



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

IVANA ABONÍZIO SANTINONI

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO AMBIENTAL DA SOJA
TRANSGÊNICA RESISTENTE AO GLIFOSATO SOBRE
ALGUNS GRUPOS FUNCIONAIS DE MICRORGANISMOS
DO SOLO**

Londrina
2008

IVANA ABONÍZIO SANTINONI

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO AMBIENTAL DA SOJA
TRANSGÊNICA RESISTENTE AO GLIFOSATO SOBRE
ALGUNS GRUPOS FUNCIONAIS DE MICRORGANISMOS
DO SOLO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

Londrina
2008

IVANA ABONÍZIO SANTINONI

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO AMBIENTAL DA SOJA
TRANSGÊNICA RESISTENTE AO GLIFOSATO SOBRE
ALGUNS GRUPOS FUNCIONAIS DE MICRORGANISMOS
DO SOLO**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira

Prof. Dr. Waldemar Zangaro Filho

Londrina, 29 de fevereiro de 2008.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe e ao meu pai, pelo incentivo, compreensão e amor dedicados em todas as realizações da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Muito agradeço,

a Deus;

ao meu orientador Prof. Dr. Galdino Andrade pela atenção, conselhos, amizade e ensinamentos dedicados na realização desse trabalho;

ao Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira pela paciência, disposição, companheirismo e principalmente pelos ensinamentos durante essa caminhada;

aos meus pais por me incentivarem sempre a ser uma pessoa melhor e por estarem ao meu lado em todos os momentos;

à minha irmã Juliana e à minha Yasmin, por todo carinho e amor ;

ao Leopoldo por me incentivar em todos os desafios;

ao técnico Marcião pela paciência e ajuda e a todos integrantes do Laboratório de Ecologia Microbiana, por serem companheiros de trabalho e de festas também;

aos amigos: Dáfila, Marina e Júnior, pessoas que eu tive a oportunidade de conhecer e admirar, e que me ajudaram dentro e fora do Laboratório;

aos amigos Thomás, Renata, Lela, Duka, Laila, Paulo, Saru, Craudio, João, Danilo, Girino, Cupelli, Alexandre, Daniel, Larissa e Yuldi, pelos incontáveis momentos de alegria e descontração e aos velhos amigos mussummanos que mesmo longe sempre se fizeram presentes;

à querida amiga Carla, por continuar sendo meu porto seguro.

SANTINONI Ivana Abonízio. **Avaliação do impacto ambiental da soja transgênica resistente ao Glifosato sobre alguns grupos funcionais de microrganismos do solo.** Londrina, 2008. 66f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Estadual de Londrina-UEL.

RESUMO

Quando um ecossistema sofre algum tipo de interferência, reações químicas e bioquímicas do solo podem ser alteradas. Proteínas de plantas transgênicas podem ser liberadas e influenciar seletivamente a comunidade microbiana na rizosfera. O objetivo desse trabalho foi avaliar em casa de vegetação, a influência da soja transgênica resistente ao glifosato, sobre grupos funcionais de microrganismos e algumas características bioquímicas do solo, em comparação com sua variedade parental não transgênica. O experimento utilizou duas variedades de sojas resistentes ao glifosato, geneticamente modificadas (GM), BRS – 244 – Londrina (RR EMBRAPA 59) e Soja Valiosa (RR Conquista), e suas parentais não GM, EMBRAPA 59 e Soja Conquista – Uberaba. As plantas foram inoculadas ou não com fungo micorrízico arbuscular (MA) *Glomus clarum* e *G. etunicatum* e todas foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080 e *B. elkanii* SEMIA 587. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2 x 2 em cinco repetições. Durante 43 dias de cultivo foram realizadas as quantificações das populações dos grupos funcionais de microrganismos do ciclo do C (celulolíticos, proteolíticos, amilolíticos, actinomicetos, *pseudomonas* fluorescente, fungos saprofíticos e bactérias heterotróficas), grupos funcionais dos ciclos do N (proteolíticos, flagelados e ciliados) e grupos funcionais do ciclo do fósforo (solubilizadores de fosfato e colonização micorrízica). Foram também avaliadas a atividade de enzimas do ciclo do C (desidrogenase e celulase), do ciclo do N (urease e asparaginase) e do ciclo do P (fosfatase ácida) e as biomassas microbianas de C e N. Em relação ao crescimento da planta foram avaliados os seguintes parâmetros: massa seca e fresca de raiz, parte aérea e nódulos, número de nódulos e comprimento de raiz. Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas entre as variedades GM e suas parentais não GM com exceção da biomassa microbiana de Nitrogênio e colonização micorrízica que apresentaram menores resultados nas plantas transgênicas e a atividade enzimática da celulase que foi maior nesses tratamentos. A inoculação de MA foi o fator que mais influenciou nos resultados, geralmente estimulando os grupos funcionais de microrganismos na rizosfera e inibindo algumas atividades enzimáticas no solo.

Palavras-Chave: *Glycine Max* (L.) Merr. Comunidade microbiana. Fungo micorrízico. Análise de risco. Transgenia.

SANTINONI Ivana Abonízio. **Evaluation the environmental impact of transgenic soybean glyphosate resistant on the functional groups of soil microorganisms.** Londrina, 2008. 66f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Estadual de Londrina-UEL.

ABSTRACT

When the environment has some type of interference process, physic chemical and biochemical process should be disturbed. The new proteins produced by transgenic plants should be excreted through the soil and influence selectively the microbial community in the rhizosphere. The objective of this work was to evaluate in a greenhouse, the influence of transgenic soybeans resistant to glyphosate, on functional groups of microorganisms and some biochemical characteristics of the soil, in comparison with their non-transgenic parental variety. The experimental design was completely randomized 2 x 2, with two variety of transgenic soybean resistant of Glyphosate (GM), BRS – 244 – Londrina (RR EMBRAPA 59) and soybean Valiosa (RR Conquista), and their parental non-GM, EMBRAPA 59 and soybean Conquista – Uberaba. The plants were inoculated or not with arbuscular mycorrhiza fungi (AM) *Glomus clarum* and *G. etunicatum* and all were inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080 e *B. elkanii* SEMIA 587, cultivated until 43 days after germination. Each treatment had five replications. The population of functional groups of microorganisms which participate of C cycling (cellulolytics, proteolytics, amillolytics, actinomycetes, fluorescent pseudomonads, saprophytic fungi and heterotrophic bacteria), N cycling (proteolytics, flagellate and ciliate protozoans) and P cycling (P solubilizers and AM fungi). The enzymatic activity from biogeochemical cycling were also evaluated, from C cycling (dehydrogenase and cellulase), N cycling (urease and asparaginase) and P cycling acid phosphatase). Also the biomass of C, N and plant growth were estimated and. The results showed that no significant differences were observed among GM plants and their parental non-GM, except for N biomass, AM colonization and cellulase activity. The presence of AM had great influence on the functional groups of microorganisms while some enzymes activity decreased.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO (OBJETIVOS)	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3 ARTIGO: Avaliação do impacto ambiental da soja transgênica resistente ao Glifosato sobre alguns grupos funcionais de microrganismos do solo.....	22
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

A soja hoje cultivada é muito diferente dos seus ancestrais. Nos seus primórdios, era planta rasteira e habitava a costa leste da Ásia, principalmente a China. Sua evolução ocorreu de plantas oriundas de cruzamentos naturais entre duas espécies de soja selvagem (EMBRAPA, 2004). Apesar de muito conhecida no Oriente, o Ocidente ignorou o seu cultivo até a segunda década do séc. XX.

O desenvolvimento da soja no Brasil iniciou-se quando as primeiras plantas foram introduzidas e testadas no Estado da Bahia, em 1882, não apresentando êxito na região. Em 1900, a soja foi testada no Rio Grande do Sul, onde as condições climáticas similares às de origem do material proporcionaram um melhor estabelecimento dessa cultura (Bonato & Bonato, 1987; Rocha, 2002; EMBRAPA, 2004).

A soja chegou ao Paraná como lavoura comercial em meados dos anos 50. Sua produção era irrisória e as pequenas lavouras destinavam-se, em sua maioria, ao consumo doméstico. Os impulsos para o estabelecimento dessa cultura vieram com as geadas de 1953 e 1955, que estimularam os cafeicultores a buscarem na soja a alternativa para recuperação econômica (Bonato & Bonato, 1987; Alliprandini et al., 1998; EMBRAPA, 2004).

O crescimento, o desenvolvimento e a produtividade da soja são influenciados por diversos fatores. Entre os mais importantes encontra-se a interferência causada pelas plantas daninhas, que infestam espontaneamente as áreas de ocupação agrícola e que não proporcionam alimentos, fibras ou forragem. São consideradas plantas pioneiras, e apresentam a função de criar habitats adequados ao início de uma sucessão vegetal, que culmina no restabelecimento de uma vegetação clímax (Galli & Montezuma, 2005). Essas comunidades infestantes passaram a interferir profundamente nas atividades agrícolas, tornando-se alvo de controle.

Inicialmente, o controle de plantas invasivas se restringia à retirada ou queimada daquelas que se destacavam em termos de porte ou de ciclo mais curto. Essas atividades afetavam a biodiversidade local com intensa mortalidade de insetos e outros animais, provocando também processos erosivos e a diminuição dos teores de matéria orgânica, tornando-se responsáveis por importantes impactos ambientais (Christoffoleti & López-Ovejero, 2003; Gazziero et al., 2006). Na segunda metade do século 20, houve aumento expressivo do controle químico através da indústria de herbicidas. Na última década, começaram a aparecer as primeiras populações resistentes, decorrentes da pressão de seleção promovida por esses agentes químicos (Gazziero et al., 2006).

O glifosato é um herbicida pós-emergente, classificado como não-seletivo e de ação sistêmica. Apresenta largo espectro de ação, o que possibilita o controle de plantas daninhas anuais ou perenes, tanto de folhas largas como estreitas (Christoffoleti & López-Ovejero, 2003; Siqueira et al., 2004; Galli & Montezuma, 2005). Apresenta rápida e alta taxa de adsorção aos óxidos de Fe e Al e à matéria orgânica do solo, nos quais a dessorção praticamente não ocorre, mantendo baixas a mobilidade e a disponibilidade dessa molécula na solução do solo (Prata et al., 2000). É absorvido pela região clorofilada das plantas e translocado, preferencialmente pelo floema, para os tecidos meristemáticos.

Atua como um potente inibidor da atividade da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que é catalisadora de uma das reações de síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, influenciando também outros processos, como a inibição da síntese de clorofila, estímulo da produção de etileno, redução da síntese de proteínas e aumento da concentração do AIA (Cole, 1985). Segundo Carpenter et al. (2002), o glifosato é menos tóxico e menos persistente no solo que os herbicidas comumente utilizados no cultivo convencional de soja, e a possibilidade de aplicação em pós-emergência da cultura diminui os riscos de contaminação do solo e favorece a adoção do sistema de plantio direto, que aumenta a proteção do solo contra processos erosivos.

Nesse contexto, o desenvolvimento da biotecnologia moderna proporcionou o surgimento de plantas que carregam em seu genoma a adição de DNA oriundo de uma fonte diferente do germoplasma paternal, denominadas transgênicas (Mann, 1999; Valois, 2003; Pelaez et al., 2004) e que são resistentes a essa classe de herbicidas. A transgenia em plantas pode ser feita de forma direta, por processos físico-químicos ou indireta, quando o DNA exógeno é inserido no genoma vegetal pela ação de um vetor biológico (Siqueira et al., 2004). No caso da soja Roundup Ready®, produzida pela empresa Monsanto, no processo de obtenção do organismo geneticamente modificado, um transgene que codifica a informação para produção da proteína CP4 EPSPS, é inserido no genoma da planta e lhe confere característica de tolerância ao herbicida glifosato (Braga et al., 2003). Essa característica traz como consequência a facilidade no manejo da cultura e um menor número de aplicações de herbicidas, resultando em menores custos de produção e diminuição de agrotóxicos liberados no ambiente (Cox, 1998; Pelaez et al., 2004).

Em 2007, os agricultores brasileiros cultivaram 15 milhões de hectares de lavouras transgênicas, apresentando o maior crescimento no mundo em adoção de biotecnologia agrícola, o que corresponde a 30% das áreas cultivadas no país. Logo atrás do Brasil estão os Estados Unidos, com 3,1 milhões de hectares de crescimento, e a Índia, com 2,4 milhões. Da área total de transgênicos plantada no Brasil, cerca de 14,5 milhões de hectares foram cultivados com soja tolerante a herbicida. Os outros 500 mil hectares foram dedicados ao cultivo do algodão resistente a insetos, liberado para comercialização no país em 2005. Em escala mundial, as lavouras transgênicas alcançaram 114,3 milhões de hectares cultivados (CIB, 2007)

Com a evolução dos processos de produção, a agricultura, pela sua vasta extensão, tornou-se uma das atividades humanas mais impactantes ao meio ambiente, em virtude do desmatamento, manejo e uso agrícola inadequados (Castro et al., 1993; Constanza et al., 1997; Tilman et al., 2001). A conservação da biodiversidade em agrossistemas sob manejo intensivo é muito difícil, se não impossível de ser conseguida,

podendo ser o principal fator de mudança da biodiversidade do planeta (Sala et al., 2000; Palumbi, 2001).

Uma das áreas menos compreendidas na avaliação de risco ambiental de plantas geneticamente modificadas é seu impacto no solo e suas interações com a comunidade microbiana.

As plantas, como organismos autotróficos, apresentam a importante função de liberar moléculas orgânicas no solo. Este processo pode ocorrer por dois caminhos: através da deposição de resíduos vegetais e através da exsudação de nutrientes na rizosfera, um fenômeno conhecido como rizodeposição. Estes compostos constituem as fontes principais de nutrientes para microbiota do solo (Andrade, 2004; Siqueira et al., 2004). O solo é um ambiente heterogêneo, descontínuo e que possui uma vasta e diversa comunidade biológica composta por bactérias, fungos, algas, protozoários, partículas virais e macrofauna (Torsvik & Øvreås, 2002). A biodiversidade e densidade da biota do solo são importantes para assegurar que processos essenciais à qualidade e à funcionalidade do mesmo sejam realizados (Tótola & Chaquer, 2002). Portanto, os grupos funcionais de microrganismos estão inseridos no sistema que transforma substâncias e mantém os níveis de nutrientes disponíveis na Terra, participando de um ou mais ciclos biogeoquímicos.

Outro fator importante nas relações microrganismo-solo-planta é a fixação biológica do nitrogênio (FBN) realizada no solo pelos fixadores de vida livre ou na planta através de fixadores simbióticos (Dobbelaere et al., 2003; Andrade, 2004). A inoculação de leguminosas com bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* é prática comum no meio agrícola, pois essa simbiose permite transformar o N_2 atmosférico em NH_3 , que é transferido para a planta, fazendo parte de compostos nitrogenados como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. (Galli & Montezuma, 2005).

A ação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) também deve ser levada em consideração. Os FMA são microrganismos importantes para a reciclagem de nutrientes e sua disponibilização para as plantas. O micélio produzido pelo fungo aumenta a capacidade da raiz em explorar o ambiente circunvizinho, auxiliando a planta na absorção

de nutrientes de baixa mobilidade no solo. Além disso, o micélio contribui para formação e estabilidade dos agregados, não importante apenas em áreas sujeitas a processos erosivos e impactados, mas em qualquer sistema de produção agrícola (Hayman, 1983; Marschner & Dell, 1994; Andrade et. al., 1998). Entretanto, a eficiência micorrízica pode variar em função de vários fatores, como o genótipo do hospedeiro (Marschner & Timonen, 2005). Devido à essas relações, a diversidade microbiana tanto em ecossistemas naturais quanto agrícolas tem sido utilizada como importante bioindicador da qualidade do solo, permitindo avaliar o efeito do uso do mesmo sobre os microrganismos e suas funções.

Outro indicador da qualidade do solo é a atividade enzimas que atuam na ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica. As enzimas podem ser produzidas por plantas ou animais, mas são principalmente produzidas por microrganismos e apresentam, como principal função, mediar transformações bioquímicas, proporcionando processos de decomposição dos materiais orgânicos e transformações inorgânicas no solo. Encontram-se extracelularmente aderidas aos agregados do solo ou intracelularmente, no citoplasma, membrana e parede celular. Podem acumular-se no solo, e em condições estáveis, apresentar atividade por um período maior de tempo (Weaver et al., 1994; Badiane et al., 2001).

