

Fundação Universidade Federal da Grande Dourados
Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade
PPGECB - UFGD



AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE FÚNGICA DE SOLO SOB CULTIVO DE
ALGODÃO BT

Ana Claudia Terumi Abe

Orientador: Prof. Dr. Marcos Gino Fernandes

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL
2011

Fundação Universidade Federal da Grande Dourados
Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade
PPGECB - UFGD



AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE FÚNGICA DE SOLO SOB CULTIVO DE
ALGODÃO BT

Ana Cláudia Terumi Abe

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Entomologia e Conservação da Biodiversidade.

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL
2011

Agradecimentos

À Deus, nosso soberano Pai, pela oportunidade de crescer com mais uma experiência.

Aos meus pais, Pedro e Dirce, pelo amor e dedicação de toda uma vida.

Ao Professor Marcos Gino Fernandes, orientador, pela confiança e pelos ensinamentos.

Ao Professor Rodrigo Matheus Pereira, co-orientador, pelo aprendizado e por estar sempre disposto a ajudar.

À minha amiga e companheira Renata Pires de Araújo.

Ao Professor Josué Raizer, pela ajuda com as análises estatísticas.

À Professora Eliana G. M. Lemos, do Departamento de Tecnologia da UNESP de Jaboticabal, pela permissão para realização de parte das análises em seu laboratório, com auxílio de sua equipe.

À Silvana Pompéia, Eliamar Pedrinho, João Carlos, Andressa da Silva, Érika, e todo o pessoal da UNESP de Jaboticabal, que nos ajudaram com as análises genéticas e que nos acolheram com tanto carinho.

Ao Eduardo pelo apoio, compreensão e incentivo nas horas difíceis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade.

Ao CNPQ pela concessão de bolsa de mestrado.

A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

Apresentação geral.....	5
Referências bibliográficas.....	8
Avaliação da comunidade fúngica de solo sob algodão Bt	12
Abstract.....	12
Resumo.....	13
Introdução.....	14
Materiais e métodos.....	16
Descrição da área de instalação da pesquisa.....	16
Método de amostragem.....	16
Coleta, armazenamento e transporte das amostras.....	17
Análise dos fatores abióticos.....	17
Quantificação das populações fúngicas.....	18
Identificação molecular dos isolados.....	19
Análise metagenômica da diversidade fúngica do solo.....	22
Resultados e Discussão.....	24
Quantificação fúngica.....	24
Identificação molecular dos isolados.....	31
Análise metagenômica do solo.....	35
Conclusões.....	38
Agradecimentos.....	38
Referências bibliográficas.....	39
Anexo I – Normas da Revista Brasileira de Entomologia.....	48

Apresentação Geral

As plantas geneticamente modificadas possuem, inseridas em seu código genético, um ou mais genes transferidos de outras espécies, e desta forma, passam a expressar características novas. Tais plantas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de expressar resistência a doenças e pragas, tolerância a herbicidas, melhoramento nutricional, resistência a condições adversas como seca e falta de nitrogênio, além de outras finalidades. Desde 1996, quando as primeiras culturas transgênicas foram produzidas comercialmente, a área global com plantios geneticamente modificados tem aumentado consistentemente (James 2010; Icoz & Stotsky 2008). Dentre as plantas transgênicas, a soja resistente a herbicida é a cultura mais plantada no mundo, seguido do milho Bt e do algodão Bt, consecutivamente (James 2010).

O algodão transgênico Bt, geneticamente modificado resistente a insetos possui o gene da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911, que codifica a produção da proteína cristal Cry 1Ac. Esta proteína, denominada de δ -endotoxina, tem ação tóxica para larvas de insetos da ordem Lepidoptera (Borém 2004).

O algodão Bt tem proporcionado benefícios ambientais e econômicos devido à diminuição do uso de inseticidas (Cattaneo *et al.* 2006; Schwember 2008). No Brasil, esse cultivo transgênico levou a uma queda de 20% nos gastos com inseticidas quando comparados com o algodão convencional (Sant'Ana *et al.* 2009). Porém, alguns países apresentaram índices de redução maiores. A Índia e a China, por exemplo, registraram, respectivamente, uma queda de 70% e mais de 80% na aplicação de inseticidas (Huang *et al.* 2002; Qaim & Zilberman 2003).

A introdução de plantas transgênicas nos ecossistemas agrícolas, entretanto, tem potencial de causar efeitos adversos sobre organismos não-alvos e, dessa forma, afetar direta ou indiretamente a biodiversidade do solo (Dale *et al.* 2002; Cowgill & Atkinson

2003; Dutton *et al.* 2003; Liu *et al.* 2005; Rose 2006; Lilley *et al.* 2006; Sanvido *et al.* 2007). As proteínas inseticidas atingem o solo por diferentes vias, sendo as principais: a deposição por exsudatos radiculares, queda dos grãos de pólen e incorporação da biomassa vegetal transgênica durante o desenvolvimento das plantas e após a colheita, onde atuam em diversas interações biológicas e físico-químicas (Saxena & Stotzky 2003). Essas proteínas estão sujeitas a processos de remoção, adsorção, degradação microbiana ou pela radiação solar, desnaturação e ingestão por representantes da fauna, os quais determinam sua persistência e atividade no solo (Crecchio & Stotzky 2001).

Cerca de 80 a 90% dos processos que ocorrem no solo são reações mediadas por microrganismos (Nanipieri *et al.* 2003). Portanto, mudanças na diversidade microbiana do solo podem alterar irreversivelmente a dinâmica funcional do sistema solo-planta. Dentre os microrganismos do solo, os fungos desempenham papéis extremamente complexos e fundamentais para o ecossistema (Bridge & Spooner 2001), em especial na decomposição de matéria orgânica, na ciclagem de nutrientes, no estabelecimento de relações simbióticas e na agregação do solo (Andrade *et al.* 1998; Borie *et al.* 2008). Enquanto alguns fungos são conhecidos por causar uma série de doenças em plantas, outros se destacam por antagonizar fitopatógenos e estimular o crescimento das plantas (Marschner *et al.* 2001; Martin *et al.* 2001).

Estima-se que existam 1,5 milhões de espécies de fungos na natureza, mas apenas uma faixa de 5% a 10% destas foram descritas formalmente (Hawksworth 1991; Hawksworth & Rossman 1997). Devido às limitações inerentes às técnicas de cultivo e isolamento de microrganismos, e considerando que os fungos são um grupo fisiologicamente diverso, apenas uma porção da população fúngica pode ser recuperada por meio desta metodologia (Kirk *et al.* 2004). O desenvolvimento da tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) e o desenho de iniciadores utilizados na

amplificação do gene ribossomal permitiram que uma maior fração da comunidade microbiana do solo fosse revelada (Handelsman 2004). Os genomas da microbiota total encontrada em uma comunidade são denominados coletivamente de metagenoma (Handelsman 2004).

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar os efeitos que o cultivo do algodão Bt exerce sobre a comunidade de fungos que habitam o solo, por meio de duas abordagens: isolamento e cultivo dos fungos em meio de cultura; e, extração do DNA total do solo e construção de biblioteca metagenômica de fungos. Inicialmente, a região escolhida para o sequenciamento do DNA foi a do gene 18S, porém, devido a problemas nas etapas de amplificação e clonagem, os eletroferogramas resultantes do sequenciamento tiveram pouca confiabilidade na leitura dos nucleotídeos. Ante ao exposto, e considerando que a região ITS do DNA ribossômico tem sido uma ferramenta bastante utilizada na taxonomia de fungos (Gomes *et al.* 2002), foram utilizados iniciadores que amplificam a referida região.

Esta pesquisa constitui o primeiro levantamento da comunidade fúngica de solo do Estado de Mato Grosso do Sul utilizando técnicas de sequenciamento de DNA, e representa um avanço do conhecimento da diversidade fúngica não cultivável do solo, bem como uma contribuição ao entendimento da biogeografia dos fungos.

O artigo que segue está formatado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Entomologia, anexo I. No entanto, para melhor visualização, as figuras e tabelas foram colocadas na ordem em que aparecem no texto, e não em arquivos separados, conforme especificado na norma da revista.

Referências Bibliográficas

- Andrade, G.; K. L. Mihara; R. G Linderman; G. J. Bethlenfalvay. 1998. Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. **Plant and Soil** **202**: 89-96.
- Borém, A. 2004. **Biotecnologia e Meio Ambiente**. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 425 p.
- Borie, F.; R., Rubio; A. Morales. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi and soil aggregation. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition** **8**: 9-18.
- Bridge, P. & B. Spooner. 2001. Soil fungi: diversity and detection. **Plant Soil** **232**:147–154.
- Cattaneo, M. G.; C. Yafuso; C. Schmidt; C. Y.Huang; M. Rahman; C. Olson; C. Ellers-Kirk; B. J. Orr; S. Marsh; L. Antilla; P. Dutilleul; Y. Carriere. 2006. Farm-scale evaluation of the impacts of transgenic cotton on biodiversity, pesticide use, and yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **103**: 7571-7576.
- Cowgill, S.E. & H. J. Atkinson. 2003. A sequential approach to risk assessment of transgenic plants expressing protease inhibitors: effects on nontarget herbivorous insects. **Transgenic Research** **12**: 439–449.
- Crecchio, C. & G. Stotzky. 2001. Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* bound on complexes of montmorillonite-humic acids-A1 hydroxypolymers. **Soil Biology & Biochemistry** **33**: 573-581.

