbicidas do grupo das imidazolinonas - revisão. **Planta Daninha**, v.27, p.629-639, 2009.

KREMER, R.J.; MEANS, N.E.; KIM, S. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere microorganisms. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v.85, p.1165-1174, 2005.

KREMER, R. J.; MONTEIRO, R. T. R.; TORNISIELO, V.L. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere microorganisms. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 85, p.1165-1174, 2005.

LACERDA, A.L.S. **Plantas Transgênicas**. Artigo em Hypertexto, 2006. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/transgenicos/index.htm>. Acesso em: 11/4/2011.

LI, Q.; LEE, A.H.; WOLLUM LI, A.G. Microbial biomass and bacterial functional diversity in forest soils: Effects of organic matter removal, compaction, and vegetation control. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, p.571-579, 2004.

LIPHADZI, K.B.; AL-KHATIB, K.; BENSCH, C.N.; STAHLMAN, P.W.; DILLE, J.A.; TODD, T.; RICE, C.W.; HORAK, M.J.; HEAD, G. Soil microbial and nematode communities as affected by glyphosate and tillage practices in a glyphosate-resistant cropping system. **Weed Science**, v.53, p.536-545, 2005.

MARCHIORI JÚNIOR, M. **Carbono, nitrogênio e biomassa microbiana e atividade enzimática num solo sob mata natural ou cultivado com pastagem ou algodoeiro**. 1998. 70p. (Dissertação de Mestrado). UNESP-FCAV, Jaboticabal.

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

MENDES, I.C.; CARNEIRO, R.G.; CARVALHO, A.M.; VIVALDI, L.; VARGAS, M.A.T. **Biomassa de C e atividade microbiana em solos de cerrados sob plantio direto e plantio convencional**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1999, 5p.

MENDES, I.C.; SOUZA, L.V.; RESCK, D.V.S.; GOMES, A. C. Propriedades biológicas em agregados de um LE sob plantio convencional e direto no cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.435-443, 2003.

MENDONÇA, E.S.; LEITE, L.F.C. Modelagem matemática e simulação da dinâmica da matéria orgânica do solo. In: ROSCOE, R.; MERCANTE, F.M.; SALTON, J.C. eds. **Dinâmica da material orgânica do solo em sistemas conservacionistas**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. p.75-106.

MERCANTE, F.M.; FABRICIO, A.C.; GUIMARÃES, J.B.R. **Biomassa microbiana como parâmetro indicador da qualidade do solo sob diferentes sistemas de manejo**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2000. 5p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Comunicado Técnico, 27).

MILLING, A.; SMALLA, K.; MAIDL, F.X.; SCHLOTTER, M.; MUNCH, J.C. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. **Plant and Soil**, v.266, p.23-39, 2004.

MINOSHIMA, H.; JACKSON, L.E.; CAVAGNARO, T.R.; SÁNCHEZ-MORENO, S.; FERRIS, H.; TEMPLE, S.R.; GOYAL, S.; MITCHELL, J.P. Soil food webs and carbon dynamics in response to conservation tillage in California. **Soil Science Society of America Journal**, v. 71, 952-963, 2007.

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.38: p.816-824, 2004.

MURUGANANDAM, S.; ISRAEL, D.W.; ROBARGE, W.P. Activities of nitrogen-mineralization enzymes associated with soil aggregate size fractions of three tillage systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 73, 751-759, 2010.

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.

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

OADES, J.M.; JENKINSON, D.S. Adenosine-triphosphate content of the soil microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v.11, p.201-204, 1979.

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 JR., R.S.; DVORANEN, E.C., CONSTANTIN, J.; CAVALIERI, S.D.; FRANCHINI, L.H.M.; RIOS, F.A.; BLAINSKI, E. Influência do glyphosate sobre a nodulação e o crescimento de cultivares de soja resistente ao glyphosate. **Planta Daninha**, v.26, p.831-843, 2008.

OLIVEIRA, T.A.; SANTOS, J.B.; CAMELO, G.N.; BOTELHO, R. G.; LÁZARI, T.M. Efeito da interação do nicosulfuron e chlorpyrifos sobre o banco de sementes e os atributos microbianos do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, p.563-570, 2009.

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.

PEREIRA, J.L.; PICANÇO, M.C.; SILVA, A.A.; SANTOS, E.A.; TOMÉ, H.V.V.;

OLARTE, J.B. Effects of glyphosate and endosulfan on soil microorganisms in soybean crop. **Planta Daninha**, v.26, p.825-830, 2008.

PETTER, F. A.; CARGNELUTTI FILHO, A.; BARROSO, A.L.L.; PACHECO, L.P. Manejo de herbicidas na cultura da soja Roundup Ready. **Planta Daninha**, v. 25, p. 557-566, 2007.

POWLSON, D.S.; BROOKES, P.C.; CHRISTENSEN, B.T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.159-164, 1987.

RASCHE, F.; HODL, V.; POLL, C.; KANDELER, E. GERZABEK, M.H.; VAN ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes,

vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, v.56, p.219-235, 2006.