Através do estudo das interações que ocorrem no solo é possível monitorar a ação de produtos químicos prejudiciais, distúrbios ambientais, distúrbios na ciclagem dos nutrientes e efeitos na fertilidade do solo (Badiane et al., 2001; Andrade, 2004; Zilli et al., 2003; Nogueira et al., 2006;). As transformações microbianas, assim como suas diferentes reações químicas e bioquímicas podem ser alteradas quando esse ecossistema sofre algum tipo de interferência.

Por essas razões, é inevitável que produtos de novos genes venham a ter contato com a comunidade microbiana do solo. Proteínas de plantas transgênicas podem ser liberadas e influenciar seletivamente a comunidade microbiana, estimulando o crescimento de microrganismos que possam utilizá-las (Castro et al., 1993; Dunfield &

Germida, 2004). No entanto, a dúvida que permanece é se esses produtos proporcionam algum efeito sobre a função dos microrganismos do solo.

Esse trabalho teve como objetivo avaliar em casa de vegetação a influência da soja transgênica resistente ao glifosato sobre alguns grupos funcionais de microrganismos do solo, em comparação com as suas variedades parentais, na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A primeira planta transformada pela tecnologia do DNA recombinante foi desenvolvida no início da década de 80. Desde então, moléculas de DNA passaram a ser inseridas em espécies de interesse, produzindo novas e desejadas particularidades (Dunfield & Germida, 2004). Com esse avanço da ciência, a obtenção de híbridos superiores pelo melhoramento genético convencional, que é limitado a espécies sexualmente compatíveis, deixou de ser a única maneira de se fazer melhoramento, e a técnica do DNA recombinante possibilitou a utilização de grande parte da variabilidade genética existente na natureza, por meio da incorporação de genes de uma espécie no genoma de outra sem o concurso da reprodução sexual (Paterniani, 2001; Ervin et al., 2003; Siqueira et al., 2004). Esse é um processo mais rápido que o melhoramento convencional e mais preciso, pois permite a introdução de um único gene e modificação de uma característica específica. Em 1994, essa tecnologia estreou no mercado consumidor norte-americano na forma do tomate *Flavr Savr*, que teve seus genes alterados para resistir mais tempo nas prateleiras dos supermercados (Ervin et al., 2003).

Os recursos genéticos adquiriram grande expressão econômica com o desenvolvimento da engenharia genética. Os organismos geneticamente modificados (OGMs) oferecem uma multiplicidade de aplicações e benefícios, podendo também apresentar efeitos adversos. A preocupação com a segurança da nova biotecnologia está inserida em acordos internacionais, como a Agenda 21 e a Convenção da Diversidade Biológica (CBD), negociados durante a Conferência das Nações Unidas para o Desenvolvimento e o Meio Ambiente, realizada no Rio de Janeiro e foi ratificada por 170 países. O texto da CBD reconhece o valor da biodiversidade e o direito soberano dos países sobre seus recursos genéticos, ficando responsáveis pela sua preservação e uso sustentável (Leite, 2007).

A legislação brasileira de Biossegurança está representada na Lei nº 8.974, de 05/01/1995. Em cumprimento à legislação, o governo recebe assessoramento técnico da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para as atividades de avaliação de risco de OGMs e derivados e para o estabelecimento da política nacional, na referida área (CTNBio, 2007).

A polêmica sobre os cultivos transgênicos tem levado parte da sociedade a uma discussão polarizada, fazendo com que vários países imponham restrições ao plantio e à importação de commodities de produtos agrícolas oriundos de cultivos com OGMs. A legislação em alguns países é muito restritiva, enquanto em outros é mais permissiva, porém, em todos, é baseada em análises de riscos, que envolve a integração de conhecimentos científicos multi e interdisciplinares de elevada complexidade (Eastham & Sweet, 2002).

Os riscos associados aos transgênicos recaem em dois tipos principais: para a saúde humana e para o ambiente. O primeiro, aplicável a cultivos alimentares, é decorrente da premissa de que as modificações genéticas efetuadas nas plantas as levam a secretar substâncias ausentes ou incomuns nos alimentos convencionais. Compostos inexistentes na cadeia alimentar obtidos através da transgenia poderiam desencadear processos alérgicos ou outras disfunções fisiológicas. Daí surgiram expressões como “Frankenfoods” ou comidas Frankenstein (Leite, 2007).

Os principais impactos associados à liberação de OGMs no ambiente incluem: ação em organismos não alvo, fluxo gênico ou poluição genética, exposição de espécies a novos patógenos ou agentes tóxicos, geração de plantas daninhas ou pragas resistentes, efeitos nos ecossistemas e a interrupção da ciclagem de nutrientes e energia (Tiedje et al., 1989; Fontes et al., 1996; Rissler & Melon, 1996; Ho et al. 1998; Nodari & Guerra, 2001)

O impacto em organismos não alvo pode ser exemplificado pelas plantas transgênicas que expressam endotoxinas provenientes de *Bacillus thuringiensis* e outras bactérias entomopatogênicas atuando como biopesticidas. As chamadas toxinas Bt,

codificadas pelos genes *cry*, apresentam espectro diferente de toxicidade, podendo ser usadas para controle de insetos das ordens *Lepidoptera*, *Coleoptera* e *Diptera* (Birch et al. 1999). Os efeitos dessas toxinas nos insetos dependem da susceptibilidade das espécies e da concentração da toxina contida nos tecidos da planta transgênica. Experimentos em laboratório mostraram impactos adversos nas larvas de borboletas monarcas pela ingestão de pólen de milho Bt da planta hospedeira (Losey, 1999).

Os impactos ecológicos da transferência de pólen, um mecanismo reprodutivo pelo qual a introgressão (incorporação de genes de uma espécie ao “pool” gênico de outra) pode ocorrer, dependem da capacidade dos híbridos em sobreviver e reproduzir. Taxas de sobrevivência ou de reprodução indicam a oportunidade da introgressão de transgenes em populações naturais (Tiedje et al., 1989; Wolfenbarger & Phifer, 2000).

Mesmo ocorrendo a formação de híbridos entre variedades transgênicas e plantas aparentadas e/ou daninhas, para se tornar uma ameaça, como uma planta invasiva, os híbridos precisam ser viáveis e competitivos, além de férteis quando dependem da reprodução sexual para propagação. Com base no que se conhece hoje, nem todos os híbridos conseguem atingir a última fase (Wolfenbarger & Phifer, 2000).

Em geral, a maioria das discussões sobre o impacto de plantas geneticamente modificadas tem sido focada nas possibilidades de escape de genes e na transferência desses para organismos selvagens (Barton & Dracup, 2000; Eastham & Sweet, 2002). A contaminação de variedades locais, como raças crioulas, fruto da seleção continuada por agricultores tradicionais não é descartada. Essas variedades silvestres e crioulas constituem um importante repositório de diversidade genética, pois fornecem matéria-prima para cruzamentos e criação de novas variedades e a possibilidade de contaminação representa uma ameaça à pureza desse material genético, risco que em geral é designado como poluição genética ou como o problema do fluxo gênico (Syvadan, 1994).

O fluxo gênico é vertical quando a passagem da informação genética ocorre entre indivíduos da mesma espécie, produzindo descendentes férteis e viáveis. O

fluxo gênico horizontal ocorre quando a troca de informação genética se dá entre indivíduos de espécies diferentes, distantes geneticamente (Ramalho et al., 2001).

A possibilidade de troca de material genético pelo fluxo gênico horizontal (FGH) pode ocorrer em organismos procariontes, através de processos de conjugação, transdução e transformação. Também pode ser exemplificada pela transferência de material genético da bactéria comum do solo, *Agrobacterium tumefaciens*, para plantas dicotiledôneas (Bushman, 2002).

Em relação às preocupações com o fluxo gênico vertical de espécies transgênicas, deve-se considerar que a quase totalidade das espécies cultivadas no Brasil foram introduzidas e não apresentam espécies silvestres relacionadas com as quais possam cruzar, como é o caso do milho e da soja, o que impede a ocorrência de fluxo gênico por meios sexuais (Eastham & Sweet, 2002). De acordo com Ellstrand (2003), pelo menos 80% da soja e 95% do milho e do algodão produzidos mundialmente são cultivados em países onde não existe risco de hibridação.

No entanto, experimentos feitos com *Brassica napus* (canola), resistente ao glifosato e *Brassica campestris*, demonstraram diferentes graus de dispersão de pólen e formação de híbridos transgênicos (Conner & Dale, 1996). Os procedimentos recomendados para manejo de risco, visando minimizar o fluxo gênico incluem: o isolamento espacial ou temporal, em relação a espécies sexualmente compatíveis, a retirada de florescências das plantas, o uso de plantas macho estéril, o uso de bordaduras de plantas incompatíveis com a planta transgênica, procedimentos apropriados de descarte do material transgênico e o monitoramento pós-colheita, eliminando plantas voluntárias. A localização geográfica da liberação é um dado importante, visando impossibilitar a presença de espécies capazes de cruzamento fértil com o OGM (Syvadan, 1994).

Já a geração de plantas daninhas ou pragas resistentes pode ocorrer através do uso de pesticidas, que proporcionam resistência na população alvo. O manejo de resistência recomenda a estratégia que combina alta dose de exposição à toxina e plantio

de áreas sem a planta transgênica, denominadas refúgios (Gould, 1998). O sucesso do manejo depende da sincronia de cruzamento entre indivíduos sensíveis e resistentes.

Em agrossistemas, os efeitos dos cultivos transgênicos podem ser diretos, através da presença de gene exógeno funcional na planta, que é traduzido em novas proteínas, e essas podem, eventualmente, ser liberadas no solo pela decomposição ou exsudação, ou indiretos, resultantes do tipo de sistema de manejo da produção (Donegan et al., 1997; Ervin et al., 2003).

Em relação ao sistema de manejo, Angle (1994) sugere que este pode influenciar as interações que ocorrem entre proteínas modificadas e a comunidade microbiana. No sistema de plantio direto, durante o período sem cultivo, os resíduos deixados pelas plantações são concentrados na superfície do solo, limitando o contato dos microrganismos desse ambiente com essas proteínas. Sob uma plantação convencional os restos das plantas são incorporados ao solo, misturando os produtos dos genes e aumentando o número de organismos expostos.

Outro tipo de liberação feita diretamente no solo pelas raízes das plantas é a exsudação. As novas proteínas produzidas têm então a oportunidade de interagir com a comunidade microbiana durante todo o período de crescimento da cultura (Dunfield & Germida, 2004; Siqueira et al., 2004). A partir disso, esses componentes podem ser absorvidos, integrados e replicados pela microbiota, sofrer desnaturação química ou física, serem degradados por heterotróficos, ingeridos pela fauna epigênica ou permanecerem adsorvidos aos colóides, conforme ilustrado na figura 1.

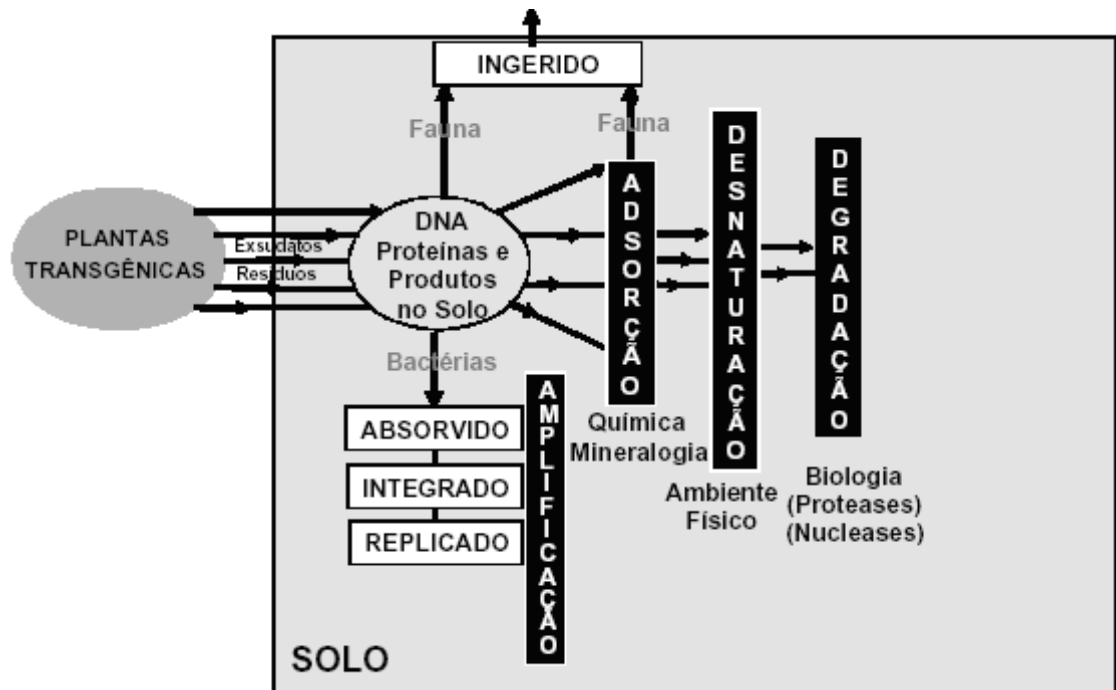


Figura 1. Rotas de exposição e processos de transformação de DNA, proteínas e produtos de plantas transgênicas no sistema solo-planta-organismos, relacionados à persistência e à atividade dessas moléculas no ambiente (SIQUEIRA, et al., 2004).

De acordo com Wolfenbarger & Phifer (2000), dois terços dos trabalhos científicos relacionados ao cultivo de plantas transgênicas comprovaram danos aos componentes do ecossistema. Os estudos analisados revelaram que seus efeitos foram distintos, porque diferentes transgenes foram empregados.

Outra grande preocupação é a discussão sobre o processo de ação do herbicida e se este pode apresentar efeitos diretos sobre a biota, processos bioquímicos do solo, ou sobre a deposição de matéria orgânica na superfície do solo. Alguns autores (Souza et al., 1996; Busse et al., 2001; Andréa et al., 2003; Araújo et al., 2003) afirmam que o glifosato é rapidamente degradado ou ligado aos colóides do solo, exercendo poucos efeitos danosos à biota ou processos biológicos.

Sabe-se que o glifosato pode interferir em alguns processos fisiológicos ocorrentes nas plantas. No caso de leguminosas, como a soja, é de especial interesse a simbiose com rizóbio, cujos estágios iniciais do estabelecimento da associação são controlados por metabólitos secundários exsudados na rizosfera, como os isoflavonóides. Alguns estudos mostraram que o herbicida pode inibir, ainda que moderadamente, a

nodulação e interferir na atividade da nitrogenase na soja (Cox, 1998). Entretanto, dos herbicidas mais utilizados na agricultura, o glifosato é o menos tóxico para a nodulação e FBN (Mallik & Tesfai, 1985; Eberbach & Douglas, 1989). A micorrização também pode ser prejudicada, pois é dependente de exsudatos da raiz (Siqueira et al., 2004).

Algumas plantas transgênicas podem afetar a diversidade microbiana do solo alterando os ciclos do carbono e do nitrogênio e assim, interferir na sua fertilidade (Palm et al., 1996; Saxena et al. 1999). Um fator relevante é o fato de que a presença de DNA no solo não significa que este esteja em condição de ser amplificado pela sua biota (Nielsen, 2003). Em solos muito argilosos e ricos em matéria orgânica, a degradação dessas moléculas pode ser reduzida pela adsorção às partículas de argila e ácidos húmicos (Stotzky, 1989; Tebbe & Vahjen, 1993). Para que haja a transferência de genes de plantas transgênicas para bactérias do solo, o DNA precisa permanecer livre e inalterado na presença de microbiota competente, para absorvê-lo e integrá-lo ao seu genoma (Siqueira et al., 2004).

As alterações causadas pelos cultivos transgênicos ainda não foram completamente entendidas, principalmente sobre sua influência na biodiversidade e funcionalidade do solo. Como já foi dito, estes organismos desempenham funções essenciais e por estarem na base da cadeia trófica e intrinsecamente associados aos diversos processos ecológicos são indicadores sensíveis da qualidade do solo (Tótola & Chaer, 2002; Moreira & Siqueira, 2006). As propriedades biológicas do solo determinam o estabelecimento e a produtividade das plantas e a atividade microbiana pode ser avaliada através de parâmetros biológicos como a ação de grupos funcionais do ciclo do C, N e P e bioquímicos como a atividade enzimática (De Luca & Keeney, 1993; Pascual et al., 2000).