Dale, P. J.; B. Clarke; E. M. G. Fontes. 2002. Potential for the environmental impact of transgenic crops. **Nature Biotechnology** **20**: 567–574.

Dutton, A.; J. Romeis; F. Bigler. 2003. Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods: Bt-maize expressing Cry1Ab as a case study. **Biocontrol** **48**: 611–636.

Gomes, E.A.; M. C. M., Kasuya; E. G., Barros; A. C., Borges. 2002. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. **Genetics and Molecular Biology** **25**:477-483.

Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular*. **Biology Reviews** **68**: 669-685.

Hawksworth, D. L. 1991. The fungal dimensioned biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Micology Research** **95**: 641–655.

Hawksworth D. L. & Y. A. Rossman. 1997. Where are all the undescribed fungi? **Phytopathology** **87**: 888–891.

Huang, J.; S. Rozelle; C. Pray; Q. Wang. 2002. Plant biotechnology in China. **Science** **295**: 674-676.

Icoz, I. & G. Stotzky. 2008. Cry3Bb1 protein from *Bacillus thuringiensis* in root exudates and biomass of transgenic corn does not persist in soil. **Transgenic Research** **17**:609– 620.

James, C. 2010. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. ISAAA Briefs No. 42. The International Service for the Acquisition of Agri-biotech

Applications, Ithaca, NY. Disponível em:

<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/executivesummary/pdf/Brief%2042%20-%20Executive%20Summary%20-%20English.pdf>. (Acesso em 20 de Abril de 2011).

Kirk, J. L.; L. A. Beaudette; M. Hart; P. Moutoglis; J. N. Kliromos; H. Lee; J. T.

Trevors. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods 58**: 169-188.

Lilley, A. K.; M. J. Bailey; C. Cartwright; S. L. Turner; P. R. Hirsch. 2006. Life in earth: the impact of GM plants on soil ecology? **Trends in Biotechnology 24**: 9–14.

Liu, B.; Q. Zeng; F. M. Yan; H. G. Xu; C. R. Xu. 2005. Effects of transgenic plants on soil microorganisms. **Plant and Soil 271**: 1–13.

Marschner, P.; D. E. Crowley; R. Lieberei. 2001. Arbuscular mycorrhizal infection changes the bacterial 16S rDNA community composition in the rhizosphere of maize. **Mycorrhiza 11**:297–302.

Martin, F. M.; S. Perotto; P. Bonfante. 2001. Mycorrhizal fungi: a fungal community at the interphase between soil and roots, p. 263–296. In R. Pinton, Z. Varanini, and P. Nannipieri (ed.), **The rhizosphere**. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y

Nannipieri, P.; J. Ascher; M. T. Ceccherini; L. Landi; G. Pietramellara; G. Renella. 2003. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science 54**: 655-670.

Qaim, M. & D. Zilberman. 2003. Yield effects of genetically modified crops in developing countries. **Science 299**: 900- 902.

Rose, R. I. 2006. Tier-based testing for effects of proteinaceous insecticidal plant-incorporated protectants of non-target arthropods in the context of regulatory risk assessments. **IOBC/wprs Bulletin 29**: 143–149.

Sant'anna A.; J. V. Ferraz; M. L. M. Silva (Coord). **Agriannual 2009**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: IFNP, 2009. p. 163-16.

Sanvido, O.; M. Stark; J. Romeis; F. Bigler. 2007. Ecological impacts of genetically modified crops: ten years of field research and commercial cultivation. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 107**: 235–278.

Saxena, D. & G. Stotzky. 2003. Fate and effects in soil of the insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* in transgenic plants. **Biosafety Reviews 1**: 7-83.

Schwember, A. R. 2008. An update on genetically modified crops. **Ciência e Investigación Agraria 35**: 231-250.

Avaliação da Comunidade Fúngica de Solo sob Cultivo de Algodão Bt

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of genetically modified cotton resistant to insects on the soil fungal community. The experiment was conducted in the agricultural area of Universidade Federal da Grande Dourados, where they were planted two varieties of cotton (*Gossypium hirsutum* L.), one expressing a gene from *Bacillus thuringiensis* (Bt) and the other conventional, without the foreign gene. The data were collected monthly throughout the crop cycle, from December 2009 to May 2010. The amount of fungi in the soil was obtained by the method of cultivation in Petri dishes, in triplicate, using the culture medium of Martin and serial dilutions of soil. From the isolates were obtained morphospecies that were identified by amplification and sequencing of the ITS (Internal Transcribed Spacer) region of rDNA. Metagenomics approach was used to detect differences in soil fungal community. The amount of fungal colony-forming units of the soil was not directly influenced by the type of cotton grown and not by the different growing seasons. Both techniques showed greater species richness in soil under Bt cotton.

KEYWORDS: Metagenomics; Transgenic Cotton; Microbiota; Diversity.

Avaliação da Comunidade Fúngica de Solo sob Cultivo de Algodão Bt

RESUMO

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar os efeitos de algodão geneticamente modificado resistente a insetos sobre a comunidade fúngica do solo. O experimento foi conduzido em área agrícola da Universidade Federal da Grande Dourados, onde foram cultivadas duas variedades de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), uma expressando o gene de *Bacillus thuringiensis* (Bt) e outra convencional, sem o gene exógeno. Os dados foram coletados mensalmente, durante todo o ciclo da cultura, de dezembro de 2009 a maio de 2010. A quantidade de fungos presentes no solo foi obtida pelo método de cultivo em placas de Petri, em triplicata, utilizando-se o meio de cultura de Martin e diluições seriadas de solo. Os isolados obtidos foram morfoespeciados e identificados através de amplificação e sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer* - espaço interno transcrito) do rDNA. Foi utilizada a abordagem metagenômica para detectar diferenças na comunidade fúngica do solo. A quantidade de unidades formadoras de colônias fúngicas do solo não foi diretamente influenciada pelo tipo de algodão cultivado e nem pelas diferentes épocas de cultivo. Ambas as técnicas revelaram maior riqueza de espécies no solo sob algodão Bt.

PALAVRAS-CHAVE: Metagenoma; Algodão Transgênico; Microbiota; Diversidade.

Introdução

As plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos são uma alternativa para o controle de pragas na agricultura. Dentre os cultivos transgênicos resistentes a insetos cultivados no Brasil, destaca-se o de algodão Bt (James 2010).

O algodão transgênico Bt possui o gene da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911, que codifica a produção da proteína Cry 1Ac, tornando a planta do algodão resistente às seguintes espécies de lepidópteros: curuquerê-do-algodoeiro - *Alabama argillacea* (Hübner, 1818), lagarta-rosada - *Pectinophora gossypiella* (Saunders, 1844) e lagarta-da-maçã - *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) (Borém 2004).

As plantas Bt têm proporcionado benefícios ambientais e econômicos devido à redução do uso de inseticidas (Huang *et al.* 2003), o que explica sua crescente utilização. No entanto, a introdução de plantas transgênicas nos ecossistemas agrícolas suscita questões de segurança biológica e ambiental. O potencial de impacto de culturas Bt sobre organismos não-alvo do solo deve ser considerado, uma vez que a proteína é expressa constitutivamente em todas as partes da planta (Wilkinson *et al.* 1997), de modo que tanto os resíduos vegetais produzidos durante o desenvolvimento da planta e os remanescentes após a colheita, quanto os exsudatos liberados pela raiz durante o crescimento das plantas, podem conter a toxina Bt e ser incorporada ao solo (Saxena & Stotzky 2003). Além disso, estudos mostram que a composição da comunidade fúngica do solo é fortemente influenciada pelos exsudatos radiculares das plantas (Broeckling *et al.* 2008).

Os microrganismos são essenciais para o funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas. Os processos de agregação do solo, decomposição de resíduos orgânicos, mineralização de nutrientes, controle de pragas, doenças e estabelecimento de relações

simbióticas, são realizados com a participação efetiva dos fungos (Gadd 2007). Esses microrganismos participam ainda de processos de degradação de pesticidas (Bending *et al.* 2002) e podem servir como compartimentalizadores de metais pesados do solo, diminuindo a sua toxidez para o ambiente (Moreira & Siqueira 2002).

Pesquisas revelaram que as plantas transgênicas Bt possuem uma concentração mais elevada de lignina nos tecidos vegetais, acarretando uma taxa de decomposição mais lenta (Flores *et al.* 2005; Lachnicht *et al.* 2004), o que poderia aumentar a exposição dos microrganismos do solo à toxina e também favorecer a seleção de resistência em organismos-alvo (Saxena & Stotky 2001). Aliado a isto, está o fato das toxinas manterem suas propriedades inseticidas e encontrarem-se protegidas da degradação microbiana ao se unir às partículas do solo (Palm *et al.* 1996).