REDDY, K.N.; ZABLOTOWICZ, R.M. Glyphosate-resistant soybean response to various salts of glyphosate and glyphosate accumulation in soybean nodules. **Weed Science**, v.5, p.496-502, 2003.

REIS, M.R.; SILVA, A.A.; FREITAS, M.A.M.; PEREIRA, J.L.; COSTA, M.D.; PICANÇO, M.C.; FERREIRA, E.A.; BELO, A.F.; COELHO, A.T.C.P.; SILVA, G.R. Impacto do glyphosate associado a inseticida e fungicida na atividade microbiana e no potencial de solubilização de fosfato em solo cultivado com soja roundup ready. **Planta Daninha**, v.27, p.729-737, 2009.

SALTON, J.C. **Biofuncionamento e sustentabilidade do solo em diferentes agroecossistemas no estado do Mato Grosso do Sul**. 2005. 166f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SANTOS, J.B.; FERREIRA, E.A.; REIS, M.R.; SILVA, A.A.; FIALHO, C.M.T.; FREITAS, M.A.M. Avaliação de formulações de glyphosate sobre soja roundup ready. **Planta Daninha**, v.25, p.165-171, 2007

SANTOS, J.B.; JAKELAITIS, A.; SILVA, A.A.; VIVIAN, R.; COSTA, M.D.; SILVA, A.F. Atividade microbiana do solo após aplicação de herbicidas em sistemas de plantio direto e convencional. **Planta Daninha**, v. 23, p. 683-691, 2005.

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

SAXENA, D.; FLORES, S.; STOTZKY, G. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. **Nature**, v.402: p.480, 1999.

SHANER, D.L.; SINGH, B.K. Phytotoxicity of acetohydroxyacid synthase inhibitors is not due to accumulation of 2-ketobutyrate and/or 2-aminobutyrate. **Plant Physiology**, v.103, p.1221-1226, 1993.

SHEN, R.F.; CAI, H.; GONG, W.H. Transgenic Bt cotton has no apparent effect on enzymatic activities or functional diversity of microbial communities in rhizosphere soil. **Plant and Soil**, v.285, p.149-159, 2006.

SILVA, R.R.; SILVA, M.L.N.; CARDOSO, E.L.; MOREIRA, F.M.S.; CURI, N. ALOVISI, A. M. T. Biomassa e atividade microbiana em solo sob diferentes sistemas de manejo na região fisiográfica campos das vertentes – Mg. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p. 1585-1592, 2010.

SILVA, A. P.; FRANCHINI, J. C. ; BABUJIA, L. C. ; SOUZA, R. A. ; HUNGRIA, M. Microbial biomass under different soil and crop managements in short- to long-term experiments performed in Brazil. **Field Crops Research**, v. 119, p. 20-26, 2010.

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, 2002. p.153-190.

- SMITH, J.L.; PAUL, E.A. The significance of soil microbial biomass estimations. In: BOLLAG, J.; STOTZKY, D.G., eds. **Soil Biochemistry**. New York: M. Dekker, 1990. v.6, p.357-396.
- SOUZA, E.D.; COSTA, S.E.V.G.A.; ANGHINONI, I.; LIMA, C.V.S.; CARVALHO, P.C.F.; MARTINS, A.P. Biomassa microbiana do solo em sistema de integração lavoura-pecuária em plantio direto, submetido a intensidades de pastejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.79-88, 2010.
- SOUZA, R.A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CHUEIRE, L.M.O.; BARCELLOS, F.G.; CAMPO, R.J. Avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p. 71-82, 2008a.
- SOUZA, R.A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; MACIEL, C.D.; CAMPO R.J.; ZAIA, D.A.M. Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.83-91, 2008b.
- SPRANKLE, P.; MEGGITT, W.F.; PENNER, D. Absorption, action, and translocation of glyphosate. **Weed Science**, v.23, p.235-240, 1975.
- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**. San Francisco, CA: Freeman, 1973. 573p.
- TAN, S.; EVANS, R.; SINGH, B. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. **Amino Acids**, v.30, p.195-204, 2006.
- TERADA, R. Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. **Nature Biotechnology**, v.20, p.1030-1034, 2002.
- 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.
- 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.
- TOZZINI, A.C. Detección de OGMs en la cadena agroalimentaria. In ECHENIQUE, V. **Biocnologia y mejoramiento vegetal**. Buenos Aires: INTA, 2004. p.409-4424.
- TRANNIN, I.C.B.; SIQUEIRA, J.O; MOREIRA, F.M.S. Características biológicas do solo indicadoras de qualidade após dois anos de aplicação de biossólido industrial e cultivo de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1173-1184, 2007.
- TUFFI SANTOS, L. D.; FERREIRA, F.A.; BARROS, N.F.; SIQUEIRA, C.H.; SANTOS, I.C.; MACHADO, A.F.L. Exsudação radicular do glyphosate por *Brachiaria decumbens* e seus efeitos em plantas de eucalipto e na respiração microbiana do solo. **Planta Daninha**, v. 23, p.143-152, 2005.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Production, supply and distribution** Disponível em:

<<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Acesso em: 27 jul. 2011.