Os grupos funcionais de microrganismos do solo são classificados de acordo com suas atuações nos processos biológicos do ecossistema. Exemplos desses grupos são os envolvidos no ciclo do nitrogênio como os proteolíticos e protozoários flagelados e ciliados, no ciclo do fósforo como os solubilizadores de fosfato e fungos micorrízicos, e no ciclo do carbono como os celulolíticos, proteolíticos, amilolíticos,

actinomicetos, *pseudomonas* fluorescente, fungos saprofíticos e bactérias heterotróficas, entre outros (Torsvik & Øvreås, 2002).

A avaliação da atividade de algumas enzimas fornece uma avaliação biológica integrada, devido à sua estrita relação com a biologia do solo. As fosfatases desempenham importante papel na mineralização do fósforo orgânico e conseqüentemente no ciclo do mesmo (Amador et al., 1997). As desidrogenases estão relacionadas à oxidação biológica de compostos orgânicos e são altamente específicas (Trevors, 1984). A urease e a L-asparaginase desempenham um importante papel na mineralização do N e são amplamente utilizadas na avaliação de mudanças na qualidade do solo, ocorridas em função do manejo do mesmo (Klose & Tabatabai, 2000). As celulases catalisam a hidrólise da celulose, um dos polímeros mais abundantes no solo. Uma maior atividade celulásica ocorre no solo rizosférico, em relação ao solo não-rizosférico (Hayano, 1986).

Durante a obtenção de dados para análise de risco, é fundamental a comparação com o organismo parental, não modificado. A avaliação de risco identifica e caracteriza a magnitude e o potencial de fatores adversos previamente identificados, em qualidade e quantidade. Considera informações sobre o grau de risco do organismo parental, as características dos novos genes inseridos, o fenótipo do OGM resultante e as características do ambiente receptor. A obtenção de dados tem início em experimentos nas casas de vegetação e, posteriormente, testes de campo (Edmonds Institute, 1998).

A falta de dados sobre a ação nos processos biológicos do solo e a hipótese de risco ambiental que esses organismos podem gerar são questões que devem ser estudadas e pautadas no maior número de dados possíveis, para verificar se os OGMs são benéficos, maléficos ou inócuos ao ambiente.

3 ARTIGO

Avaliação do impacto ambiental da soja transgênica resistente ao Glifosato sobre grupos funcionais de microrganismos do solo

Ivana Abonízio Santinoni^a, Dáfila dos Santos de Lima^a, Marina Yumi Horta Miyauchi^a, Admilton Gonçalves de Oliveira^a, Cristiane Alcantara dos Santos^a, Letícia Sayuri Murate^a, Alessandra Marega Motta^a, Rebeca Fuzinato Dall’Agnol, Gisele Milani Lovato^a, Cícera Maria Antonia de Castro^a, Márcio Ferreira Cruz^a, Mariangela Hungria^b, Marco Antonio Nogueira^a, Galdino Andrade^a.

^aLaboratório de Ecologia Microbiana, Departamento de Microbiologia, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, 86051-990 Londrina, PR, Brasil.

^bEmpresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Caixa Postal 231, 86001-970, Londrina, PR, Brasil.

Resumo

Quando um ecossistema sofre algum tipo de interferência, reações químicas e bioquímicas do solo podem ser alteradas. Proteínas de plantas transgênicas podem ser liberadas e influenciar seletivamente a comunidade microbiana na rizosfera. O objetivo desse trabalho foi avaliar em casa de vegetação, a influência da soja transgênica resistente ao glifosato, sobre grupos funcionais de microrganismos e algumas características bioquímicas do solo, em comparação com sua variedade parental não transgênica. O experimento utilizou duas variedades de sojas resistentes ao glifosato, geneticamente modificadas (GM), BRS – 244 – Londrina (RR EMBRAPA 59) e Soja Valiosa (RR Conquista), e suas parentais não GM, EMBRAPA 59 e Soja Conquista – Uberaba. As plantas foram inoculadas ou não com fungo micorrízico arbuscular (MA) *Glomus clarum* e *G. etunicatum* e todas foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080 e *B.*

1 *elkanii* SEMIA 587. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com arranjo
2 fatorial 2 x 2 em cinco repetições. Durante 43 dias de cultivo foram realizadas as
3 quantificações das populações dos grupos funcionais de microrganismos do ciclo do C
4 (celulolíticos, proteolíticos, amilolíticos, actinomicetos, *pseudomonas* fluorescente, fungos
5 saprofiticos e bactérias heterotróficas), grupos funcionais dos ciclos do N (proteolíticos,
6 flagelados e ciliados) e grupos funcionais do ciclo do fósforo (solubilizadores de fosfato e
7 colonização micorrízica). Foram também avaliadas a atividade de enzimas do ciclo do C
8 (desidrogenase e celulase), do ciclo do N (urease e asparaginase) e do ciclo do P (fosfatase
9 ácida) e as biomassas microbianas de C e N. Em relação ao crescimento da planta foram
10 avaliados os seguintes parâmetros: massa seca e fresca de raiz, parte aérea e nódulos,
11 número de nódulos e comprimento de raiz. Os resultados mostraram que não houve
12 diferenças significativas entre as variedades GM e suas parentais não GM com exceção da
13 biomassa microbiana de Nitrogênio e colonização micorrízica que apresentaram menores
14 resultados nas plantas transgênicas e a atividade enzimática da celulase que foi maior
15 nesses tratamentos. A inoculação de MA foi o fator que mais influenciou nos resultados,
16 geralmente estimulando os grupos funcionais de microrganismos na rizosfera e inibindo
17 algumas atividades enzimáticas no solo.

18

19 Palavras-Chave: *Glycine Max* (L.) Merr., comunidade microbiana, fungo micorrízico, análise
20 de risco, transgenia.

21

22

23 **Introdução**

24

25 O desenvolvimento da biotecnologia moderna proporcionou o surgimento de plantas que
26 carregam em seu genoma a adição de DNA oriundo de uma fonte diferente do germoplasma
27 paternal, denominadas transgênicas (Pelaez et al., 2004; Valois, 2003). No processo de
28 obtenção da planta geneticamente modificada, a soja recebe um transgene que codifica a

1 informação para a produção de uma proteína, proporcionando à planta a característica de
2 tolerância a herbicidas (Braga et al., 2003; Siqueira et al., 2004). Essa característica traz
3 como consequência a facilidade no manejo da cultura e um menor número de aplicações de
4 herbicidas, resultando em menores custos de produção e diminuição de agrotóxicos liberados
5 no ambiente (Pelaez et al., 2004).

6 Uma das áreas menos compreendidas na avaliação de risco ambiental de plantas
7 geneticamente modificadas é seu impacto no solo e suas interações com a comunidade
8 microbiana. O solo é um ambiente heterogêneo, descontínuo e que possui uma vasta e
9 diversa comunidade biológica. A biodiversidade e densidade da biota do solo são importantes
10 para assegurar que processos essenciais à qualidade e à funcionalidade do mesmo sejam
11 realizados (Tótola & Chaquer, 2002). Portanto, a diversidade microbiana, tanto em
12 ecossistemas naturais quanto agrícolas, tem sido utilizada como importante bioindicador de
13 sua qualidade, permitindo avaliar o efeito do uso do solo sobre os microrganismos e suas
14 funções (Nogueira et al., 2006).

15 Outro indicador de qualidade do solo relacionado aos microrganismos é a atividade de
16 enzimas específicas. As enzimas podem ser produzidas por plantas, animais e
17 microrganismos. Sua função é mediar transformações bioquímicas, proporcionando
18 processos de decomposição dos materiais orgânicos e transformações inorgânicas no solo.
19 Encontram-se extracelularmente, aderidas aos agregados do solo ou intracelularmente, no
20 citoplasma, membrana e parede celular do organismo produtor (Weaver et al., 1994).

21 Em relação à interação planta-microrganismo, as plantas como organismos autotróficos,
22 liberaram moléculas orgânicas no solo. Estes compostos constituem as principais fontes de
23 nutrientes para a microbiota do solo (Andrade, 2004; Siqueira et al., 2004), dentre eles os
24 envolvidos na fixação biológica do nitrogênio (FBN) e os fungos micorrízicos arbusculares
25 (FMA).

26 A FBN pode ser realizada no solo pelos fixadores de N de vida livre ou na planta através
27 de fixadores simbióticos (Andrade, 2004; Dobbelaere et al., 2003). Essa simbiose permite

1 transformar o N₂ atmosférico em NH₃, que é transferido para a planta, fazendo parte de
2 compostos nitrogenados como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. (Galli &
3 Montezuma, 2005). Já os FMA apresentam importante papel na reciclagem de nutrientes e
4 sua disponibilização para as plantas. O micélio produzido pelo fungo aumenta a capacidade
5 da raiz em explorar o ambiente circunvizinho, auxiliando a planta na absorção de nutrientes
6 de baixa mobilidade no solo como o P. Contribui também para formação e estabilidade dos
7 agregados, não importante apenas em áreas sujeitas a processos erosivos e impactados,
8 mas em qualquer sistema de produção agrícola (Marschner & Dell, 1994). Entretanto, a
9 eficiência micorrízica pode variar em função de vários fatores, como o genótipo do
10 hospedeiro (Marschner & Timonen, 2005).

11 A biomassa microbiana contabiliza todas as células vivas presentes no solo, exceto raízes
12 de plantas e macroinvertebrados. Constitui a fração viva da matéria orgânica do solo, sendo
13 considerada um reservatório de nutrientes para as plantas, promovendo a sustentabilidade
14 biológica e a produtividade nos ecossistemas (Schloter et al., 2003). Os grupos funcionais de
15 microrganismos estão inseridos no sistema que transforma substâncias, realiza a ciclagem de
16 nutrientes e carbono e mantém esses disponíveis na Terra. Essas transformações, assim
17 como suas diferentes reações químicas, podem ser alteradas quando o ecossistema onde
18 estão sofre algum tipo de interferência. Proteínas de plantas transgênicas podem ser
19 liberadas e influenciar seletivamente a comunidade microbiana, estimulando o crescimento
20 dos microrganismos que possam utilizá-las (Dunfield & Germida, 2004). No entanto, a dúvida
21 que permanece é se esses produtos provocam algum efeito sobre a função dos
22 microrganismos do solo.

23 Esse trabalho teve como objetivo avaliar em casa de vegetação a influência da soja
24 transgênica resistente ao glifosato sobre grupos funcionais de microrganismos do solo, em
25 comparação com a sua variedade parental, na presença e ausência de fungos micorrízicos
26 arbusculares.

27

28

1 **Material e Métodos**

2

3 Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação (28°C, com umidade relativa de
4 60%) entre os meses de novembro e dezembro de 2006.

5

6 *Delineamento Experimental*

7 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com um arranjo fatorial 2 x 2 ,
8 sendo (2) variedades de soja GM e suas parentais não GM e (2) inoculadas ou não com FMA
9 em três tempos de avaliação: 6 , 26 e 43 dias após a germinação, com cinco repetições (n =
10 60 para cada variedade).

11

12 *Solo e condições de crescimento da planta*

13 O substrato utilizado para o cultivo foi proveniente do horizonte A de um solo classificado
14 como Rhodic Ferralsol (FAO, 1994), textura média e que apresenta a seguinte composição
15 química: Al 0.3 cmol; Ca 1.7 cmol; Mg 0.7 cmol; K 0.07 cmol; H + Al 4.9 cmol; C 10.4 g; P 2.2
16 mg, todos em dm⁻³ de solo; pH 4.6. O solo foi misturado com areia lavada (3:1) e esterilizado
17 em autoclave por 1 h em vapor fluente, por três dias consecutivos para eliminar propágulos
18 de fungos MA nativos. Em cada vaso foram acondicionados 500 g da mistura solo-areia
19 esterilizada, e a comunidade microbiana, exceto FMAs, foi restabelecida com 10 mL de
20 extrato do solo original filtrado. Foram utilizadas no experimento duas variedades de soja
21 resistentes ao glifosato, geneticamente modificadas (GMs), BRS – 244 – Londrina (RR
22 EMBRAPA 59) e sua parental não GM EMBRAPA 59 Londrina denominadas de var 1 e Soja
23 Valiosa (RR Conquista) e sua parental não GM Soja Conquista – Uberaba denominadas de
24 var 2, cedidas gentilmente pela EMBRAPA Soja – Londrina. As sementes foram esterilizadas
25 por superfície com uma solução de hipoclorito (2%, v:v) por 2 minutos e lavadas com água

1 destilada estéril por 5 vezes. Cada vaso recebeu seis sementes, fazendo-se o desbaste após
2 quatro dias de emergência para a manutenção de uma plântula por vaso.

3 As plântulas foram inoculadas com as cepas de *B. japonicum* SEMIA 5080 e *B. elkanii*
4 SEMIA 587, cultivadas em placa de Petri com meio YMA (Vincent, 1970) e incubadas por
5 sete dias a 28°C. As células foram suspensas em salina estéril até uma concentração de
6 aproximadamente 10^8 ufc mL⁻¹. Foi inoculado 1 ml dessa solução, de cada cepa, nas
7 plântulas logo após o desbaste.

8 O inóculo de fungo MA foi obtido de vasos de multiplicação em *Brachiaria decumbens* com
9 cultura pura de *G. clarum* e *G. etunicatum*. Dois gramas de inóculo bruto (solo, micélio, raízes
10 colonizadas e esporos) foram colocados nos tratamentos micorrizados.

11 A cada época de avaliação, a umidade das amostras de solo foi determinada
12 gravimetricamente por secagem a 105°C 24 h⁻¹ para a expressão dos resultados em g de solo
13 seco. As amostras foram armazenadas em câmara fria a 4°C para determinação da atividade
14 enzimática e de biomassa do C e N.

16 *Análises microbiológicas*

17 Em cada época de avaliação, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi
18 determinado por diluição seriada 1:10, onde 1 g de solo rizosférico de cada repetição foi
19 suspenso em 9 mL de salina estéril (0.85%). Aliquotas de 50 µL das diluições 10^{-6} para
20 bactérias heterotróficas (Ferreira et al., 2003), 10^{-4} para actinomicetos (Küster & Williams,
21 1964), pseudomonas fluorescentes (Kato & Itoh, 1983), proteolíticos (Wood 1980,
22 modificado por Andrade, 2004) e solubilizadores de fosfato (Sylvester-Bradley et al., 1982),
23 10^{-3} para amilolíticos (Pontecorvo et al., 1953), celulolíticos (Wood, 1980) e fungos
24 saprófitos (Ferreira et al., 2003) foram inoculados em seus respectivos meios de cultura. As
25 placas foram incubadas a 28°C e as colônias contadas conforme o período necessário para o
26 seu desenvolvimento (1, 3, 5 e 7 dias de observação, dependendo do grupo funcional

1 avaliado). Os resultados foram expressos em escala logarítmica do número de UFC por
2 grama de solo seco ($\log \text{UFC g}^{-1}$). Para estimar a comunidade de protozoários flagelados e
3 ciliados (Woomer, 1994) foram utilizadas placas de cultivo celular de 24 poços. Em cada poço
4 adicionou-se 1.8 mL de extrato de solo e 200 μL da diluição 10^{-1} na primeira seqüência de
5 diluição, obtendo-se a diluição 10^{-2} . A partir deste poço, realizou-se a diluição seriada 1:10
6 até a 10^{-6} em duplicata. As placas foram incubadas em a 28°C por cinco dias e analisadas em
7 microscópio invertido. O número de células foi estimado através da técnica do número mais
8 provável (NMP) pela presença ou ausência destes microrganismos em cada poço.

9 A biomassa microbiana de C e N foram estimadas pelo método de fumigação-extração
10 (Vance et al., 1987). Duas alíquotas de 25 g por amostra foram pesadas sendo que uma foi
11 fumigada com clorofórmio, e mantida por 24 h a 25°C sob vácuo. A extração foi feita com
12 K_2SO_4 0.5 M agitando-se cada amostra por 30 minutos e o extrato em seguida foi filtrado em
13 papel filtro. O carbono orgânico no extrato foi quantificado pela oxidação com $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e
14 titulação do remanescente com sulfato ferroso amoniacal (Anderson & Ingram, 1993). O C da
15 biomassa foi calculado com base na diferença entre o C da amostra fumigada e não
16 fumigada, utilizando-se um fator $K_C = 0.33$. Numa alíquota do mesmo extrato foi feita a
17 quantificação do N após a digestão sulfúrica. O N da biomassa microbiana foi calculado
18 também com base na diferença entre amostra fumigada e não fumigada, utilizando-se um
19 fator $K_N = 0.68$ (Brookes et al., 1985).