Estudos sobre os efeitos das culturas transgênicas Bt para o solo vem sendo realizados em diversos países como Estados Unidos, Índia, Austrália, Itália e China (Li *et al.* 2011; Sarkar *et al.* 2008; Fu *et al.* 2007; Griffiths *et al.* 2006; Mulder *et al.* 2006; Blackwood & Buyer 2004; Saxena & Stotzky 2003). No entanto, as avaliações ambientais realizadas em determinados países, muitas vezes não podem ser validadas em outras regiões, dessa forma, são necessários estudos locais, pois os riscos ambientais dependem das características edafoclimáticas de cada região.

Avaliar a comunidade microbiana total no solo pode ser problemático, pois trata-se de um ecossistema bastante complexo. Apesar de essenciais, as técnicas dependentes de cultivo são limitadas, pois recuperam apenas uma parte das populações microbianas do solo (Kirk *et al.* 2004). A metagenômica é uma abordagem molecular de avaliação da comunidade microbiana que inclui a extração do DNA total do solo, amplificação, clonagem e sequenciamento, e que permite a detecção de espécies não cultiváveis em meio de cultura (Handelsman 2004).

O objetivo desse estudo foi determinar o efeito do algodão Bt sobre a comunidade fúngica do solo, comparando com a cultura não-Bt, por meio de: i) análise quantitativa em unidades formadoras de colônia (UFCs), ii) análise da diversidade fúngica através de cultivo em meio de cultura e identificação molecular dos isolados; e iii) análise metagenômica de fungos do solo.

Material e Métodos

Descrição da área de instalação da cultura do algodão

As variedades do algodoeiro foram cultivadas em área agrícola da Fazenda Experimental da Universidade Federal da Grande Dourados, em Dourados, Mato Grosso do Sul (Latitude 22°11'53"S, Longitude 54°55'59"W e altitude de 430 m), durante o ano agrícola 2009/2010.

A área amostral foi composta por dois campos com 5.000 m² cada um, onde foram semeados os tratamentos avaliados: cultivar de algodão-Bt (NuOpal Bollgard[®]) e sua cultivar isolinha convencional não-Bt (Delta Opal[®]), com características agronômicas semelhantes entre si. Utilizou-se o sistema de plantio-direto, tendo o milho da cultivar BRS 1501[®] (*Pennisetum glaucum* L.) como cultura antecessora. A semeadura foi realizada com uma densidade de 10 a 14 sementes por metro linear e espaçamento entre fileiras de 0,90 metros. Ambas as áreas receberam os mesmos tratamentos fitossanitários. A adubação de base foi de 450 kg.ha⁻¹ da fórmula (N-P₂O₅-K₂O, 08-20-20 + 0,3% Zn) e aos 35 dias após a emergência das plantas foram aplicados 150 kg.ha⁻¹ de Uréia (45% N). Não foram aplicados produtos inseticidas ou herbicidas durante o período de coletas das amostras de solo.

Método de amostragem

As amostragens referentes à análise química e física do solo, bem como a análise da comunidade fúngica através do cultivo em placas de Petri, foram realizadas de forma a abranger todo o período de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo das plantas, totalizando seis avaliações: a primeira um dia antes da semeadura da cultura (zero dia), a segunda aos 30 dias após a semeadura (D.A.S), a terceira aos 60 D.A.S., a quarta aos 90 D.A.S., a quinta aos 120 D.A.S. e a sexta aos 150 D.A.S. A primeira amostragem determinou as características químicas e biológicas do solo antes da implantação das culturas. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, composto por três repetições em pontos distintos e aleatórios. Para a análise metagenômica do solo foram utilizadas as amostras coletadas aos 150 D.A.S., sendo que três amostras de cada tratamento constituíram uma amostra composta.

Coleta, armazenamento e transporte das amostras

O solo utilizado nas análises foi retirado da região mais próxima das raízes: da rizosfera e rizoplano. O solo coletado foi acondicionado em sacos plásticos, no interior de caixa de isopor, para manutenção de seu teor de umidade, sendo transportado rapidamente ao laboratório de Biologia Geral da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da UFGD e conservados sob refrigeração a 4°C.

Análise dos fatores abióticos

As características químicas das amostras de solo foram mensuradas no Laboratório de Solos da Faculdade de Ciências Agrárias da UFGD. Foram realizadas as seguintes análises químicas: determinação de pH, análise de H⁺Al (acidez trocável), Ca, Mg, P, K, soma de bases (SB), capacidade de troca catiônica a pH 7,0 (CTC),

porcentagem de saturação de bases (V) e matéria orgânica do solo (M.O.S.), seguindo procedimento padrão proposto por Silva (2009). As análises de micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn) foram realizadas empregando o extrator Mehlich-1. A granulometria dos solos foi determinada em laboratório pelo método da pipeta, com dispersão de 20 g de TFSA (terra fina seca ao ar) com hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} . As areias foram separadas em peneiras de malha 0,053 mm de diâmetro e fracionadas. A argila foi separada por sedimentação, conforme a Lei de Stokes e o silte pela diferença do total menos argila e areia.

Para obter um gradiente em poucas dimensões composto pelas características do solo, utilizou-se uma análise de componentes principais (PCA) para ordenar as amostras mensais em cultivo de algodão Bt e não-Bt. Para verificar se o tempo transcorrido desde o cultivo e o tipo de algodão explicava esta ordenação, foi feita uma análise de variância multivariada (Manova). Para verificar se as características químicas e granulométricas diferem entre as variedades de algodão e entre os meses de coleta, utilizou-se uma análise de variância de Tukey a 0,05 de probabilidade para as variações significativas.

Quantificação das populações fúngicas

A microbiota ativa, na forma de unidades formadoras de colônias ($\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$), foi avaliada pela técnica de plaqueamento em superfície, em triplicata, e inoculação de suspensões seriadas utilizando meios específicos de crescimento. Para a contagem das UFC's fúngicas foi utilizado o meio de Martin (1950), constituído das seguintes substâncias: Fosfato de Potássio (1,00g), Sulfato de Magnésio (0,50g), Peptona Bacteriológica (5,00g), Glucose (10,00g), Agar (15,00g), Rosa Bengala (0,03g) e água destilada q.s.p. (1000ml). O corante Rosa Bengala foi dissolvido em 10ml de água destilada antes de ser adicionado ao meio. Foi adicionado também ao meio, momentos

antes de ser vertido nas placas a 45-50°C, uma solução de sulfato de estreptomicina (30mg/litro de meio) a 1% em álcool etílico 96 GL. Foram utilizadas 10g de cada amostra, sendo triturada cuidadosamente em um graal esterilizado, juntando-se 90ml de solução salina esterilizada. A pasta resultante foi vertida em um balão de Erlenmeyer esterilizado e agitado vigorosamente por 5 min. Esta suspensão constituiu a diluição 10^{-1} . Dessa suspensão, foi transferido 1ml para o tubo de ensaio contendo 9ml de solução salina e homogeneizada manualmente, constituindo a diluição 10^{-2} . Novamente foi transferido 1ml desta suspensão para outro tubo contendo 9ml de solução salina. Repetiu-se esse procedimento até obter-se uma diluição de 10^{-4} (adaptado de Neder, 1992). Após inoculação de 0,1 ml de cada diluição por placa, as mesmas foram invertidas e incubadas em estufa climatizada, a 25°C, durante sete dias. Os resultados obtidos da contagem de UFC's e discriminação das morfoespécies foram comparados entre os dois tratamentos, os fungos cultivados foram isolados de acordo com as características morfoculturais e fotografados. Utilizou-se, eventualmente, o método de microcultivo para evidenciar os caracteres morfológicos.

Para verificar se a quantidade de fungos difere entre as variedades de algodão e os meses de coleta, realizou-se análise de variância considerando a interação entre estes dois fatores e um teste de comparações múltiplas de Tukey a 0,05 de probabilidade para as variações significativas.

Identificação molecular dos isolados

A identificação molecular dos isolados foi realizada no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) no Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Campus de Jaboticabal. Os fungos isolados foram morfoespeciados por meio de comparação das características

culturais de crescimento, como coloração, relevo, textura e presença de pigmento. Um exemplar de cada morfoespécie foi escolhido para a identificação molecular. A primeira etapa para a extração do DNA foi o cultivo dos isolados em meio líquido BD (batata e dextrose), que permaneceram em câmara climatizada a 25°C durante uma semana. Após este período, os fungos foram peneirados e lavados para retirada dos resíduos de meio de cultura, secos em papel toalha e macerados com nitrogênio líquido até a formação de pó. O micélio macerado foi colocado em tubos de 2ml e acrescentados 750µl de solução tampão de extração (100mM Tris pH 8.0, 50mM EDTA pH 8.0, 500mM NaCl, 1% SDS dodecil sulfato de sódio) previamente aquecido. Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a 65°C por 40min, sendo agitado a cada 10min. Ao atingir a temperatura ambiente, os tubos foram acrescidos de 400µl de acetato de potássio, invertidos cuidadosamente e deixados no gelo por 30min. Posteriormente, foram centrifugados a 12.000 rpm por 10min a 10°C. Em seguida, os sobrenadantes resultantes foram transferidos para novos tubos. Acrescentou-se 700µl da solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), agitando-se cuidadosamente. Foram, novamente, centrifugados por 10min. Coletou-se o sobrenadante, acrescentando-se 400µl da solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Repetiram-se as etapas de agitação, centrifugação e transferência do sobrenadante. Os tubos foram colocados a -20°C overnight. Centrifugou-se novamente a 12000rpm a 10°C por 15min. Descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se ao pellet 700µl de etanol 70%. Os tubos foram centrifugados por mais 10min e descartou-se o sobrenadante. O pellet resultante foi colocado para secar e acrescentado de 50µl de TE (Tris-EDTA) 10:1 (Kuramae - Izioka 1997).