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

VAN GESTEL, M.; LADD, J.N.; AMATO, M. Microbial biomass responses to seasonal change and imposed drying regimes at increasing depths of undisturbed topsoil profiles. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, p.103-111, 1992.

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.

VENZKE FILHO, S.P.; FEIGL, B.J.; PICCOLO, M.C.; SIQUEIRA NETO, M. ; CERRI, C.C. Biomassa microbiana do solo em sistema de plantio direto na região de Campos Gerais - Tibagi, PR. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.599-610, 2008.

VILELA, L.; MACEDO, M.C.M.; MARTHA JÚNIOR, G.B.; KLUTHCOUSKI, J. Benefícios da integração lavoura-pecuária. In: KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L.F.; AIDAR, H., eds. **Integração lavoura-pecuária**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003. p.144-170.

WAKELIN, S.A.; MACDONALD, L.M.; ROGERS, S.L.; GREGG, A.L.; BOLGER, T.P.; BALDOCK, J.A. Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, p.803–813, 2008.

WALLIS, P.D.; HAYNES, R.J.; HUNTER, C.H.; MORRIS, C.D. Effect of land use and management on soil bacterial biodiversity as measured by PCR-DGGE. **Applied soil Ecology**, v.46, p.147-150, 2010.

WANG, Q.; ZHOU, D.; CANG, L. Microbial and enzyme properties of apple orchard soil as affected by long-term application of copper fungicide. **Soil Biology and Biochemistry**, v.41, p.1504-1509, 2009.

WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. **Plant and Soil**, v. 122, n. 1, p. 21-28, 1990.

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.; 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. 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.

WEAVER, M. A. Effects of glyphosate on soil microbial communities and its mineralization in a Mississippi soil. **Pest Management Science**, v.63, p.388-393, 2007.

WEI, L.; HAO, H.L.; WEIXIANG W.; QI, K.W.; YING X. C.; JANICE, E. T. Transgenic Bt rice does not affect enzyme activities and microbial composition in the rhizosphere during crop development. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, p.475-486, 2008.

WEI, X.D.; ZOU, H.L.; CHU, L.M. LIAO, C.M.; LAN, C.Y. Field released transgenic papaya effects microbial communities and enzyme activities in soil. **Plant and soil**, v.285, p.347-358, 2006.

WILSON, H.D. Gene flow in squash species. **BioScience**, v.40, p. 449-453, 1990.

WORTMANN, C.S.; QUINCKE, J.A.; DRIJBER, R.A.; MAMO, M.; FRANTI, T. Soil microbial community change and recovery after one-time tillage of continuous no-till. **Agronomy Journal**, v. 100, 1681-1686, 2008.

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

WU, W.X.; YE, Q.F.; MIN, H. Effect of straws from Bt-transgenic rice on selected biological activities in water-floodeal soil. **European Journal of Soil Biology**, v.40, p.15-22, 2004b.

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.

ZILLI, J. E.; BOTELHO, G. R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Efeito de glyphosate e imazaquin na comunidade bacteriana do rizoplano de soja (*Glycine max (L.) Merrill*) e em características microbiológicas do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.633-642, 2008.

ZILLI, J.E.; SMIDERLE, O.J.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. População microbiana em solo cultivado com soja e tratado com diferentes herbicidas em área de cerrado no estado de Roraima. **Acta Amazônica**, v.37, p.201-212, 2007.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação do impacto ambiental de transgênicos permanece com muitas questões a se resolver. Diante dos resultados deste estudo, pode-se concluir que não houve efeito da soja transgênica para resistência a herbicidas (gene *ahas*) e dos herbicidas Imazapyr do grupo das imidazolinonas na biomassa microbiana de carbono e de nitrogênio, bem como na avaliação qualitativa da comunidade bacteriana do solo, realizada pelo método do DGGE. Foi possível, ainda, observar que tanto a avaliação quantitativa da biomassa microbiana do solo, como a avaliação qualitativa do perfil de DNA do solo por DGGE representam técnicas valiosas para o monitoramento da comunidade microbiana do solo.

Até o presente momento, os efeitos da transgenia na microbiota do solo foram pouco demonstrados a campo, ou os dados não foram conclusivos, ou ocorreram de modo variável e transiente. Contudo, ainda faltam pesquisas científicas que comprovem as verdadeiras implicações dos transgênicos na comunidade microbiana do solo. É preciso investir em ciência para estabelecer protocolos adequados às condições ambientais e a biodiversidade própria de cada região do território nacional. Também devem ser criados mecanismos públicos de controle, monitoramento e avaliação dos riscos ambientais e sociais causados pela biotecnologia e seus produtos.

Todos os resultados desta pesquisa sugerem que não há nenhuma evidência para indicar efeitos adversos da soja transgênica resistente ao herbicida Imazapyr do grupo das imidazolinonas no ecossistema solo.