21 *Colonização micorrízica*

22 Para determinação da colonização micorrízica, as raízes foram cortadas em fragmentos de
23 aproximadamente 1 cm e lavadas com água destilada. Posteriormente foram imersas em
24 uma solução de KOH 10% e mantidas em vapor fluente durante 30 minutos a 90°C . A
25 solução de KOH foi retirada e as raízes lavadas com água destilada. Posteriormente foram
26 imersas em uma solução de HCL 0.1 N por 30 segundos e lavadas novamente. Após a
27 acidificação; as raízes foram imersas em uma solução de Azul de Trypan 0.05% e mantidas

1 em vapor fluente por 3 minutos a 90°C (Phillips & Hayman, 1970). A porcentagem de
2 colonização micorrízica foi estimada através do método de interseções em grid-line
3 (Giovanetti & Mosse, 1980).

4 5 *Ánalises de crescimento da planta*

6 As massas frescas de raízes, parte aérea e nódulos foram avaliadas pela pesagem no
7 momento que essas partes foram retiradas dos vasos e novamente após secagem por 48 h a
8 55 °C. Para comprimento de raiz, um grama da raiz de cada planta foi cortado e o
9 comprimento estimado pelo método de interseções em grid-line (Newman, 1966).

10 11 *Análises bioquímicas do solo*

12 Foram analisadas as enzimas Desidrogenase, Celulase, Urease, Asparaginase e
13 Fosfatase ácida

14 A atividade da desidrogenase foi determinada segundo Casida et al. (1964). O substrato
15 utilizado foi cloreto de trifetil tetrazólio (TTC). Cinco gramas de solo de cada amostra foram
16 incubados com 5 mL de TTC 1% a 37°C por 24 h. O trifetil formazan formado foi extraído
17 com metanol, e o extrato foi lido em espectrofotômetro a 485 nm.

18 A atividade da celulase foi avaliada através da incubação de cinco gramas de amostra de
19 solo com carboximetilcelulose como substrato , em tampão fosfato pH 5.5, com tolueno por
20 24 h a 50°C. O açúcar redutor produzido foi quantificado em espectrofotômetro pelo método
21 do Azul da Prússia (Schinner & von Mersi, 1990).

22 Para determinar as atividades da urease e asparaginase, um grama de solo foi incubado
23 em tampão THAM (0.05 M) com pH adequado para cada enzima, juntamente com substrato a
24 37°C por 2 h. Foram utilizadas as soluções de uréia 0.2 M como substrato para urease e L-
25 asparagina 0.5 M como substrato para asparaginase (Tabatabai & Bremner, 1972). Após
26 incubação, o N amoniacal foi extraído com KCl-AgSO₄ e quantificado por destilação a vapor.

1 A atividade da fosfatase ácida foi avaliada utilizando solução de *p*-nitrofenil fosfato (0.05M)
2 como substrato. Um grama de solo das amostras foi incubado no tampão MUB pH 6.5 a 37°C
3 por 1 h. após a paralisação da reação com CaCl₂ e NaOH, a mistura foi filtrada e o *p*-
4 nitrofenol formado quantificado em espectrofotômetro a 420 nm (Tabatabai & Bremner,
5 1969).

6 *Ánalise Estatística*

8 Os dados foram submetido à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias feita
9 pelo teste Tukey a $p < 0.05$. Empregou-se também a Análise de Componentes Principais
10 (ACP) pelo programa Canoco for Windows 4.5 (Braak & Smilauer, 1998) para interpretação
11 dos resultados.

14 **Resultados**

16 *Grupos funcionais de microrganismos do solo*

17 As duas variedades de soja GMs testadas não influenciaram a maioria dos grupos
18 funcionais de microrganismos quando comparadas com as parentais não GMs. No entanto,
19 a biomassa microbiana de N na var 1 (Tabela 1) e a colonização micorrízica na var 2
20 (Tabela 2) apresentaram resultados significativamente maiores nas parentais não GM. Por
21 outro lado, a presença dos fungos MA influenciou a população de pseudomonas
22 fluorescente, solubilizadores de fosfato e ciliados nas duas variedades (Tabela 1 e Tabela
23 2). Para a var 1, as populações de proteolíticos e flagelados (Tabela 1) também foram
24 estimuladas e para a var 2 a população de amilolíticos foi maior nas plantas não
25 micorrizadas (Tabela 2). Quanto à população de celulolíticos, a micorriza teve efeito
26 deletério para as duas variedades testadas (Tabela 1 e Tabela 2). Os demais parâmetros
27 analisados não apresentaram diferenças significativas.

1 Quando se observa a ACP que correlaciona os grupos de microrganismos com os
2 tratamentos analisados na var 1 (Figura 1), o plano fatorial foi apresentado considerando os
3 eixos 1 e 3 que representam melhor a variabilidade, sendo que o eixo 1 explica 45.9% e o
4 eixo 3 33.8% da variabilidade. A inoculação com fungo micorrízico fez com que houvesse
5 uma separação entre os tratamentos, independentemente da transgenia. Dessa forma, as
6 plantas não micorrizadas apresentaram correlação positiva com o eixo 1, enquanto as
7 micorrizadas se correlacionaram negativamente com este eixo. Os grupos funcionais de
8 proteolíticos, amilolíticos, pseudomonas fluorescente, bactérias heterotróficas, ciliados e
9 flagelados apresentaram uma melhor correlação com os tratamentos micorrizados, em
10 relação ao eixo 1. Observando-se o eixo 3 houve maior correlação dos celulolíticos com os
11 tratamentos não micorrizados e a variável solubilizadores de fosfato se posicionou de
12 maneira oposta nesse eixo.

13 Na ACP que correlaciona os grupos de microrganismos com os tratamentos analisados
14 na var 2 (Figura 2), o plano fatorial foi apresentado considerando os eixos 2 e 3 que tiveram
15 uma maior representatividade da variabilidade. A porcentagem da variabilidade explicada no
16 eixo 2 foi 10.1% enquanto no eixo 3 foi 71.4%. Nessa variedade, a inoculação com fungo
17 micorrízico também fez com que houvesse uma separação entre os tratamentos,
18 independente da transgenia. Dessa forma as plantas micorrizadas apresentaram correlação
19 positiva com o eixo 3, enquanto as não micorrizadas se correlacionaram negativamente com
20 este eixo. As variáveis dos grupos pseudomonas fluorescente e solubilizadores de fosfato
21 apresentaram maior correlação com os tratamentos micorrizados enquanto o grupo de
22 celulolíticos e amilolíticos se posicionaram opostamente, correlacionando-se melhor com os
23 tratamentos não micorrizados.

24

25 *Atividade enzimática*

26 A colonização micorrízica influenciou a atividade enzimática da asparaginase nas duas
27 variedades analisadas (Tabela 3 e Tabela 4) sendo que a rizosfera das plantas não

1 micorrizadas apresentaram maiores resultados. Para a var 1 também foram encontrados
2 resultados significativamente maiores nas atividades da desidrogenase e fosfatase ácida na
3 rizosfera das plantas não micorrizadas (Tabela 3). Já a atividade da celulase foi estimulada
4 pelo fungo MA nas duas variedades, apresentando maiores valores nos vasos micorrizados
5 (Tabela 3 e Tabela 4) O fungo MA também estimulou a atividade da urease na var 2 que
6 apresentou maiores atividades na rizosfera das plantas micorrizadas (Tabela 4). Em relação
7 à transgenia, diferenças significativas foram encontradas somente quanto à atividade
8 enzimática da celulase, maior na parental GM para a var 2 (Tabela 4).

9 Quando se observa a ACP que correlaciona a atividade enzimática com os tratamentos
10 analisados na var 1 (Figura 3), a porcentagem da variabilidade explicada no eixo 1 foi 71.5%
11 enquanto no eixo 2 foi 7.3%. A inoculação com fungo micorrízico fez com que houvesse uma
12 separação entre os tratamentos, independentemente da transgenia. Nesse caso,
13 considerando o eixo 1 que explica melhor a variabilidade, as plantas não micorrizadas
14 apresentaram correlação positiva com este eixo, enquanto as micorrizadas se
15 correlacionaram negativamente com este eixo. As variáveis enzimáticas desidrogenase e
16 urease apresentaram uma melhor correlação com os tratamentos não micorrizados, enquanto
17 a celulase apresentou um posicionamento oposto, sendo correlacionada com os tratamentos
18 micorrizados, mais precisamente com os tratamentos transgênicos micorrizados.

19 Na ACP que correlaciona a atividade enzimática com os tratamentos analisados na var 2
20 (Figura 4), a porcentagem da variabilidade explicada no eixo 1 foi 21.2% enquanto no eixo
21 2 foi 65.7%. A inoculação com fungo micorrízico fez com que houvesse uma separação
22 entre os tratamentos, independentemente da transgenia, tanto no eixo 1 quanto no eixo 2.
23 Nesse caso, considerando o eixo 2 que explica melhor a variabilidade, as plantas
24 micorrizadas apresentaram correlação positiva com este eixo, enquanto as não
25 micorrizadas se correlacionaram negativamente a este eixo. As variáveis Asparaginase e
26 Fosfatase ácida apresentaram uma melhor correlação com os tratamentos não
27 micorrizados, enquanto a celulase e a urease apresentaram um posicionamento oposto,

1 sendo correlacionada com os tratamentos micorrizados. Observando o eixo 1, que explica
2 uma porcentagem menor da variabilidade, a desidrogenase e a asparaginase foram melhor
3 correlacionadas com os tratamentos não micorrizados enquanto a fosfatase ácida
4 apresentou um posicionamento oposto ao dessas variáveis.

6 *Fixação Biológica do Nitrogênio*

7 Os parâmetros relacionados à FBN também não apresentaram diferenças significativas
8 quando comparadas as parentais GMs com as não GMs nas duas variedades analisadas.
9 No entanto, a colonização micorrízica estimulou o peso fresco, peso seco e o número de
10 nódulos, que apresentaram maiores resultados nas duas variedades (Tabela 5 e Tabela 6),
11 e estimulou também o número de nódulos na var 1 (Tabela 5).

13 *Crescimento da planta*

14 As plantas GMs não apresentaram diferenças significativas em relação ao crescimento
15 quando comparadas às suas parentais não GMs para as duas variedades analisadas . A
16 colonização micorrízica apresentou efeito sobre o peso fresco de parte aérea para as duas
17 variedades (Tabela 7 e Tabela 8) e sobre o peso seco da parte aérea na var 1 (Tabela 7)
18 sendo encontrado nos tratamentos micorrizados os maiores valores. Os demais parâmetros
19 não apresentaram diferenças significativas.

20 Na ACP que correlaciona os parâmetros de crescimento da planta com os tratamentos
21 analisados na var 1 (Figura 5), a porcentagem da variabilidade explicada no eixo 1 foi
22 67.8% enquanto no eixo 2 foi 26.1%. A presença do fungo micorrízico proporcionou uma
23 separação entre os tratamentos, independentemente da transgenia. Os tratamentos
24 micorrizados apresentaram uma correlação positiva com o eixo 1, enquanto as não
25 micorrizadas se posicionaram opostamente. Todas as variáveis analisadas apresentaram
26 melhor correlação com os tratamentos micorrizados, para o eixo 1. Analisando o eixo 2, as

1 variáveis comprimento total e específico de raiz se correlacionaram melhor com os
2 tratamentos não micorrizados.

3 Na ACP que correlaciona os parâmetros de crescimento da planta com os tratamentos
4 analisados na var 2 (Figura 6), o plano fatorial foi apresentado considerando os eixos 2 e 3
5 que tiveram uma maior representação da variabilidade. A porcentagem da variabilidade
6 explicada no eixo 2 foi 34.6% enquanto no eixo 3 foi 53.9%. Nessa variedade, a inoculação
7 com fungo micorrízico também fez com que houvesse uma separação entre os tratamentos,
8 independente da transgenia. Dessa forma, os tratamentos micorrizados apresentaram
9 correlação positiva com o eixo 3, enquanto os não micorrizados se correlacionaram
10 negativamente com este eixo. As variáveis relacionadas com a parte aérea apresentaram
11 uma melhor correlação com os tratamentos micorrizados enquanto as variáveis peso fresco
12 de raiz apresentaram posicionamento oposto, correlacionando-se melhor com os
13 tratamentos não micorrizados, em relação ao eixo 3 que explica melhor a variabilidade.
14 Observando-se o eixo 2, as variáveis comprimento total e específico de raiz se
15 correlacionaram melhor com o tratamentos não micorrizados enquanto as variáveis
16 referentes à parte aérea tiveram uma posição oposta.

17

18

19 **Discussão**

20

21 A transgenia apresentou efeito deletério apenas sobre a biomassa de N e colonização
22 micorrízica na var 1 e 2, respectivamente. A biomassa microbiana é considerada um
23 reservatório vivo de nutrientes no solo, principalmente C, N e P, que são disponibilizados
24 após a morte da célula microbiana. De fato, trabalhos anteriores mostraram que as plantas
25 GMs podem causar alterações diretas e indiretas sobre os organismos do solo e sobre
26 alguns processos por eles mediados, alterando os exsudatos radiculares e,

1 conseqüentemente, interferindo na nodulação, na micorrização e no estabelecimento de
2 relações patogênicas (Nodari & Guerra, 2001; Wolfenbarger & Phifer, 2000). Dunfield &
3 Germida (2004) observaram diferenças significativas na microbiota da rizosfera de uma
4 variedade de trigo onde foi modificado apenas um par de cromossomos. Efeitos
5 semelhantes foram observados por Siciliano & Germida (1999) na rizosfera de Canola
6 (*Brassica nigra*) resistente ao glifosato, mas concluíram que essas alterações foram
7 dependentes da cultivar utilizada e não da transgenia, o que coincide com os resultados
8 encontrados neste trabalho, já que diferenças significativas foram encontradas apenas na
9 biomassa de N na var e 1 e na colonização micorrízica na var 2. Em contrapartida, Siqueira
10 et al. (2004) relatam que alterações causadas por cultivos transgênicos na biologia do solo
11 não diferem em qualidade e magnitude daquelas causadas por outras ações antrópicas e
12 variações naturais do solo.

13 A possível alteração desses exsudatos pode ter influenciado a diminuição da biomassa
14 microbiana de uma forma geral, sendo refletida pela diferença na biomassa de N, já que a
15 quantidade e o tipo de resíduo orgânico têm grande influência na biomassa microbiana e em
16 sua atividade, e correlação com os processos bioquímicos do solo (Badiane et al., 2001). A
17 resistência ao glifosato tem pouco efeito sobre a microbiota, pois os genes introduzidos
18 geralmente são de bactérias do solo ou de plantas. Neste caso, o produto de sua expressão
19 são enzimas ligadas ao metabolismo da planta e não à produção de toxinas (Gianessi et al.,
20 2002).

21 O fato de a colonização micorrízica ser menor na planta GM da var 2, pode estar
22 relacionado com as diferenças entre cultivares, observadas por outros autores em outras
23 espécies de plantas, como em *Medicago* (Pivato et al., 2007) e *Tagetes* sp. (Linderman &
24 Davis, 2004). Em experimentos de campo com soja RR, Nahas et al. (2003) encontraram
25 maior colonização micorrízica no cultivar GM testado na região de Londrina, o que não foi
26 observado nas outras três áreas analisadas, indicando que a transgenia neste caso não tem
27 efeito deletério sobre o fungo MA.

1 Das enzimas do solo avaliadas, houve influência da transgenia apenas sobre a celulase,
2 sendo que a parental GM apresentou maior atividade na var 2. Estes resultados podem
3 estar relacionados com a mineralização da matéria orgânica no solo, o que envolve vários
4 processos metabólicos com a ativa participação de enzimas como catalisadoras (Burns,
5 1978).

6 O fato de o fungo MA influenciar a dinâmica da rizosfera, independente da transgenia,
7 pode estar relacionado com o efeito micorrizosférico causado pela colonização das raízes
8 pelo fungo MA e as mudanças quali e quantitativas que ocorrem nos exsudatos radiculares
9 (Linderman, 1988; Marschner & Baumann, 2003). A formação de agregados estáveis do
10 solo também pode ter efeito indireto na comunidade microbiana rizosférica por melhorar as
11 condições físico-química do solo (Andrade et al., 1998b; Moreira & Siqueira, 2006). Andrade
12 et al. (1998b) observaram o aumento da biomassa microbiana no solo devido à formação de
13 poros habitáveis. Nesse contexto, as populações de *pseudomonas* fluorescentes,
14 solubilizadores de fosfato, proteolíticos, ciliados e flagelados podem ter se beneficiado da
15 interação fungo-planta. Por outro lado, os fungo MAs também são estimulados por
16 rizobactérias (Andrade et al., 1998a) e por microrganismos solubilizadores de fosfato
17 (Delorenzini et al., 1979). Nesse contexto, o aumento do número de bactérias dos diferentes
18 ciclos biogeoquímicos podem ter favorecido o aumento de protozoários no solo, já que são
19 sua principal fonte de nutrientes (Andrade, 2004).