A quantidade de DNA e o grau de pureza foram estimados por densidade óptica em espectrofotômetro (NANODROP ND-1000) através da absorbância. Cada extrato de DNA foi diluído até uma concentração de 10ng de DNA/ µl de suspensão.

O DNA extraído foi amplificado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a amplificação das regiões ITS1-5,8S-ITS2, utilizou-se o par de *primers* ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') / ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White *et al.*, 1990) (Figura 1.) para obtenção de um fragmento de cerca de 650 pb. As reações de PCR foram realizadas, utilizando-se tampão 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8,4); 0,4 µl de dNTPs, 1,5 U de Taq DNA polimerase, 50 mM de MgCl₂, 5 pmol de cada primer, 60 ng de DNA e água pura estéril q.s.p. 20 µL.

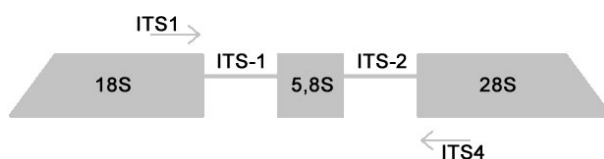


Figura 1. Desenho esquemático da localização dos *primers* utilizados.

O DNA foi amplificado em termociclador (PTC-100), com um ciclo inicial de 95°C por 4min; 35 ciclos a 94°C por 1min; 60 °C por 1min, e 72°C por 1min e 30 segundos, com um ciclo final de 10 minutos, a 72°C. O DNA do fragmento amplificado de cada isolado foi então submetido a PCR de sequenciamento utilizando-se do DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. O programa de termociclagem foi realizado da seguinte maneira: um ciclo inicial de 94°C por 2min; 39 ciclos a 94°C por 1min; 60 °C, por 1min para a reação do *primer* ITS-1 e 52 °C para o ITS-4, e 72°C por 1min e 30 segundos, com um ciclo final de 10min a 72°C.

Os eletroferogramas obtidos foram visualizados e analisados por meio do *software ABI Analysis Data Collection* e convertidos em sequências de nucleotídeos por meio do *software DNA Sequencing Analysis Software* Versão 3.3. Os eletroferogramas gerados pelo processo de sequenciamento foram submetidos ao pacote de programas *Phred/Phrap/Consed* (Gordon *et al.* 1998), para a verificação da sua qualidade,

alinhamento, corte das extremidades e retirada do vetor. Como o DNA dos isolados foi sequenciado em duplicata, foi feito um alinhamento local para confirmação da sequência. As sequências obtidas foram submetidas à comparação em banco de dados através da ferramenta BLAST (Altschull *et al.* 1997) para verificar sua similaridade em relação as sequências já depositadas no banco de dados NCBI. As análises de variância e índices de diversidade foram calculados nos softwares *Estat* e *DivEs* (Rodrigues 2005).

Análise metagenômica da diversidade fúngica do solo

A comunidade fúngica total do solo com cultivo de algodão Bt e algodão não-Bt foi avaliada por meio da abordagem metagenômica. Para esta análise, foram utilizadas as amostras da última coleta, realizada aos 150 dias após a semeadura (D.A.S.). As três amostras de cada tratamento foram homogeneizadas para compor uma amostra composta.

A extração do DNA presente no solo foi realizada com o kit de extração *FastDNA Spin Kit for Soil* (BIO 101), de acordo com instruções do fabricante. O procedimento consiste em ‘lisar’ os microrganismos presentes na amostra através de vigorosa agitação na presença de partículas de sílica e cerâmica e de tampões de homogeneização e solubilização de proteínas. Após esse procedimento, foi adicionada à suspensão uma resina de sílica para purificação do DNA, eliminando contaminantes que possam inibir reações subsequentes. Após extração o DNA foi precipitado, eluído e quantificado no espectrofotômetro, estando pronto para utilização. O DNA foi, então, amplificado conforme descrito no item anterior com o material extraído dos isolados fúngicos.

Após a reação de PCR, os produtos de amplificação foram purificados utilizando-se o *Concert™ Rapid PCR Purification System* (GibcoBRL). O produto purificado foi então clonado com o vetor pJET1.2/blunt utilizando o kit de clonagem Clone Jet (Fermentas - catálogo #K1231) de acordo com as instruções do fabricante.

As células competentes de *Escherichia coli* DH5 α utilizadas para transformação foram fornecidas pelo Laboratório de Genética de Microrganismos, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal. O processo de transformação das células competentes foi realizado por choque térmico. As bactérias transformadas foram cultivadas em meio LB (triptona, extrato de levedura, NaCl) contendo ampicilina. Os clones selecionados foram replicados em microplacas de cultivo de bactérias (*Mega Titer*) de 96 lugares, contendo 1ml de meio CG (*Circle Grow*) adicionado de Ampicilina 50 mg/ml. O DNA plasmidial dos clones selecionados foi isolado por miniprep (Sambrook & Russell 2001).

Para o sequenciamento dos clones de fragmentos utilizou-se 200-250 ng de DNA plasmidial, 3,2 pmol do iniciador M13/pUC 1211 (5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3') e M13/pUC 1201 (5' AAC AGC TAT GAC CAT G 3'), 2 μ L de DYEnamic ET Terminator (GE Healthcare), 2 μ L de tampão 5X (400 mM Tris-HCl pH 9,0; 10 mM MgCl₂) e água ultrapura para um volume final de 10 μ L. A amplificação por PCR foi realizada com as seguintes condições: 1 ciclo de 2min a 95 °C, 40 ciclos (96 °C por 10 segundos, 52 °C por 20 segundos 60 °C por 4min) e um ciclo final a 10°C por tempo indeterminado.

Após a reação de sequenciamento, os fragmentos de DNA amplificados foram precipitados e os dNTPs marcados por fluorescência não incorporados aos fragmentos de DNA recém sintetizados foram retirados por sucessivas lavagens. Para a aplicação no gel de sequenciamento as amostras foram ressuspensas em 2 μ L de tampão de

carregamento (0,2 ml de uma solução composta de 25 mM EDTA, pH 8, 50 mg/ml de “Blue Dextran”, e 1ml de formida deionizada), agitadas, submetidas a desnaturação por 2min, a 96°C e, em seguida, colocadas em gelo. O volume de 1 µL das amostras foi aplicada na canaleta. Os fragmentos foram sequenciados no aparelho ABI 377 (Perkin-Elmer), em gel *long ranger* 5% (BMA). A corrida eletroforética foi conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, Ácido bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), durante 10 horas.

Após o sequenciamento das amostras a imagem do gel gerada pelo sequenciador foi analisada pelo programa *Sequencing Analysis 3.3* gerando os eletroferogramas das sequencias. Os eletroferogramas foram submetidos ao programa *Phred/Phrap/Consed* (Gordon *et al.* 1998). As seqüências obtidas foram submetidas a comparação em banco de dados através da ferramenta BLAST (Altschull *et al.* 1997) para verificar sua similaridade em relação a seqüências já depositadas no banco de dados NCBI.

Resultados e Discussão

Quantificação fúngica

Através de análise de variância, o número médio de unidades formadoras de colônias (UFCs) de fungos obtidos em solo sob plantio de algodão Bt e não Bt não variou significativamente entre os tipos de cultura ($F = 1,39$; $gl = 1$; $p = 0,25$), nem entre os diferentes períodos de amostragem ($F = 2,21$; $gl = 5$; $p = 0,08$) (Figura 2). Portanto, a quantidade de fungos no solo não foi diretamente influenciada pelo tipo de algodão cultivado e nem pelo período da amostragem.

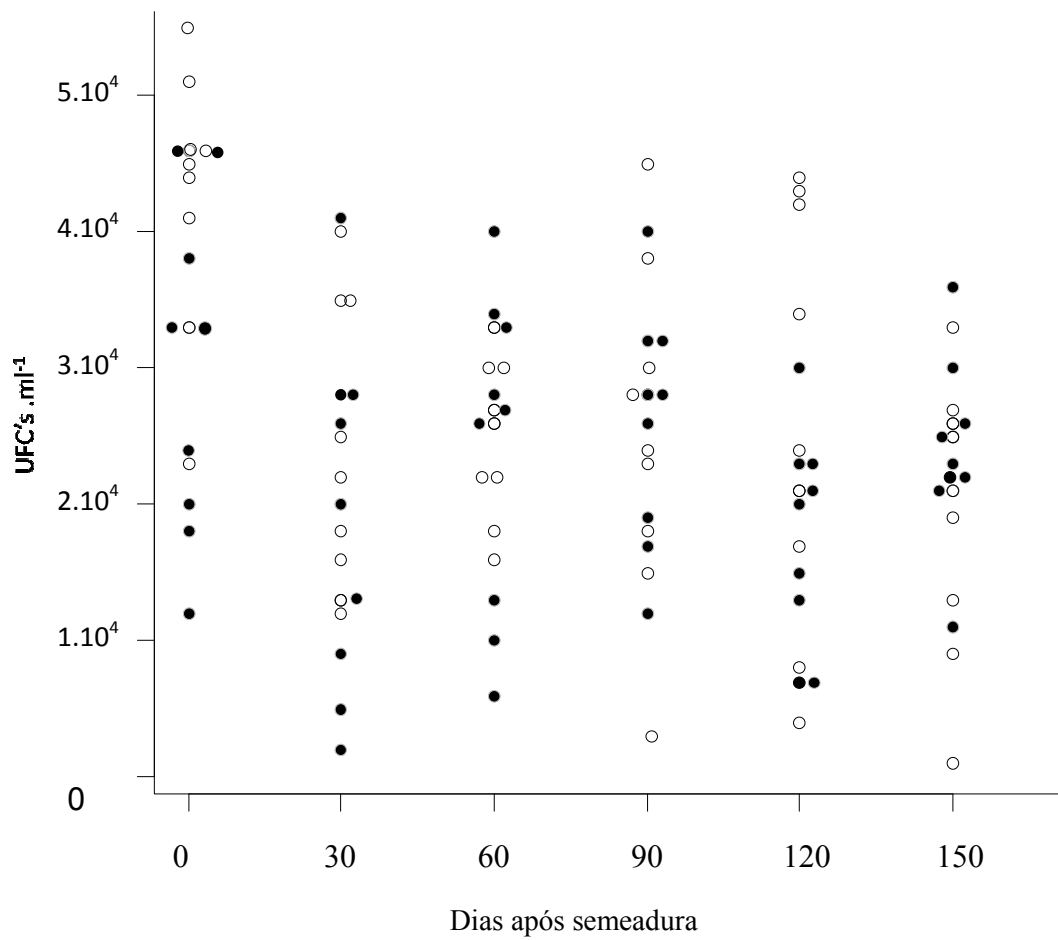


Figura 2. Quantidade de unidades formadoras de colônias em amostras de solo, com cultivo de algodão Bt (pontos vazios) e não Bt (pontos preenchidos), ao longo de 150 dias após a semeadura.

Apesar dos cultivos transgênicos causarem mudanças na qualidade e quantidade de exsudatos radiculares e na quantidade de resíduos vegetais produzidos (Li *et al.* 2009), o algodão Bt não alterou a densidade de fungos totais do solo.

Os resultados obtidos na presente pesquisa confirmam as evidências encontradas por diversos autores, que, em plantações de algodão e milho Bt, em condições de campo, não encontraram efeitos significativos em diversos grupos de microorganismos do solo, incluindo os fungos (Flores *et al.* 2005; Lang *et al.* 2006; Shen *et al.* 2006; Icoz *et al.* 2008). Griffiths *et al.* (2006, 2005), da mesma forma, não encontraram diferenças

significativas entre os níveis populacionais de fungos em solo plantado com milho Bt ao longo de três anos.

Li *et al.* (2011) não encontraram evidências de impacto de algodão Bt na microbiota fúngica e bacteriana do solo. Em seu estudo, realizado pelo período de três anos, em condições de campo, observaram que a quantificação microbiana através de cultivo em meio de cultura não foi influenciada pelo tipo de algodão. Resultado este confirmado pela presente pesquisa. Entretanto, Li *et al.* (2011) encontraram uma relação forte entre a quantificação microbiana e os diferentes estágios de crescimento da planta, sendo que as populações microbianas exibiram uma variação sazonal. Segundo Widmer (2007), os fatores ambientais ou o tipo de cultura, frequentemente, tem maiores efeitos sobre as características microbiológicas do solo do que os tratamentos transgênicos, sendo que os efeitos relatados são restritos à rizosfera das plantas transgênicas e permanecem apenas no período em que elas se encontram presentes. Saxena & Stotzky (2001) também estudaram a interferência de exsudatos radiculares provenientes de milho transgênico Bt e não-Bt na população de bactérias, fungos, protozoários, nematódeos e minhocas da rizosfera, assim como o efeito do acréscimo de biomassa de milho Bt e não-Bt no solo. Esses pesquisadores concluíram que a proteína Cry1Ab aparentemente não teve nenhum efeito deletério para tais grupos de seres vivos.

Por outro lado, alguns estudos indicam diferenças na microbiota do solo sob algodão Bt. Donegan *et al.* (1995), por exemplo, observaram que a incorporação da biomassa de duas variedades de algodão expressando Cry1Ac, aumentaram temporariamente os níveis populacionais de fungos do solo, enquanto que a proteína purificada não causou interferência na quantificação fúngica. Estudos conduzidos por Mulder *et al.* (2006), com relação ao efeito da proteína Cry1Ab sobre a comunidade microbiana do solo revelaram diferenças na quantidade de UFC's após adição de

resíduos de milho Bt no solo. As médias das UFC's, encontradas por esses autores nas primeiras semanas de desenvolvimento das plantas, nos solos com tratamentos convencionais foram cerca de um terço daqueles tratados com palha transgênica, sugerindo a existência de uma interferência da proteína estudada na microbiota do solo.

Em geral, os relatos científicos mostraram que os efeitos do algodão Bt na quantificação de fungos do solo foram transitórios e de baixa intensidade. Autores argumentam, ainda, que tais diferenças estão mais relacionadas a variações sazonais ou a outros fatores ambientais, como tipo de solo e práticas agrícolas, do que com a expressão da proteína Cry nas plantas (e.g., Heuer *et al.* 2002; Dunfield & Germida 2003; Blackwood & Buyer 2004; Griffiths *et al.* 2000, 2005; Baumgarte & Tebbe, 2005; Fang *et al.* 2007).

A presente pesquisa revelou que, dentre os parâmetros químicos avaliados, o pH (em água), o alumínio trocável, os micronutrientes ferro e cobre, e o índice de saturação de bases (V%), mostraram diferença significativa entre os tratamentos avaliados. Com exceção dos parâmetros: quantidade de matéria orgânica do solo, disponibilidade de zinco e índice de saturação de bases (V%), as características diferiram estatisticamente entre os meses de coleta (Tabela I). Beura & Rakshit (2011), apesar de relatarem um aumento na quantidade de potássio disponível e diminuição na quantidade de zinco sob plantio de algodão Bt, concluíram que não há evidências que indiquem qualquer efeito negativo do plantio Bt sobre a dinâmica de nutrientes do solo.

Tabela I. Características químicas das amostras de solo analisadas, nos dois tratamentos, Bt e não-Bt, durante o cultivo do algodão em dias após semeadura (D.A.S.)