20 No entanto, o fungo MA também pode ter efeito negativo sobre os grupos funcionais de
21 microrganismos. Neste estudo, as populações de celulolíticos e amilolíticos foram menores
22 nas plantas micorrizadas, o mesmo encontrado por Matsumoto et al. (2005). Este efeito
23 pode ocorrer devido a imobilização de amido por parte do fungo micorrízico no início da
24 colonização micorrízica.

25 Mudanças na composição da comunidade microbiana podem influenciar a atividade das
26 enzimas na rizosfera (Marschner & Timonem, 2005). O fato de a celulase ser a única enzima
27 que apresentou maior atividade nas plantas micorrizadas nas duas variedades pode estar
28 relacionado com o aumento da atividade microbiana devido ao efeito micorrizosférico e a

1 competição por fonte de C solúvel, já que a baixa quantidade de matéria orgânica no solo
2 pode influenciar os microrganismos a liberarem uma maior quantidade de enzimas,
3 aumentando a possibilidade de contato com o seu substrato. No entanto, uma maior
4 atividade enzimática também pode ser relacionada com uma maior eficiência de
5 mineralização de substâncias orgânicas provenientes das raízes (Badiane et al., 2001)

6 A atividade da urease não apresentou diferenças significativas na var 1. No entanto, na
7 var 2, as plantas inoculadas com fungos MA apresentaram maior atividade rizosférica. O
8 aumento da atividade da urease também foi encontrado em outras espécies de plantas.
9 Caravaca et al. (2003) observaram que *Retama sphaerocarpa* inoculadas com *G.*
10 *intraradices* apresentaram maiores atividades da urease e fosfatase ácida. Por outro lado, a
11 atividade da desidrogenase, asparaginase e fosfatase ácida foram menores nos tratamentos
12 micorrizados, sendo que a transgenia não apresentou nenhum efeito. A influência do fungo
13 MA na atividade da fosfatase ácida é controversa, Caravaca et al. (2003) relataram que
14 plantas com inoculação de fungo MA apresentaram maior atividade dessa enzima na
15 rizosfera. No entanto, Joner & Jakobsen (1995) constataram que a atividade da fosfatase
16 ácida não variou diretamente devido à influência do fungo micorrízico e sim com a alteração
17 de exsudatos provenientes dessa associação. O efeito observado nas duas variedades de
18 soja micorrizadas pode estar relacionado com a baixa fertilidade do solo, pois, não se sabe
19 se FMA produzem diferentes efeitos nas propriedades bioquímicas do solo, como a
20 atividade enzimática (Alguacil et al., 2005).

21 A colonização micorrízica estimulou a formação de nódulos nas raízes da soja e a
22 biomassa fresca e seca da parte aérea, assim como a fixação de N pode ter estimulado a
23 micorrização. Este efeito sinérgico entre *Bradyrhizobium* e fungo MA é bastante
24 conhecido, e descrito por vários trabalhos (Antunes et al., 2006; Barea et al., 1997;
25 Duponnois & Plenchette, 2001).

26 Pode-se concluir que a soja transgênica apresentou influência apenas sobre a
27 biomassa de N na var 1 e na colonização micorrízica e atividade da celulase na var 2,

1 mostrando que os produtos do transgene inserido não alteraram a maioria das
2 interações microbianas ocorrentes no solo e sua funcionalidade.

3

4

5 **Referências Bibliográficas**

6

7 Alguacil MM, Caravaca F; Roldán A (2005) Changes in rhizosphere microbial activity
8 mediated by native or allochthonous AM fungi in the reforestation of a Mediterranean
9 degraded environment. *Biol Fertil Soils* 41:59-68

10 Anderson JM, Ingram JSI (1993) *Tropical soil biology and fertility: a handbook of methods.*
11 CAB international, Wallingford, pp 221

12 Andrade G, De Leij FAAM, LynchJM (1998a) Plant mediated interactions between
13 *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum* and arbuscular mycorrhizae on pea.
14 *Letters in Applied Microbiology* 26:311-316

15 Andrade G, Linderman RG, Bethlenfalvay GJ (1998b). Bacterial associations with the
16 mycorrhizospher and hyphospher of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*.
17 *Plant and Soil* 202:79-87

18 Andrade G (2004) Role of functional groups of microorganisms on the rhizosphere microcosm
19 dynamics. In: Varma A, Abbott L, Werner D, Hampp R (eds.) *Plant Surface Microbiology.*
20 Springer-Verlag, Berlin, pp 57-69

21 Antunes PM, Deaville D, Goss MJ (2006) Effect of two AMF life strategies on the tripartite
22 symbiosis with *Bradyrhizobium japonicum* and soybean. *Mycorrhiza* 16:167-173

23 Badiane NNY, Chotte JL, Patea E, Masse D, Rouland C (2001) Use of soil enzyme
24 activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical
25 regions. *Applied Soil Ecology* 18:229-238

26 Barea JMC, Azcón-Aguilar C, Azcón R (1997) Interactions between mycorrhizal fungi and
27 rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil-plant systems. In: Gange

- 1 AC, Brown VK (eds) Multitrophic interactions in terrestrial systems. Backwell Science,
2 Cambridge, pp 65-67
- 3 Braga DPV, Berger GU, Lavrik PB (2003) Soja Roundup Ready[®]. In: Andrade G, Berger GU,
4 Favoretto LRG, Lavrik PB (eds) Soja Roundup Ready[®] – Estudo Piloto de Avaliação
5 Ambiental no Brasil. Monsanto–Imagine, São Paulo, pp 15-16
- 6 Braak CJF, Smilauer P (1998) Canoco Reference Manual and User's Guide to Canoco for
7 Windows: Software for Canonical Community Ordination (version 4). Microcomputer Power,
8 Ithaca, pp 352
- 9 Brookes PC, Landman A, Pruden G, Jenkinson DS (1985) Chloroform fumigation and the
10 release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomass
11 nitrogen in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 17:837-842
- 12 Burns RG (1978) Soil enzymes. Academic Press, New York, pp 364
- 13 Caravaca F, Alguacil MM, Figueroa D, Barea JM, Róldan A (2003) Re-establishment of
14 *Retama sphaerocarpa* as a target species for reclamation of soil physical and biological
15 properties in a semi-arid Mediterranean area. *Forest Ecology and Management* 182:49-58
- 16 Casida JLE, Klein DA, Santoro T (1964) Soil dehydrogenase activity. *Soil Science* 98:371-376
- 17 Delorenzini C, Barea JM, Olivares J (1979) Fertilización biológica (micorriza + *Rhizobium* +
18 fobobacterias) de *Trifolium pratense* en diferentes condiciones de cultivo. *Rev Latinoam*
19 *Microbiol* 21:129-134
- 20 Dobbelaere S, Vandrleyden J, Ocon Y (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in
21 the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22:107-149
- 22 Dunfield KE, Germida JJ (2004) Impact of GM Crops on microbial Biodiversity. *J. of*
23 *Environ.Quality* 33:806–815
- 24 Duponnois R, Plenchette C, Bâ AM (2001) Growth stimulation of seventeen fallow leguminous
25 plants inoculated with *G. aggregatum* in Senegal. *European Journal of Soil Biology* 37:181-
26 186
- 27 FAO (1994) Soil map of the world. Revised legend with corrections. FAO UNESCO,
28 Wageningen: ISRIC, pp 140

- 1 Ferreira LHPL, Molina JC, Brasil C, Andrade G (2003) Evaluation of *Bacillus thuringiensis*
2 bioinsecticidal protein effects on soil microorganisms. *Plant and Soil* 256:161-168
- 3 Galli AJB, Montezuma MC (2005) Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na
4 agricultura - Monsanto do Brasil Ltda. ACADCOM Gráfica e Editora Ltda., pp 66
- 5 Gianessi LP, Silvers CS, Sankula S, Carpenter JE (2002) Current and potential impact for
6 improving pest management in U.S. Agriculture: an analysis of 40 case studies. *Plant*
7 *biotechnology*. Washington DC: National Center for Food and Agricultural Policy,
8 <http://www.ncfap.org/40CaseStudies.htm>
- 9 Giovanetti M, Mosse B (1980) Evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular
10 mycorrhizal infections in roots. *New Phytologist* 84:489-500
- 11 Joner EJ, Jakobsen I (1995) Growth and extracellular phosphatase activity of arbuscular
12 mycorrhizal hyphae as influenced by soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*
13 27:1153-1159
- 14 Kato K, Itoh K (1983) New selective media for *Pseudomonas* strains producing fluorescent
15 pigment. *Soil Science Plant Nutrition* 29:525 – 532
- 16 Küster E, Williams ST (1964) Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature*
17 202:928-929
- 18 Linderman RG (1988) Mycorrhizal interaction with the rhizosphere microflora: the
19 mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78:366-371
- 20 Linderman RG, Davis EA (2004) Varied response of marigold (*Tagetes* spp.)
21 genotypes to inoculation with different arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia*
22 *horticulturae* 99:67-78
- 23 Marschner H, Dell B (1994) Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* 159:89-
24 102
- 25 Marschner P, Baumann K (2003) Changes in bacterial community structure induced by
26 mycorrhizal colonization in split-root maize. *Plant and Soil* 251:279-289

- 1 Marschner P, Timonem S (2005) Interactions between plant species and mycorrhizal
2 colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. *Applied Soil Ecology*
3 28:23-36
- 4 Matsumoto LS, Martines AM, Avanzi MA, Albino UB, Brasil CB, Saridakis DP, Rampazo LGL,
5 Zangaro W, Andrade G (2005) Interactions among functional groups in the cycling of, carbon,
6 nitrogen and phosphorus in the rhizosphere of three successional species of tropical woody
7 trees. *Applied Soil Ecology* 28:57-65
- 8 Moreira FMS, Siqueira JO (2006) *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Editora UFLA, Lavras,
9 pp 729
- 10 Nahas E, Andrade G, Andrioli JL, Sanomiya LT (2003) Fungos Micorrízicos Arbusculares In:
11 Andrade G, Berger GU, Favoretto LRG, Lavrik PB (eds) *Soja Roundup Ready® – Estudo*
12 *Piloto de Avaliação Ambiental no Brasil*. Monsanto–Imagine, São Paulo, pp 27-28
- 13 Newman EI (1966) A method for estimating the total length of root in a sample. *J. Appl Ecol.*
14 3:139-145
- 15 Nodari RO, Guerra MP (2001) Avaliação de riscos ambientais de plantas
16 transgênicas. *Cadernos de Ciência e Tecnologia* 18:91-116
- 17 Nogueira MA, Albino UB, Brandão-Júdiar O, Braun G, Cruz MF, Dias BA, Duarte RTD,
18 Gioppo NMR, Menna P, Orlandi JM, Raiman M, Rampazo LGL, Santos MA, Silva MEZ, Vieira
19 FP, Torezan JMD, Hungria M, Andrade G (2006) Promising indicators for assessment of
20 agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern
21 Brazil. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 115:237-247
- 22 Pelaez V, Albergoni L, Guerra MP (2004) Soja Transgênica versus Soja Convencional: Uma
23 análise comparativa de custos e benefícios. *Caderno de Ciência & Tecnologia* 21:279-309
- 24 Phillips JM, Hayman AS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic
25 and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for assessment of infection. *Transactions of the*
26 *British Mycological Society* 55:158-161

- 1 Pivato B, Mazurier S, Lemanceau P, Siblot S, Berta G, Mougél C, van Tuinen D (2007)
2 *Medicago* species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi
3 associated with roots. *New Phytologist* 176:197–210
- 4 Pontecorvo G, Roper JA, Hemon LM, Macdonalds KD, Buffon AWJ (1953) The genetic of
5 *Aspergillus nidulans*. *Adv. Gen.* 5:141–238
- 6 Schinner F, von Mersi W (2003) Xylanase-, CM-cellulase and invertase activity in soil: an
7 improved method. *Soil Biology & Biochemistry* 22:511-515
- 8 Schloter M, Dilly O, Munch JC (2003) Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture*
9 *Ecosystems & Environment* 98:255-262
- 10 Siciliano SD, Germida JJ (1999) Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of
11 field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non transgenic *B. napus*
12 cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. *FEMS Microbiology Ecology* 29:263–272
- 13 Sylvester-Bradley R, Akasawa N, La Torranca S, Magalhães FM, Oliveira LA, Pereira RM
14 (1982) (Quantitative culturing of phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of
15 gramineous and leguminous forage plants of Amazon). *Acta Amazônica* 12:15–22
16
- 17 Siqueira JO, Trannin ICB, Ramalho MAP, Fontes EMG (2004) Interferences in the agrisystem
18 and environmental risks of herbicide tolerant and insect protected transgenic crops. *Cadernos*
19 *de Ciência & Tecnologia* 21:11-81
- 20 Tabatabai MA, Bremner JM (1969) Use of *p*-nitrophenol phosphate for assay of soil
21 phosphatase activity. *Soil Biology & Biochemistry* 1:301-307
- 22 Tabatabai MA, Bremner JM (1972) Assay of urease activity in soil. *Soil Biology &*
23 *Biochemistry* 4:479-487
- 24 Tótola MR, Chaer GM (2002) Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores
25 dos solos. *Tópicos em Ciência do Solo* 2:195-276
- 26 Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS (1987) An extraction method for measuring soil
27 microbial biomass C. *Soil Biology & Biochemistry* 19:703-707

- 1 Valois ACC (2003) Possibilidade de uso de genótipos modificados e seus benefícios –
- 2 Embrapa Informação Tecnológica. ISSN, Brasília, pp 65
- 3 Vincent JM (1970) Manual for the practical study of root nodule bacteria. Burgues and Son,
- 4 Oxford, pp 164
- 5 Weaver RW, Augle S, Bottomly PJ, Bezdicek D, Smith S, Tabatabai A, Wollum A (1994)
- 6 Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties. Soil Sci. Soc.
- 7 Am, Madison, pp 1121
- 8 Wood PJ (1980) Specificity in the interactions of direct dyes with polysaccharides. Carbohydr.
- 9 Res. 85:271–287
- 10 Wolfenbarger LL, Phifer PR (2000) The ecological risks and benefits of genetically engineered
- 11 plants. Science 290:2088-2093
- 12 Woome PL (1994) Most probable number counts. In: Weaver RW, Angle S, Bottomley P,
- 13 Bezdicek D, Smith S, Tabatabai A, Wollum A (eds) Methods of Soil Analysis. Part 2.
- 14 Microbiological and Biochemical Properties. Soil Sci. Soc. Am., Madison, pp 59-79

Tabela 1. Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de fungo MA sobre alguns grupos funcionais de microrganismos e aspectos microbiológicos relacionados à biomassa microbiana de N, na rizosfera da soja var 1. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Colonização micorrízica (AM), *Pseudomonas* fluorescente (FP), Solubilizadores de fosfato (PS), Celulolíticos (Cel), Amilolíticos (Ami), Proteolítico (Prot), Ciliados (Cil), Flagelados (Fla), Biomassa microbiana de N (N biom).

Treatment	AM	FP	PS	Cel	Ami	Prot	Cil	Fla	N biom
	(%)		(Log cfu g dry soil ⁻¹)				(Log NMP)		($\mu\text{g N g dry soil}^{-1}$)
Plant (n= 60)									
Non-GMP	73.70a	5.75a	5.52a	5.58a	5.88a	6.22a	3.95a	3.49a	17.77a
GMP	70.30a	6.00a	5.58a	5.58a	5.91a	6.50a	4.06a	3.28a	11.08b
AM Fungi									
Non-AM	-	5.54b	5.15b	5.84a	5.88a	5.94b	3.55b	2.93b	14.91a
AM	-	6.21a	5.95a	5.31b	5.92a	6.78a	4.46a	3.83a	13.94a
ANOVA (p values)									
Plant	0.583	0.140	0.783	0.992	0.682	0.165	0.697	0.592	0.022
MA	-	<0.01	<0.01	<0.01	0.632	<0.01	<0.01	0.023	0.735
PGM*MA	-	0.797	0.636	0.512	0.116	0.799	0.841	0.487	0.153

Tabela 2. Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de fungo MA sobre alguns grupos funcionais de microrganismos e aspectos microbiológicos relacionados à biomassa microbiana de N, na rizosfera da soja var 2. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Colonização micorrízica (AM), *Pseudomonas* fluorescente (FP), Solubilizadores de fosfato (PS), Celulolíticos (Cel), Amilolíticos (Ami), Proteolítico (Prot), Ciliados (Cil), Flagelados (Fla), Biomassa microbiana de N (N biom).

Treatment	AM	FP	PS	Cel	Ami	Prot	Cil	Fla	N biom
	(%)		Log cfu g dry soil ⁻¹)				(Log NMP)		($\mu\text{g N g dry soil}^{-1}$)
Plant (n= 60)									
Non-GMP	80.50a	6.16a	5.39a	5.68a	5.99a	6.64a	4.13a	3.12a	12.48a
GMP	64.60b	6.13a	5.49a	5.69a	6.04a	6.59a	3.88a	2.97a	12.34a
AM Fungi									
Non-AM	-	5.84b	4.91b	6.01a	6.16a	6.47a	3.69b	2.75a	12.17a
AM	-	6.46a	5.97a	5.37b	5.87b	6.77a	4.32a	3.33a	12.66a
ANOVA (p values)									
Plant	0.077	0.854	0.626	0.912	0.687	0.781	0.327	0.708	0.876
MA	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.105	0.019	0.159	0.964
PGM*MA		0.270	0.249	0.679	0.187	0.597	0.509	0.300	0.854

Tabela 3. Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de fungo MA sobre a atividade enzimática de algumas enzimas que participam dos ciclos do N [Urease (Ure), Asparaginase (Asp)], do C [Desidrogenase (Dhd), Celulase (CeU)] e do P [Fosfatase ácida (Aph)] na rizosfera da soja var 1. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Treatment	Ure	Asp	Dhd	Aph	Ceu
	($\mu\text{g N g dry soil}^{-1}$)		($\mu\text{gTFF g dry soil}^{-1}$)	($\mu\text{g p-nitrofenol g dry soil}^{-1}$)	($\mu\text{g glicose g dry soil}^{-1}$)
Plant (n= 60)					
Non-GMP	39.40a	20.50a	2.56a	190.94a	267.70a
GMP	39.90a	18.60a	1.90a	211.39a	278.93a
AM Fungi					
Non-AM	45.90a	25.80a	2.70a	214.12a	217.27b
AM	33.20a	13.30b	1.76b	188.21b	329.35a
ANOVA (p values)					
Plant	0.969	0.747	0.067	0.093	0.620
MA	0.277	0.043	<0.01	0.034	<0.01
PGM*MA	0.362	0.208	0.476	0.547	0.529

Tabela 4. Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de fungo MA sobre a atividade enzimática de algumas enzimas que participam dos ciclos do N [Urease (Ure), Asparaginase (Asp)], do C [Desidrogenase (Dhd), Celulase (CeU)] e do P [Fosfatase ácida (Aph)] na rizosfera da soja var 2. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Treatment	Ure	Asp	Dhd	Aph	Ceu
	($\mu\text{g N g dry soil}^{-1}$)		($\mu\text{gTFF g dry soil}^{-1}$)	($\mu\text{g p-nitrofenol g dry soil}^{-1}$)	($\mu\text{g glicose g dry soil}^{-1}$)
Plant (n= 60)					
Non-GMP	36.40a	15.80a	1.65a	189.99a	269.82b
GMP	45.70a	16.10a	1.66a	206.15a	342.82a
AM Fungi					
Non-AM	31.90b	24.90a	1.79a	202.01a	253.37b
AM	50.30a	7.00b	1.52a	203.14a	359.28a
ANOVA (p values)					
Plant	0.300	0.950	0.958	0.538	<0.01
MA	0.044	<0.01	0.331	0.922	<0.01
PGM*MA	0.617	0.854	0.209	0.974	0.272

Tabela 5. Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de fungo MA sobre a atividade de microrganismos Fixadores de Nitrogênio (FBN) nas raízes da soja var 1. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Peso fresco de nódulos (Nod. fresh), Peso seco de nódulos (Nod dry), Número de nódulos (Number of nod).

Treatment	Nod. fresh (mg)	Nod. dry (mg)	Number of nod. (n°)
Plant (n= 40)			
Non-GMP	6.00a	3.00a	7.25a
GMP	13.00a	1.00a	5.25a
AM Fungi			
Non-AM	3.00b	0.6b	4.05b
AM	17.00a	3.6a	8.45a
ANOVA (p values)			
Plant	0.191	0.116	0.372
MA	0.012	0.026	0.054
PGM*MA	0.402	0.372	0.822

Tabela 6. Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de fungo MA sobre a atividade de microrganismos Fixadores de Nitrogênio (FBN) nas raízes da soja var 2. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Peso fresco de nódulos (Nod. fresh), Peso seco de nódulos (Nod dry), Número de nódulos (Number of nod).

Treatment	Nod. fresh (mg)	Nod. dry (mg)	Number of nod. (n°)
Plant (n= 40)			
Non-GMP	20.00a	6.00a	9.55a
GMP	17.00a	5.00a	7.20a
AM Fungi			
Non-AM	10.00b	3.20b	7.00a
AM	28.00a	7.60a	9.75a
ANOVA (p values)			
Plant	0.593	0.702	0.222
MA	<0.01	0.041	0.154
PGM*MA	0.458	0.219	0.085

Tabela 7. Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de fungo MA sobre os parâmetros de crescimento da soja var 1. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Peso fresco de parte aérea (Shoot fresh), Peso seco de parte aérea (Shoot dry).

Treatment	Shoot fresh (g)	Shoot dry (g)
Plant (n= 40)		
Non-GMP	1.69a	0.35a
GMP	1.60a	0.31a
AM Fungi		
Non-AM	1.36b	0.26b
AM	1.93a	0.39a
ANOVA (p values)		
Plant	0.700	0.554
MA	0.020	0.060
PGM*MA	0.959	0.905

Tabela 8. Efeito da transgenia (GMP) e da colonização de fungo MA sobre os parâmetros de crescimento da soja var 2. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Peso fresco de parte aérea (Shoot fresh), Peso seco de parte aérea (Shoot dry).

Treatment	Shoot fresh (g)	Shoot dry (g)
Plant (n= 40)		
Non-GMP	2.04a	0.47a
GMP	2.03a	0.48a
AM Fungi		
Non-AM	1.79b	0.41a
AM	2.28a	0.55a
ANOVA (p values)		
Plant	0.959	0.901
MA	0.085	0.123
PGM*MA	0.553	0.668

Legendas das Figuras

Figura 1. Plano fatorial da Análise dos Componentes Principais (ACP) baseada nos grupos funcionais de microrganismos do solo avaliados ⁽¹⁾ e nos tratamentos analisados ⁽²⁾. ⁽¹⁾ *Fla*: flagelados, *Cil*: ciliados, *Prot*: Proteolíticos, *Ami*: amilolíticos, *HB*: bactérias heterotróficas, *PS*: solubilizadores de fosfato, *Act*: Actinomicetos, *Fungi*: fungos saprofiticos, *FP*: pseudomonas fluorescente, *Cel*: celulolíticos, *N biom*: biomassa de N, *C biom*: Biomassa de C, ⁽²⁾ *C1 N-AM*: soja convencional var 1 não-micorrizada, *C1 AM*: soja convencional var 1 micorrizada, *T1 N-AM*: soja transgênica var 1 não-micorrizada, *T1 AM*: soja transgênica var 1 micorrizada. Eixo 1 = 45.9%; eixo 3 = 33.8%.

Figura 2. Plano fatorial da Análise dos Componentes Principais (ACP) baseada nos grupos funcionais de microrganismos do solo avaliados ⁽¹⁾ e nos tratamentos analisados ⁽²⁾. ⁽¹⁾ *Fla*: flagelados, *Cil*: ciliados, *Prot*: Proteolíticos, *Ami*: amilolíticos, *HB*: bactérias heterotróficas, *PS*: solubilizadores de fosfato, *Act*: Actinomicetos, *Fungi*: fungos saprofiticos, *FP*: pseudomonas fluorescente, *Cel*: celulolíticos, *N biom*: biomassa de N, *C biom*: Biomassa de C, ⁽²⁾ *C2 N-AM*: soja convencional var 2 não-micorrizada, *C2 AM*: soja convencional var 2 micorrizada, *T2 N-AM*: soja transgênica var 2 não-micorrizada, *T2 AM*: soja transgênica var 2 micorrizada. Eixo 2 = 10.1%; eixo 3 = 71.4%.

Figura 3. Plano fatorial da Análise dos Componentes Principais (ACP) baseada na atividade de enzimas relacionadas ao Ciclo do Carbono, Nitrogênio, Fósforo e Atividade Biológica ⁽¹⁾ e nos tratamentos analisados ⁽²⁾. ⁽¹⁾ *Ceu*: celulase, *Ure*: urease, *Asp*: asparaginase, *Aph*: fosfatase ácida, *Dhd*: desidrogenase, ⁽²⁾ *C1 N-AM*: soja convencional var 1 não-micorrizada, *C1 AM*: soja convencional var 1 micorrizada, *T1 N-AM*: soja transgênica var 1 não-micorrizada, *T1 AM*: soja transgênica var 1 micorrizada. Eixo 1 = 71.5%; eixo 2 = 7.3%.

Figura 4. Plano fatorial da Análise dos Componentes Principais (ACP) baseada na atividade de enzimas relacionadas ao Ciclo do Carbono, Nitrogênio, Fósforo e Atividade Biológica ⁽¹⁾ e nos tratamentos analisados ⁽²⁾. ⁽¹⁾ *Ceu*: celulase, *Ure*: urease, *Asp*: asparaginase, *Aph*: fosfatase ácida, *Dhd*: desidrogenase, ⁽²⁾ *C2 N-AM*: soja convencional var 2 não-micorrizada, *C2 AM*: soja convencional var 2 micorrizada, *T2 N-AM*: soja transgênica var 2 não-micorrizada, *T2 AM*: soja transgênica var 2 micorrizada. Eixo 1 = 21.2%; eixo 2 = 65.7%.

Figura 5. Plano fatorial da Análise dos Componentes Principais (ACP) baseada nos parâmetros de crescimento da planta ⁽¹⁾ e nos tratamentos analisados ⁽²⁾. ⁽¹⁾ *Shoot fresh*: peso fresco da parte aérea, *Shoot dry*: peso seco da parte aérea, *Root fresh*: Peso fresco de raiz, *Root dry*: peso seco de raiz, *Total root length*: comprimento total de raiz, *Specific root length*: comprimento específico de raiz, ⁽²⁾ *C1 N-AM*: soja convencional var 1 não-micorrizada, *C1 AM*: soja convencional var 1 micorrizada, *T1 N-AM*: soja transgênica var 1 não-micorrizada, *T1 AM*: soja transgênica var 1 micorrizada. Eixo 1 = 67.8%; eixo 2 = 26.1%.

Figura 6. Plano fatorial da Análise dos Componentes Principais (ACP) baseada nos parâmetros de crescimento da planta ⁽¹⁾ e nos tratamentos analisados ⁽²⁾. ⁽¹⁾ *Shoot fresh*: peso fresco da parte aérea, *Shoot dry*: peso seco da parte aérea, *Root fresh*: Peso fresco de raiz, *Root dry*: peso seco de raiz *Total root length*: comprimento total de raiz, *Specific root length*: comprimento específico de raiz, ⁽²⁾ *C2 N-AM*: soja convencional var 2 não-micorrizada, *C2 AM*: soja convencional var 2 micorrizada, *T2 N-AM*: soja transgênica var 2 não-micorrizada, *T2 AM*: soja transgênica var 2 micorrizada. Eixo 2 = 34.6%; eixo 3 = 53.9%.