	0 DAS		30 DAS		60 DAS		90 DAS		120 DAS		150 DAS	
	Bt	n Bt	Bt	n Bt	Bt	n Bt	Bt	n Bt	Bt	n Bt	Bt	n Bt
pH H₂O**	6,26 ^a	5,93 ^a	5,89 ^b	5,42 ^b	6,06 ^{ab}	5,87 ^{ab}	6,35 ^a	5,96 ^a	6,15 ^a	5,93 ^a	6,08 ^a	5,98 ^a
P (mg/dm³)	41,05 ^a	46,61 ^a	23,38 ^{ab}	16,68 ^{ab}	11,60 ^b	10,46 ^b	33,02 ^{ab}	36,37 ^{ab}	17,62 ^{ab}	17,49 ^{ab}	20,37 ^{ab}	24,58 ^{ab}
K (mmol)	12,07 ^{ab}	8,87 ^{ab}	7,45 ^b	7,97 ^b	3,52 ^b	3,60 ^b	21,35 ^a	17,17 ^a	6,48 ^b	6,19 ^b	7,62 ^b	10,68 ^b
Al (mmol)**	1,23 ^a	6,54 ^{a*}	2,04 ^b	1,63 ^b	1,23 ^b	1,23 ^b	1,23 ^b	1,23 ^b	1,23 ^b	2,86 ^{b*}	1,63 ^b	2,86 ^b
Ca (cmol)	6,17 ^a	6,50 ^a	5,73 ^{ab}	5,50 ^{ab}	6,43 ^{ab}	5,90 ^{ab}	5,67 ^{ab}	6,73 ^{ab}	5,30 ^b	4,77 ^b	5,17 ^{ab}	5,77 ^{ab}
Mg (cmol)	2,80 ^{ab}	2,70 ^{ab}	2,40 ^{abc}	2,57 ^{abc}	2,60 ^{bc}	2,30 ^{bc}	2,70 ^a	3,00 ^a	2,37 ^c	2,17 ^c	2,30 ^{abc}	2,73 ^{abc}
H+Al (cmol)	4,54 ^a	5,85 ^a	3,97 ^{ab}	5,10 ^{ab}	3,97 ^{ab}	4,28 ^{ab}	4,28 ^{ab}	5,04 ^{ab}	3,91 ^b	4,14 ^b	4,59 ^{ab}	5,38 ^{ab}
SB	101,74 ^{ab}	100,87 ^{ab}	88,78 ^{bc}	88,64 ^{bc}	93,85 ^{bc}	85,60 ^{bc}	105,02 ^a	114,50 ^a	83,14 ^c	75,52 ^c	82,28 ^{bc}	95,68 ^{bc}
CTC	147,10 ^{ab}	159,37 ^{ab}	128,47 ^{abc}	139,64 ^{abc}	133,53 ^{bc}	128,44 ^{bc}	147,85 ^a	164,91 ^a	122,28 ^c	116,93 ^c	128,22 ^{abc}	149,48 ^{abc}
V%**	69,01 ^a	63,29 ^a	68,90 ^a	63,48 ^a	70,35 ^a	67,00 ^a	70,90 ^a	69,42 ^a	67,79 ^a	64,55 ^a	64,53 ^a	63,64 ^a
MOS (g kg⁻¹)	21,34 ^a	22,25 ^a	19,04 ^a	21,34 ^a	20,88 ^a	20,42 ^a	22,25 ^a	21,80 ^a	19,50 ^a	17,21 ^a	20,88 ^a	17,21 ^a
C%	1,2 ^a	1,3 ^a	1,1 ^a	1,2 ^a	1,2 ^a	1,2 ^a	1,3 ^a	1,3 ^a	1,1 ^a	1,0 ^a	1,2 ^a	1,0 ^a
Cu (mg/dm³)**	17,85 ^a	19,97 ^a	20,32 ^a	15,78 ^a	20,23 ^{ab}	11,63 ^{ab}	17,25 ^a	17,10 ^a	13,04 ^{bc}	9,54 ^{bc}	9,29 ^c	6,55 ^c
Mn (mg/dm³)	114,62 ^a	122,77 ^a	96,90 ^{ab}	106,45 ^{ab}	100,73 ^{bc}	61,97 ^{bc}	124,65 ^a	132,30 ^a	92,79 ^{bc}	73,02 ^{bc}	71,58 ^c	55,22 ^c
Fe (mg/dm³)**	60,49 ^{ab}	45,07 ^{ab}	84,34 ^a	46,81 ^a	77,93 ^a	47,05 ^a	58,67 ^{ab}	42,46 ^{ab}	64,15 ^{ab}	38,40 ^{ab}	51,37 ^b	22,50 ^b
Zn (mg/dm³)	6,86 ^a	4,68 ^a	27,50 ^a	3,66 ^a	2,67 ^a	2,08 ^a	5,17 ^a	4,03 ^a	5,99 ^a	1,68 ^a	2,43 ^a	1,30 ^a
Areia(%)	10,76 ^c	11,93 ^c	10,66 ^{ab}	12,21 ^{ab}	13,98 ^c	11,34 ^c	11,12 ^a	11,75 ^a	11,05 ^{bc}	11,63 ^{bc}	11,41 ^{a*}	12,47 ^a
Argila(%)**	68,36 ^{cd*}	66,23 ^{cd}	64,53 ^{d*}	64,05 ^d	57,06 ^{cd*}	70,41 ^{cd}	72,20 ^{bc*}	70,86 ^{bc}	74,86 ^{ab*}	78,81 ^{ab}	76,91 ^{a*}	78,53 ^a
Silte(%)**	20,88 ^{ab*}	21,84 ^{ab}	24,81 ^{ab}	23,74 ^{ab}	28,96 ^a	18,25 ^a	16,68 ^{abc*}	17,39 ^{abc}	14,10 ^{bc*}	9,56 ^{bc}	11,67 ^{c*}	9,0 ^c

Os valores correspondem à média de 3 repetições; SB – soma de bases trocáveis (Ca, Mg, K, H+Al); CTC – capacidade de troca catiônica; V% – índice de saturação por bases; M.O.S. – matéria orgânica do solo; C% - carbono orgânico

Letras iguais dentro da mesma linha não diferem significativamente entre o período de amostragem, independentemente dos tratamentos, pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05)

*diferiram entre os tratamentos dentro da mesma época; **diferiram entre os tratamentos considerando todo o período

Os valores de pH mostraram-se mais elevados nos solos cultivados com algodão transgênico Bt em todas as amostragens realizadas. O índice de saturação de bases, assim como o alumínio trocável, também está relacionada à acidez do solo. Mudanças no pH do solo sob condições naturais alteram a distribuição de espécies de fungos (Cabello & Arambarri 2002). Christensen (1969) observou que o teor de cálcio no solo e o pH são fatores que regulam a composição da comunidade fúngica, favorecendo o aparecimento de determinadas espécies de fungos. Como não houve diferença na densidade de fungos entre os tratamentos e entre os diferentes períodos de amostragem, pode ter ocorrido o favorecimento de algumas espécies, em detrimento de outras, mantendo os níveis populacionais da comunidade fúngica do solo.

O pH influencia ainda, na adsorção das proteínas Bt às partículas de solo. Crecchio & Stotzky (2001) verificaram que a adsorção é máxima em pH próximo ao ponto isoelétrico (pI) da proteína, que ocorre em pH 5,5. A adsorção decresce em pH > 6,0. Em condições de pH do solo, próximos ao do pI da proteína, as forças repulsivas são mínimas, favorecendo a adsorção aos colóides do solo. Portanto, as condições de reação do solo têm grande influência sobre o comportamento dessas proteínas nesse ecossistema. A adsorção aos colóides do solo não altera a estrutura química das toxinas, mantendo sua atividade inseticida, o que pode aumentar a exposição da microbiota aos efeitos da toxina (Siqueira *et al.* 2004).

A influência dos diferentes fatores abióticos sobre as populações de fungos pode ser observada na ordenação das amostras a partir da análise dos componentes principais (PCA- *Principal Component Analyses*), considerando as características químicas (Figura 3). O vetor representando o pH é o que possui maior correlação com os eixos da PCA (aproximadamente 90%), indicando que esta característica teve maior influência na disposição das amostras, de forma a separar os tratamentos.