Figura 1

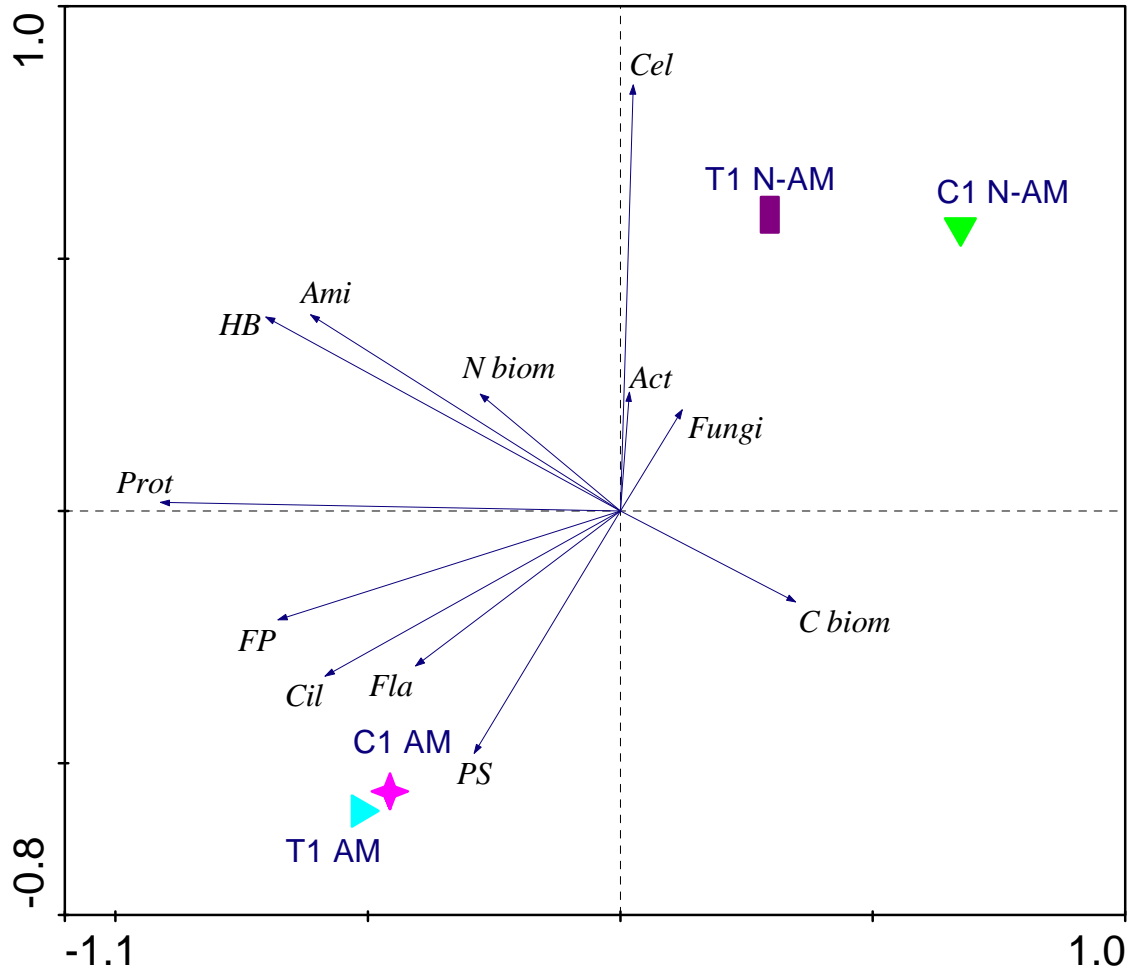


Figura 2

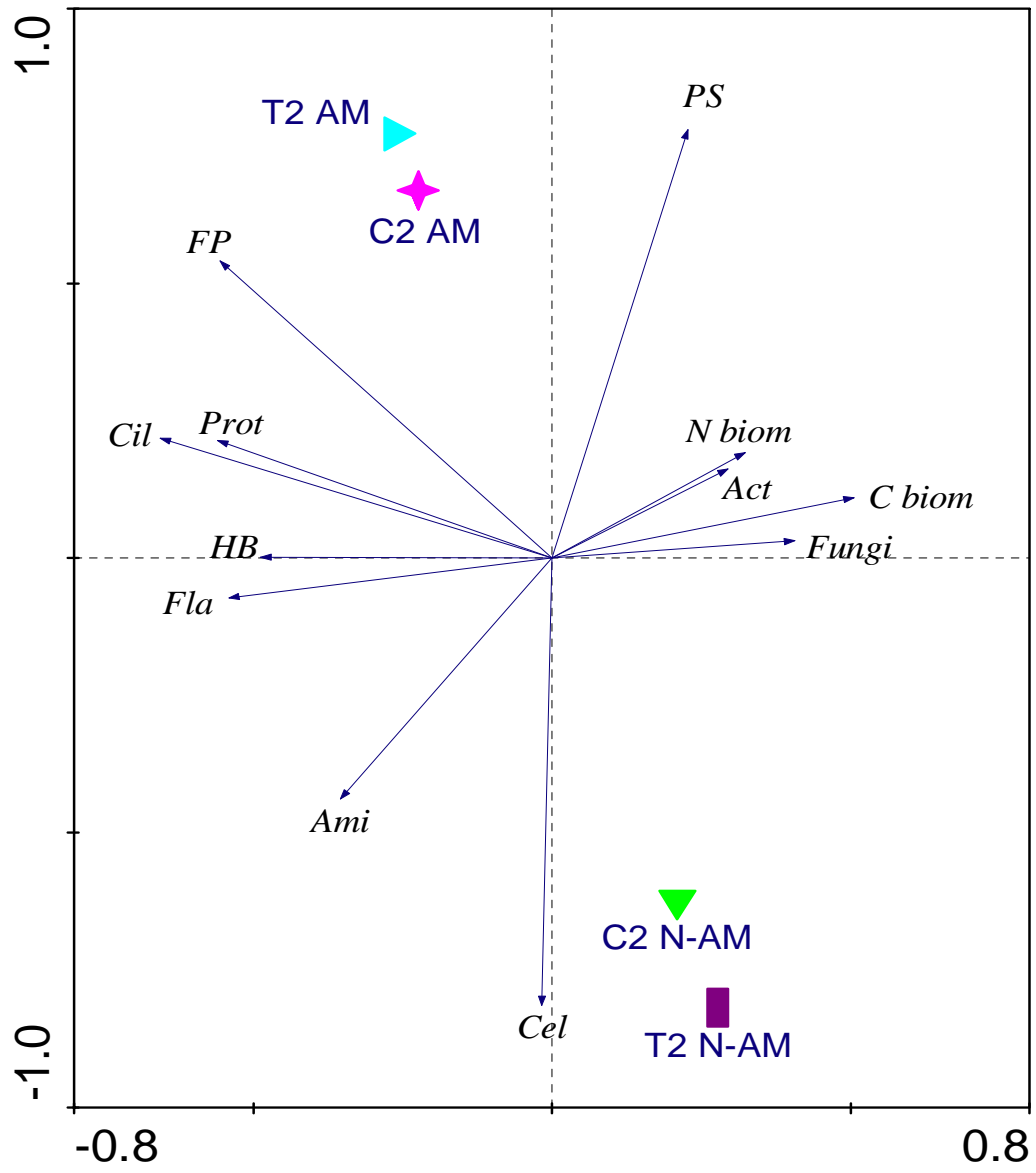


Figura 3

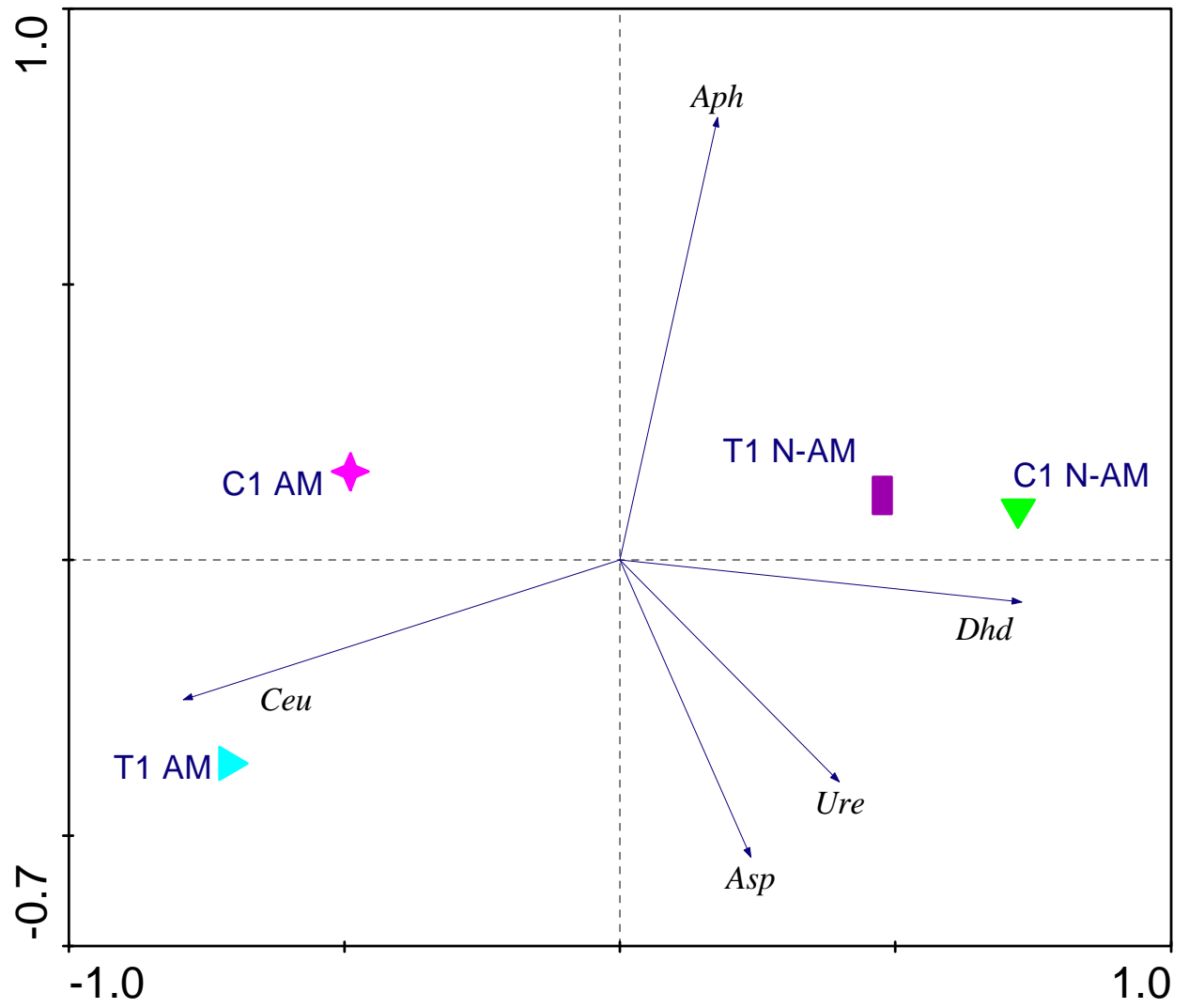


Figura 4

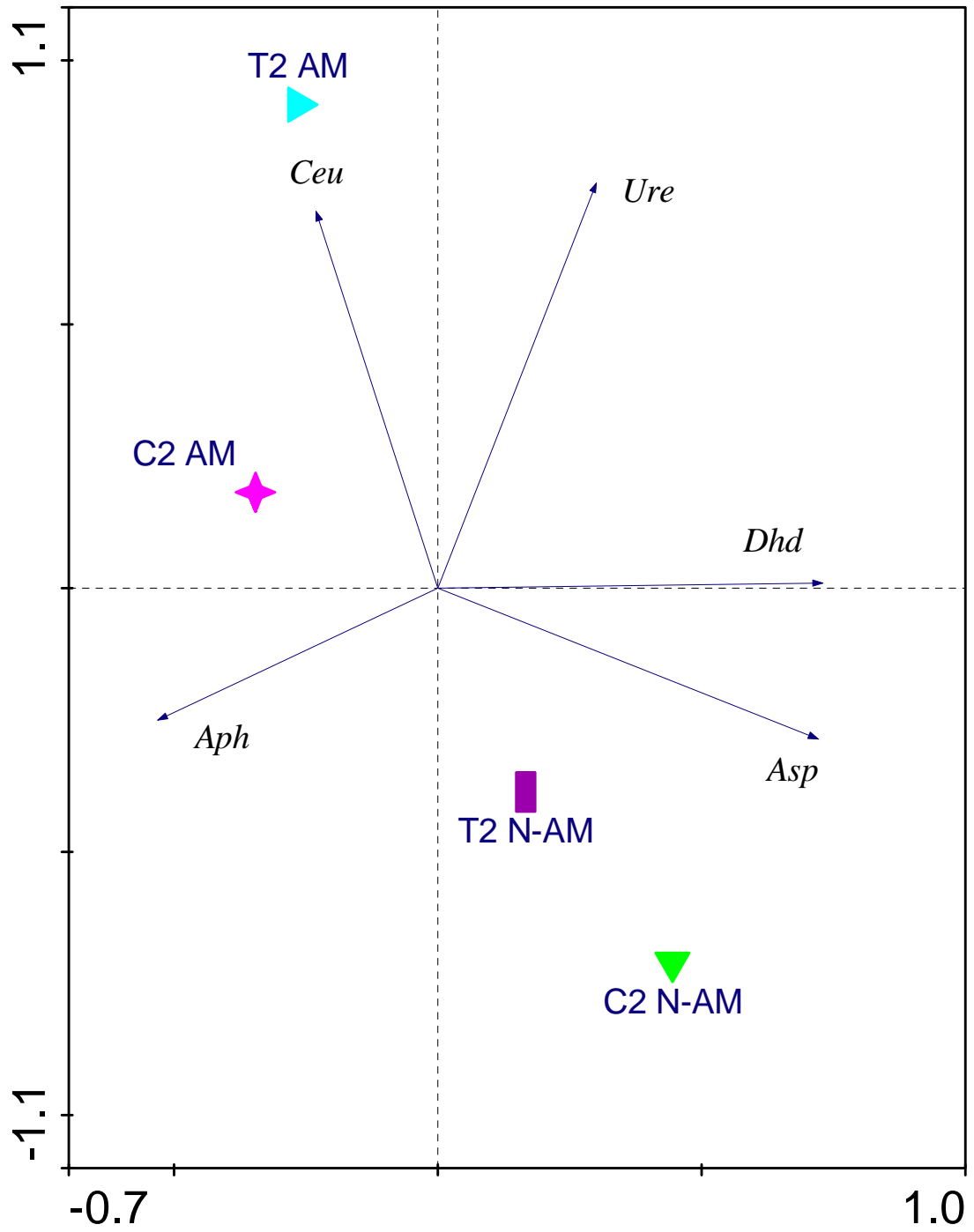


Figura 5

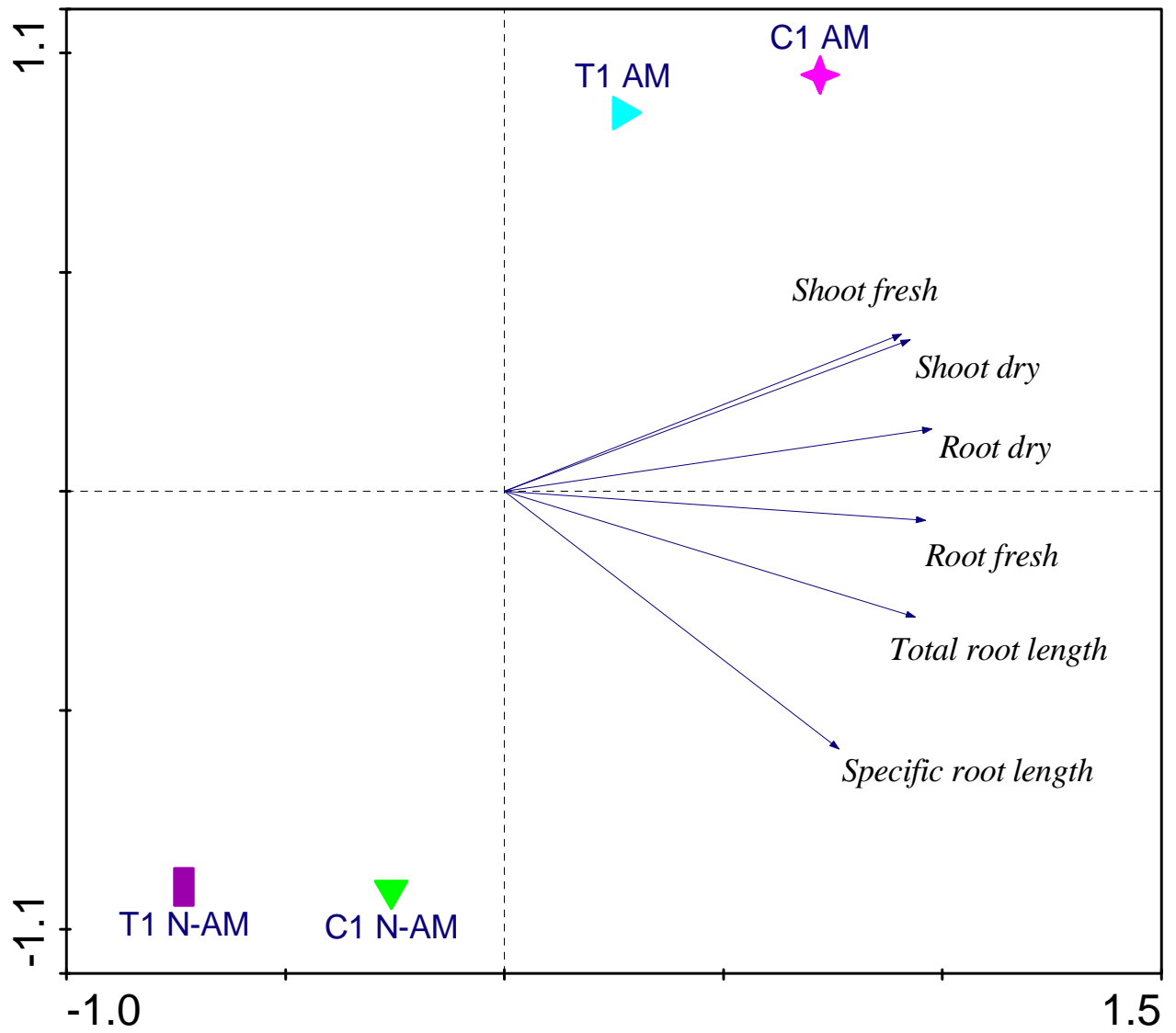
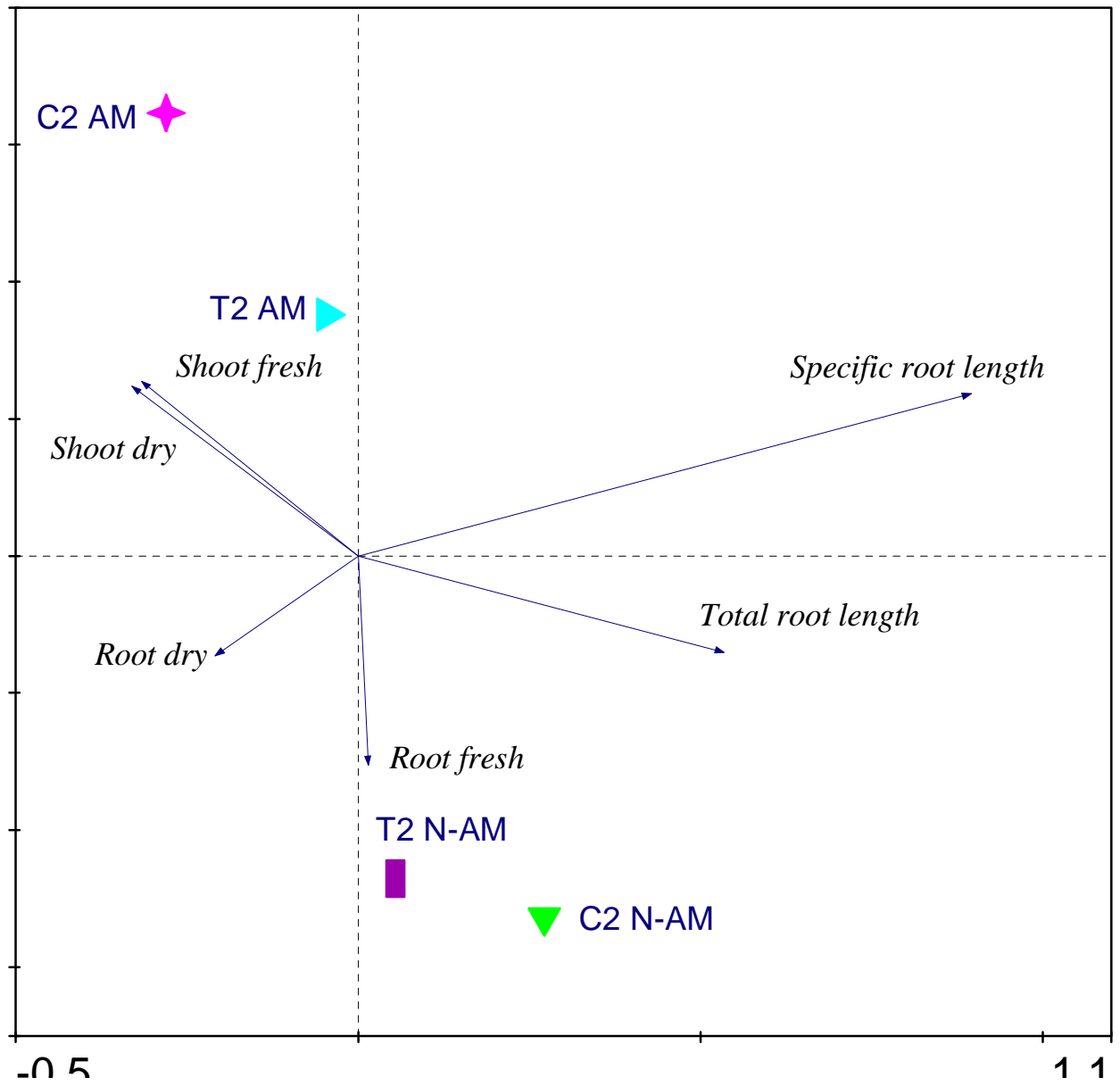