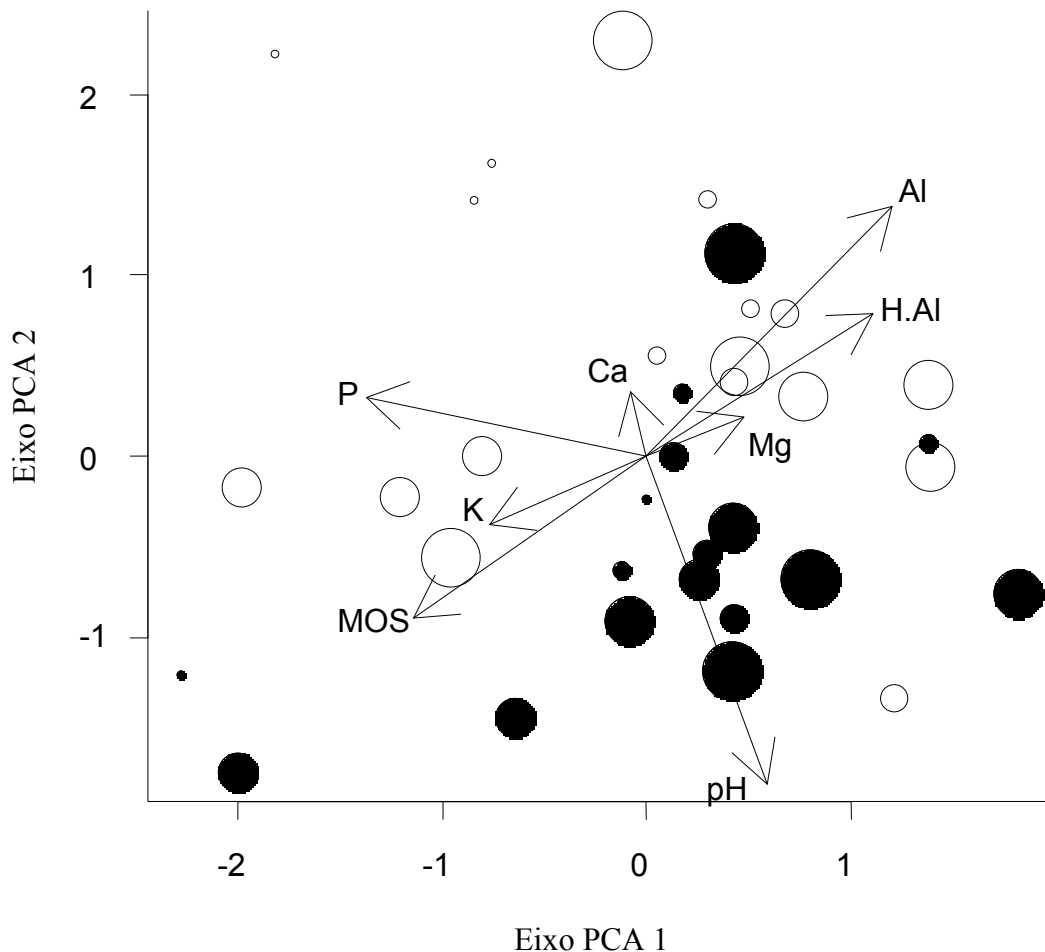


Figura 3. Composição química das amostras de solo obtida por análise de componentes principais (60% da variância explicada). Pontos preenchidos correspondem a amostras de Bt e vazios não Bt. O tamanho dos pontos é proporcional ao número de DAS. K = concentração de potássio; P = concentração de fósforo; Al = concentração de alumínio; Ca = concentração de cálcio; Mg = concentração de magnésio ; M.O.S= concentração de matéria orgânica; H+Al= acidez pontencial ; pH H₂O= pH em H₂O.Os vetores indicam as correlações de cada componente com os eixos da PCA: MOS (PC1= -0.4563, PC2= -0.39865); pH H₂O (PC1 = -0.17131, PC2 = -0.17131); P (PC1= -0.49526,PC2= 0.035592); K (PC1= -0.39562,PC2= -0.21727); Al (PC1= -0.06959,PC2= 0.410186); Ca (PC1= -0.28149,PC2= 0.045057); Mg (PC1= -0.19062 ,PC2= -0.00557); H+Al (PC1= -0.08634,PC2= 0.200353)

A saturação por bases é um excelente indicativo das condições gerais de fertilidade do solo, sendo utilizada até como complemento na nomenclatura dos solos: solos eutróficos (férteis) apresentam $V\% \geq 50\%$; solos distróficos (pouco férteis) apresentam $V\% < 50\%$. Todas as amostras obtidas tinham índice de saturação de bases maiores que 50%, no entanto, os maiores índices foram encontrados nas amostras de solo com cultivo Bt. Um índice $V\%$ baixo significa que há pequenas quantidades de cátions, como Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+ , saturando as cargas negativas dos colóides e que a maioria delas está sendo neutralizada por H^+ e Al^{3+} (Silva 2009).

A granulometria do solo mostrou que houve uma alteração na relação argila/silte entre as diferentes épocas de cultivo. É possível observar uma diminuição da quantidade de silte, e aumento na quantidade de argila, com o passar do tempo. O que não ocorre com a proporção de areia, que se manteve constante nos meses de coleta. Não foi encontrada diferença significativa na granulometria do solo entre os tratamentos avaliados. Estudos mostram que a argila aumenta a retenção da proteína Cry no solo (Saxena *et al.* 2002), promovendo a extensão do período de exposição dos microrganismos da rizosfera em solos com maior taxa de argila.

Identificação molecular dos isolados

Das 1935 colônias observadas em todas as amostragens e diluições, foram diferenciados 45 morfoespécies, através da análise das características culturais e morfológicas. Procedeu-se a identificação molecular de um isolado de cada morfoespécie. Devido a problemas ocorridos durante o sequenciamento, apenas 16 espécies/gêneros foram devidamente identificados (Tabela II).

Tabela II. Espécies com maior similaridade com as sequências obtidas dos isolados, através de alinhamento local no banco de dados de nucleotídeos NCBI

Espécie	Número de acesso no GenBank	Valor de E	Similaridade %
Ascomycota			
<i>Thielavia terricola</i> (J. C. Gilman & E. V. Abbott) C. W. Emmons 1930	GU966509.1	0.0	91%
<i>Talaromyces flavus</i> (Klocker) Stolk & Samson	AF455513.1	0.0	97%
<i>Aspergillus flavus</i> Link ex Gray, 1821	HQ340103.1	0.0	97%
<i>Penicillium pimateouiense</i> S.W. Peterson	AF037436.1	0.0	95%
<i>Paecilomyces</i> sp.	HQ608050.1	0.0	89%
<i>Penicillium pinophilum</i> Hedgcock, 1910	GQ221867.1	0.0	94%
<i>Phoma</i> sp.	GU045305.1	0.0	97%
<i>Aspergillus tamarii</i> Kita 1913	HQ340111.1	0.0	97%
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	FJ719812.1	1E-178	87%
<i>Chaetomonium</i> sp.	HQ608145.1	0.0	95%
Mucoromycotina			
<i>Cunninghamella bertholetiae</i> Matruchot, 1903	FJ345351.1	0.0	94%
<i>Gongronella bluteri</i> (Lendner) Peyronel & Dal Vesco, 1955	GU966508.1	0.0	98%
<i>Rhizopus microsporus</i> (Saito) Schipper & Stalpers 1984	HQ404248.1	0.0	98%
<i>Macromophina phaesolina</i> (Tassi) Goid.	FJ415067.1	0.0	97%
<i>Cunninghamella echinulata</i> (Thaxt.) Thaxt. ex Blakeslee 1905	GU966504.1	0.0	93%
<i>Absidia repens</i> Tiegh. 1878	FN598960.1	0.0	93%

As espécies identificadas pertencem ao Filo Ascomycota e ao Subfilo Mucoromycotina. Este último pertencia ao Filo Zygomycota, no entanto, após avanços nas análises filogenéticas, descobriu-se que se tratava de um grupo polifilético, sendo o subfilo Mucoromycotina considerado um grupo com posição taxonômica incerta (Stajich *et al.* 2009). O filo Ascomycota é o maior táxon do Reino Fungi, compreendendo aproximadamente 64% de todas as espécies descritas, e ocupam os mais diversos nichos, como sapróbios, mutualistas e parasitas (Stajich *et al.* 2009).

Trinta morfoespécies foram comuns ao solo com cultivo de algodão Bt e algodão não Bt, três morfoespécies foram encontradas apenas no solo com algodão não Bt e doze apenas ao solo com cultivo de algodão Bt. Desta forma, o solo plantado com algodão Bt

apresentou maior riqueza. Os fungos identificados no presente trabalho são considerados habitantes comuns de solo em áreas cultivadas com algodão (Carvalho 2008).

Diversos trabalhos vêm sendo realizados a fim de detectar efeitos de plantas transgênicas na microbiota do solo, em nível de comunidade. Porém, a maioria deles tem o objetivo de verificar a diversidade funcional, sendo baseados no perfil fisiológico do solo, através de cultivos simultâneos sobre diferentes fontes de carbono e análises das atividades enzimáticas. Em geral, estas pesquisas não revelaram diferenças significativas na diversidade funcional da microbiota do solo sob plantios transgênicos (Blackwood & Buyer, 2004; Shen *et al.* 2006; Icoz *et al.* 2008). A diversidade estrutural do solo vem sendo acessada principalmente através de análises moleculares de perfis de banda. Não foram encontrados trabalhos avaliando o impacto do algodão Bt na comunidade fúngica por meio de cultivo e identificação das espécies, o que torna esta pesquisa um importante relato da comunidade de fungos do solo presentes nesta cultura.

Uma análise detalhada em microscopia eletrônica de varredura realizada por Gupta & Watson (2004) revelou uma intensa colonização fúngica em resíduos de algodão Bt, enquanto que em solo com algodão não Bt houve um decréscimo na quantidade de fungos. Além disso, os autores observaram ainda que a comunidade fúngica era bem diferente em relação à composição de espécies.

A composição da comunidade microbiana na rizosfera é governada principalmente pela qualidade e quantidade de fontes de carbono liberadas nos exsudatos radiculares (Maloney *et al.* 1997). Um estudo realizado por Li *et al.* (2009) concluiu que o algodão resistente a insetos afeta o desenvolvimento de uma espécie de fungo fitopatogênico por meio da diferenciação do exsudato radicular. Estes autores demonstraram que duas linhagens de algodão resistente a insetos tiveram maior suscetibilidade a doença causada pelo fungo *Fusarium oxysporum*, em comparação com as respectivas linhagens

convencionais, e que os exsudatos radiculares promoveram maior germinação dos esporos e crescimento micelial do referido fungo. Os autores relataram, ainda, diferenças na composição e nos componentes dos exsudatos radiculares, além de que as cultivares transgênicas possuíam maiores quantidades e variedades de aminoácidos e açúcares, mostrando uma forte correlação com os índices da doença, visto que, provavelmente, constituíram uma fonte de carbono para o desenvolvimento do fungo causador de doença. A diferença na exsudação radicular pode explicar o maior número de morfoespécies encontradas no solo com cultivo de algodão Bt na presente pesquisa, uma vez que há a diversificação do substrato para o desenvolvimento dos fungos do solo.