Figura 6



REFERÊNCIAS

- ALLIPRANDINI, L.F.; TOLEDO, J.F.F.; FONSECA, Jr.N.; ALMEIDA, L.A.; KIIHL, R.A.S. Análise de adaptação e estabilidade de genótipos de soja no Estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 9, p. 1321-1328, 1998.
- AMADOR, J.A.; GLUCKSMAN, A.M.; LYONS, J.B.; GORRES, J.H. Spatial distribution of soil phosphatase activity within a riparian forest. **Soil Science**, v. 162, p. 808-825, 1997.
- ANDRADE, G.; LINDERMAN, R.G.; BETHLENFALVAY, G.J. Bacterial associations with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Plant and Soil**, v. 202, p. 79-87, 1998.
- ANDRADE, G. Role of functional groups of microorganisms on the rhizosphere microcosm dynamics. In: VARMA A., ABBOTT L., WERNER, D., HAMPP, R. (eds.), **Plant Surface Microbiology**. Springer-Verlag, Berlin, p. 57-69, 2004.
- ANDRÉA, M.M.de; PERES, T.B.; LUCHINI, L.C.; BAZARIN, S.; PAPINI, S.; MATALLO, M.B.; SAVOY, V.L.T. Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1329-1335, 2003.
- ANGLE, J.S. Release of transgenic plants: Biodiversity and population-level considerations. **Mol. Ecol.**, v. 3, p. 45-50, 1994.
- ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R.; ABARKELI, R.B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 52, p. 799–804, 2003.
- BADIANE, N.N.Y.; CHOTTE, J.L.; PATEA, E.; MASSE, D.; ROULAND, C. Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. **Applied Soil Ecology**, v. 18, p. 229-238, 2001.
- BARTON, J.E.; DRACUP, M. Genetically modified crops and the environment. **Agron. J.**, v. 92, p. 797–803, 2000.
- BIRCH, A.N.E.; GEOGHEGAN, I.E.; MAJERUS, M.E.N.; HACKETT, C.; GATEHOUSE, A.M.R. Tri-trophic interactions involving pest aphids, predatory 2-spot ladybirds and transgenic potatoes expressing snowdrop lectin for aphid resistance. **Mol. Breed.**, v. 5, p. 75-83, 1999.
- BONATO, E.R.; BONATO, A.L.V. A soja no Brasil: história e estatística. **Londrina: EMBRAPA – CNPSo**, p. 61, 1987.

- BRAGA, D.P.V.; BERGER, G.U.; LAVRIK, P.B. Soja Roundup Ready[®]. In: ANDRADE, G.; BERGER, G.U.; FAVORETTO, L.R.G.; LAVRIK, P.B. (Eds.) **Soja Roundup Ready[®] – Estudo Piloto de Avaliação Ambiental no Brasil**. Monsanto – Imagine, São Paulo, p. 38, 2003.
- BUSSE, M.D.; RATCLIFF, A.W.; SHESTAK, C.J.; POWERS, R.F. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 1777-1789, 2001.
- BUSHMAN, F. **Lateral DNA transfer-mechanisms and consequences**. Spring Harbor:Coldspring Press, p. 464, 2002.
- CARPENTER, J.; FELSOT, A.; GOODE, T.; HAMMIG, M.; ONSTAD, D.; SANKULA, S. **Comparative environmental impacts of biotechnology-derived and traditional soybean, corn, and cotton crops**. Ames: Council for Agricultural Science and Technology, 2002.
- CASTRO, O.M.; PRADO, H.; SEVERO, A.C.R.; CARDOSO, E.J.B.N. Avaliação da atividade de microrganismos do solo em diferentes sistemas de manejo de soja. **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 50, n.2, p. 212-219, 1993.
- CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. Principais aspectos da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 21, n. 3, p. 507-515, 2003.
- CIB 2007 Brasil lidera a expansão de lavouras transgênicas com crescimento de 3,5 milhões de hectares em 2007. **Conselho de Informação sobre Biotecnologia**. Disponível em: http://www.cib.org.br/em_dia.php?id=975. Acesso, 03 Fev, 2007.
- COLE, D.J. Mode of action of glyphosate – a literature analysis. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**, p. 49-54. Butterworths, Londres, 1985.
- CONNER, A.J.; Dale, P.J. Reconsideration of pollen dispersal data from field trials of transgenic potatoes. **Theoretical Appl. Genetics**, v. 88, p. 770-774, 1996.
- COSTANZA, R.; D'ARGE, R.; GROOT, R.; FARBER, S.; GRASSO, M.; HANNON, B.; LIMBURG, K.; NAEEM, S.; O'NEIL, R. V.; PARUELO, J.; RASKIN, R. G.; SUTTON, P.; BELT, M. D. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, v. 387, n. 6630, p. 253–260, 1997.
- COX, C. Glyphosate factsheet. **Journal of Pesticide Reform**, v. 108, n. 3, fall 1998 and revised 2000. Disponível em: <http://www.Mindfully.org/pesticide/Roundup-Glyphosate-Factsheet-Cox.html>. Acesso em: 03 Ago, 2006.

CTNBio **Comissão Técnica Nacional de Biossegurança**. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br>. Acesso em 10 Fev, 2007.

- DE LUCA, T.H.; KEENEY, D.R. Soluble anthrone reactive carbon in soils: effect of carbon and nitrogen amendments. **Soil Science Society of America Journal**, v. 57, p. 1296-1300, 1993.
- DOBBELAERE, S.; VANDRLEYDEN, J; OCON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v 22, p. 107-149, 2003.
- DONEGAN, K.K.; SEIDLER, R.J.; FIELAND, V.J.; SCHALLER, D.L.; PALM, C.J.; GANIO, L.M.; CARDWELL, D.M.; STEINBERGER, Y. Decomposition of genetically engineered tobacco under field conditions: Persistence of the proteinase inhibitor I product and effects on soil microbial respiration and protozoa, nematode and microarthropod populations. **J. Appl. Ecol.**, v. 34, p. 767-777, 1997.
- DUNFIELD, K.E.; GERMIDA, J.J. Impact of GM Crops on microbial Biodiversity. **J. of Environ.Quality.**, v. 33, p. 806–815, 2004.
- EASTHAM, K.; SWEET, J. Genetically modified organisms (GMOs): The significance of gene flow through pollen transfer. **Environ. Issue Rep.** v. 28 [Online]. Disponível em http://reports.eea.eu.int/environmental_issue_report_2002_28/en European Environ. Agency, Copenhagen, 2002. Acesso em 08 Jun, 2006.
- EBERBACH, P. L.; DOUGLAS, L. A. Herbicide effects on the growth and nodulation potential of *Rhizobium trifolii* with *Trifolium subterraneum* L. **Plant and Soil**, v. 119, p. 15-23, 1989.
- EDMONDS INSTITUTE. Manual for assessing ecological and human health effects of genetic engineered organisms. Washington, p. 159, 1998. Disponível em: www.edmonds-institute.org/manp1os.pdf. Acesso em 08 Fev, 2007.
- ELLSTRAND, N. C. **Dangerous liaisons: when cultivated plants mate with their relatives**. Baltimore, MD: John Hopkins Univ. Press, p. 268, 2003.
- EMBRAPA, **Tecnologias de produção de soja – Paraná 2005**. Sistemas de Produção / Embrapa Soja, n. 5, p. 224, 2004.
- ERVIN, D.E.; WELSH, R.; BATIE, S.S.; CARPENTIER, C.L. Review : Towards an ecological systems approach in public research for environmental regulation of transgenic crops. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 99, p. 1-14, 2003.

- FONTES, E.G.; SANTOS, I.K.S.M.; GAMA, M.I.C. A biossegurança de plantas cultivadas transgênicas. In: TEIXEIRA, P.; VALLE, S. (Orgs.). **Biossegurança**. Uma abordagem multidisciplinar. Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 313-327, 1996.
- GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, M.C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. Monsanto do Brasil Ltda. ACADCOM Gráfica e Editora Ltda., 2005.
- GAZZIERO, D.L.P.; MACIEL, C.D.G.; SOUZA, R.T.; VELINI, E.D.; PRETE, C.E.C.; OLIVEIRA NETO, W. Deposição de Glyphosate Aplicado para Controle de Plantas Daninhas em Soja Transgênica. **Planta Daninha**, v. 24, n. 1, p. 173-181, 2006.
- GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annu. Rev. Entomol**, v. 43, p. 701-726, 1998.
- HAYANO, K. Cellulase complex in tomato field soil: induction, localization and some properties. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 18, p. 215-219, 1986.
- HAYMAN, D.S. The physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Canadian Journal of Botany**, v. 61, p.944-963, 1983.
- HO, M-W.; TRAAVIK, T.; OLSVIK, O.; TAPPESER, B.; HOWARD, C.V.; VAN WEIZSACKER, C.; MCGAVIN, G.C. Gene technology and gene ecology of infectious diseases. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 10, p.33-59, 1998.
- KLOSE, S.; TABATABAI, M.A. Urease activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. **Biology and Fertility of Soils**, v.31, p.191-199, 2000.
- LEITE, M. Arautos da Razão – A paralisia no debate sobre transgênicos e meio ambiente. **Novos Estudos**, v. 78, p. 41-47, 2007.
- LOSEY, J.E. Transgenic pollen harms monarch larvae. **Nature**, p. 399:314, 1999.
- MALLIK, M.A.B.; TESFAI, K. Pesticidal effect on soybean-rhizobia symbiosis. **Plant and Soil**, v. 85, p. 33-41, 1985.
- MANN, C.C. Crop scientists seek a new revolution. **Science**, v. 283, p. 310-314, 1999.
- MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil Science**. v. 159, p. 89-102, 1994.

- MARSCHNER, P.; TIMONEM, S. Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. **Applied Soil Ecology**, v. 28, p. 23-36, 2005.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2ª ed., Editora UFLA, Lavras, p. 729, 2006.
- NIELSEN, K.M. An assessment of factors affecting the likelihood of horizontal transfer of recombinant plant DNA to bacterial recipients in the soil and phytosphere. **Biosafety Reviews**, v. 1, p. 96-149, 2003.
- NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v. 18, p. 91-116, 2001.
- NOGUEIRA, M.A.; ALBINO, U.B.; BRANDÃO-JÚDIOR, O.; BRAUN, G.; CRUZ, M.F.; DIAS, B.A.; DUARTE, R.T.D.; GIOPPO, N.M.R.; MENNA, P.; ORLANDI, J.M.; RAIMAN, M.; RAMPAZO, L.G.L.; SANTOS, M.A.; SILVA, M.E.Z.; VIEIRA, F.P.; TOREZAN, J.M.D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, G. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.115, p. 237-247, 2006.
- PALM, C.J.; SCHALLER, D.L.; DONEGAM, K.K.; SEIDLER, R.J. Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki d-endotoxina. **Can. J. Microbiol.**, v. 42, p. 1258-1262, 1996.
- PALUMBI, S. R. Humans as the world's greatest evolutionary force. **Science**, v. 293, p. 1786-1790, 2001.
- PASCUAL, J.A.; GARCÍA, C.; HERNÁNDEZ, M.T.; MORENO, J.L.; ROS, M. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation processes. **Soil biology and Biochemistry**, v. 32, p. 1877-1883, 2000.
- PATERNIANI, E. From wild to transgenic plants. **Caderno de Ciência e Tecnologia**, v. 8, n. 1, p. 169-178, 2001.
- PELAEZ, V.; ALBERGONI, L.; GUERRA, M.P. Soja Transgênica versus Soja Convencional: Uma análise comparativa de custos e benefícios. **Caderno de Ciência & Tecnologia**, v. 21, n. 2, p. 279-309, 2004.
- PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J.B.; TORNISIELO, V.L. Influência da matéria orgânica na sorção e dessorção do glifosato em solos com diferentes atributos mineralógicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 947-951, 2000.
- RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B.; SANTOS, P.S.J. Melhoramento de espécies autógamas. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.DE; VALADARES-

- INGLIS, M.C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Fundação MT, Rondonópolis, 2001.
- RISSLER J, MELON M. **The ecological risks of engineered crops**. The MIT Press, Massachusetts, p. 160, 1996.
- ROCHA, M.M. **Seleção de linhagens experimentais de soja para adaptabilidade e estabilidade fenotípica**. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, p. 173, 2002.
- SALA, O.E.; CHAPIN, F.S.; ARMESTO, J.J.; BERLOW, E.; BLOOMFIELD, J.; DIRZO, R.; HUBER-SANWALD, E.; HUENNEKE, L.F.; JACKSON, R.B.; KINZIG, A.; LEEMANS, R.; LODGE, D.M.; MOONEY, H.A.; OESTERHELD, M.; POFF, N.L.; SYKES, M.T.; WALKER, B.H.; WALKER, M.; WALL, D.H. Global biodiversity scenarios for the year 2100. **Science**, v. 287, p. 1770-1774, 2000.
- SAXENA, D.; FLORES, S.; STOTZKY, G. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. **Nature**, v. 402, p. 480-489, 1999.
- SIQUEIRA, J.O.; TRANNIN, I.C.B.; RAMALHO, M.A.P.; FONTES, E.M.G. Interferences in the agrisystem and environmental risks of herbicide tolerant and insect protected transgenic crops. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 21, n. 1, p. 11-81, 2004.
- SOUZA, A.P.de; LOURES, E.G.; SILVA, J.F.da; RUIZ, H.A. Efeito do Oxyfluorfen, 2,4-D e Glyphosate na atividade microbiana de solos com diferentes texturas e conteúdos de matéria orgânica. **Planta Daninha**, v. 14, n. 1, p. 55-64, 1996.
- STOTZKY, G. Gene transfer among bacteria in soil. In: LEVY, S.B.; MILLER, R.V.(ed.). **Gene transfer in the environment**. McGraw-Hill, New York, p. 165-222, 1989.
- SYVADAN, M. Horizontal gene transfer: evidence and possible consequences. **Annual Review of Genetics**, v. 28, p. 237-261, 1994.
- TEBBE, C.C.; VAHJEN, W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast. **Applied of Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2657–2665, 1993.
- TIEDJE, J.M.; COLWELL, R.K.; GROSSMAN, Y.L.; HODSON, R.E.; LENSKI, R.E.; MACK, R.N.; REGAL, P.J. The planned introduction of genetically engineered organisms – Ecological considerations and recommendations. **Ecology**, n.2, v. 70, p. 298-315, 1989.
- TILMAN, D.; FARGIONE, J.; WOLFF, B.; D'ANTONIO, C.; DOBSON, A.; HOWARTH, R.; SCHINDLER, D.; SCHLESINGER, W.H.; SIMBERLOFF, D.; SWACKHAMER,

- D. Forecasting Agriculturally driven global environmental change. **Science**, v. 292, p. 281–284, 2001.
- TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 240-245, 2002.
- TÓTOLA, M.R.; CHAQER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores dos solos. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 2, p. 195-276, 2002.
- TREVORS, J.T. Dehydrogenase activity in soil: a comparison between the INT and TTC assay. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 16, p. 673-674, 1984.
- VALOIS, A.C.C. **Possibilidade de uso de genótipos modificados e seus benefícios** Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p.65, 2003.
- WEAVER, R.W.; AUGLE, S.; BOTTOMLY, P.J.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties. **Soil Science Society of America, Madison**, p. 775-833, 1994.
- WOLFENBARGER, L.L.; PHIFER, P.R. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. **Science**, v. 290, p. 2088-2093, 2000.
- ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; COUTINHO, H.L.C.; NEVES, M.C.P. Diversidade Microbiana com Indicador de Qualidade de Solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n.3, p. 391-411, 2003.