Análise metagenômica do solo

Foram sequenciados 96 clones de cada tratamento, que encontraram similaridade com apenas 13 unidades taxonômicas operacionais (Figura 4), agrupadas em 9 gêneros/espécies (Tabela III). O índice de diversidade de Shannon foi maior no solo plantado com algodão Bt (H' : 0,8238) do que no solo com algodão não Bt com (H' : 0,8092). Apenas seis unidades taxonômicas operacionais não foram comuns a ambos os solos, quatro apareceram apenas no solo plantado com algodão Bt e dois apenas no solo com algodão não Bt. No solo com algodão transgênico, 58% das sequências obtidas foram do filo Ascomycota, e 42% do filo Basidiomycota. No solo plantado com algodão convencional, a relação foi similar, com 56 % de Ascomycota e 44% Basidiomycota.

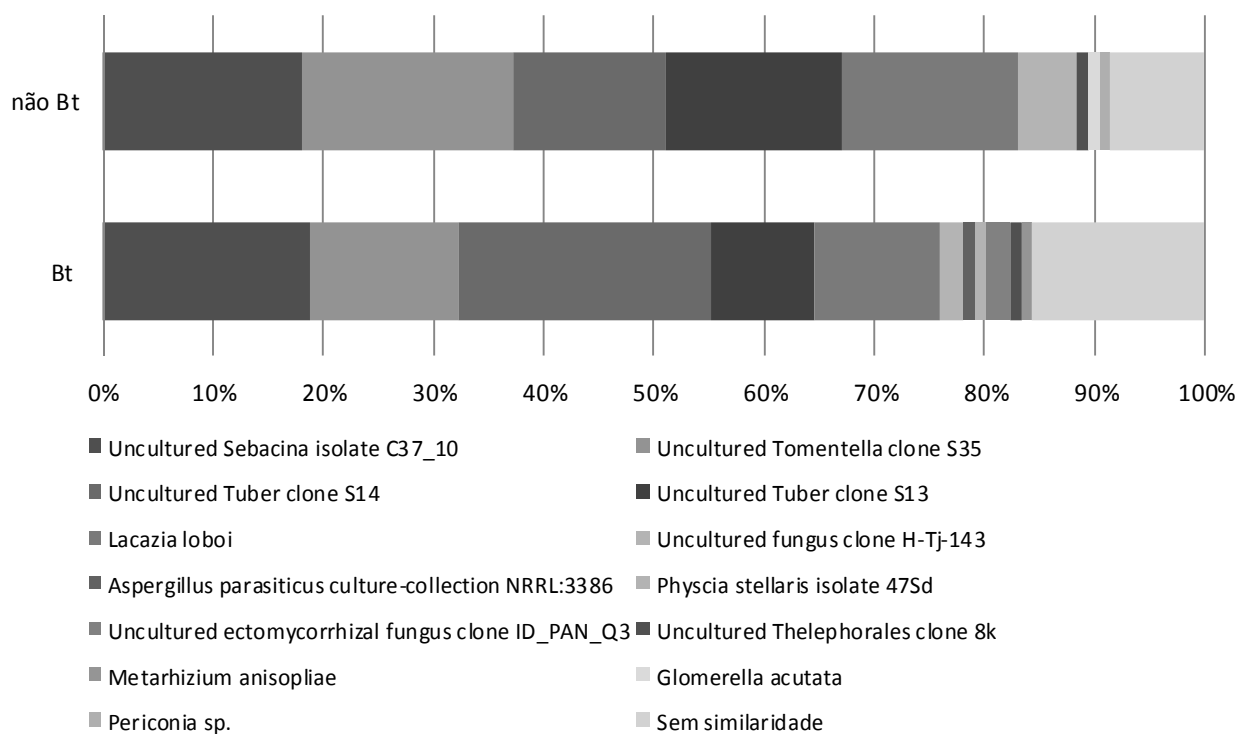


Figura 4. Porcentagem relativa dos táxons encontrados através do metagenoma de fungos em solos cultivados com algodão Bt e não Bt.

Tabela III. Frequência das espécies/gêneros fúngicos encontrados com sequenciamento do DNA metagenômico de solo com cultivo de algodão Bt e algodão não Bt

	BT	Não Bt
Basidiomycota		
<i>Sebacina</i>	18	17
<i>Tomentella</i>	13	18
Ascomycota		
<i>Tuber</i>	35	21
<i>Lacazia loboii</i>	11	15
<i>Aspergillus parasiticus</i>	1	
<i>Physcia stellaris</i>	1	
<i>Periconia</i> SP		1
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1	
<i>Glomerella acutata</i>		1

O'Brien *et al.* (2005) avaliaram a diversidade fúngica em solo de floresta e os dois filos mais frequentes foram Ascomycota e Basidiomycota. Os fungos saprófitos do Filo Basidiomycota são os principais decompositores de componentes recalcitrantes de matéria

orgânica vegetal, através da produção de enzimas como peroxidases e lacases. Os membros deste filo são difíceis de cultivar e isolar em meio de cultura (Lynch & Thorn 2006). O Filo Basidiomycota compreende 34% de todas as espécies de fungos descritas (Stajich *et al.* 2009).

Allen *et al.* (2003) reportaram que a PCR e clonagem ITS-2 de DNA de raízes de *Gaultheria shallon* identificaram um basidiomiceto não cultivável *Sebacina* como sendo um importante componente da comunidade micorrízica. Este resultado também foi encontrado na presente pesquisa, uma vez que este gênero foi encontrado com maior similaridade em aproximadamente 18% das sequências em ambas as amostras (Figura 5).

Outro fungo basidiomiceto encontrado nesta pesquisa foi o gênero *Tommentela*, um fungo ectomicorrízico. O gênero *Tuber* (Ascomycota) também forma associações com as raízes de plantas (Bulman *et al.* 2010). *Lacazia loboi*, uma espécie encontrada em ambos os solos, é um fungo patogênico a humanos, sendo o agente causador de uma micose conhecida como lacaziose. É encontrado frequentemente nas Américas do Sul e Central, estendendo-se da Bolívia ao México, predominando em países da região amazônica (Brito & Quaresma 2007). Estas espécies não são possíveis de serem cultivadas em meios de culturas convencionais.

Um estudo realizado por Knox *et al.* (2008) não encontrou diferenças na colonização micorrízica em raízes de algodão Bt, indicando que o tipo de algodão não interfere nos fungos micorrízicos, confirmando o resultado da presente pesquisa. No entanto, raízes de milho Bt foram menos colonizadas com micorrizas do que a variedade convencional (Turrini *et al.* 2004; Castaldini *et al.* 2005), e, conseqüentemente, a planta não só perdeu um importante simbiote que contribui para sua nutrição, como as plantas também podem ser mais suscetíveis a insetos, uma vez que a ausência de micorrizas faz com que a planta deixe de atrair os inimigos naturais.

Foi possível notar, que ao utilizar dois métodos diferentes para a análise microbiológica do solo, uma abordagem dependente de cultivo e outra independente, os resultados foram distintos, isto porque, cada metodologia detectou uma fração diferente dos fungos do solo. A abordagem metagenômica revelou a presença de fungos dos Filos Basidiomycota e Ascomycota, que incluem fungos simbióticos de raízes de plantas, e que tem papel importante na nutrição das mesmas, mas que não são cultivadas em meios de cultura.

Diversos estudos de comunidades de fungos do solo associam diferentes técnicas moleculares para se obter uma visão real das espécies de fungos presentes no ambiente e das relações ecológicas desempenhadas por eles. He *et al.* (2005) utilizaram técnicas de *fingerprinting* TGGE e SSCP associadas com clonagem e sequenciamento de genes 18S rDNA para comparar comunidades de fungos em solos de florestas naturais com solos de plantação de pinheiro. Essas técnicas demonstraram diferenças na composição das comunidades de fungos entre as amostras. Além de técnicas moleculares, Malosso *et al.* (2006) utilizaram técnicas dependentes de cultivo para avaliar a diversidade de fungos em solos da Antártida. Utilizando técnicas de cultivo foi possível detectar leveduras e ascomicetos filamentosos nas amostras. Já com o emprego de técnicas moleculares os autores encontraram sequências de fungos pertencentes aos filios Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota.

Trabalhos visando detectar diferenças nas comunidades fúngica do solo através de análises independentes de cultivo, para detectar efeitos de plantas Bt, tem sido realizadas principalmente através de análises de perfis de banda. Porém, atualmente não existem trabalhos de sequenciamento de metagenoma de fungos visando a avaliação de impacto ambiental causado pelo algodão Bt. Os resultados apresentados nesta pesquisa

representam, portanto, um passo importante para o entendimento dos efeitos que plantas transgênicas e seu manejo podem induzir sobre a comunidade de fungos do solo.

Conclusões

De acordo com as condições em que a pesquisa foi conduzida, a quantidade de fungos no solo não foi influenciada pelo tipo de algodão cultivado e nem pelo período da amostragem. A diversidade de fungos do solo avaliada pelo método de cultivo em meio de cultura mostrou que a comunidade fúngica variou entre os tratamentos e entre as diferentes épocas de amostragem. A análise metagenômica do solo revelou espécies de fungos não cultiváveis, sendo que o solo sob cultivo de algodão Bt também apresentou maior diversidade do que o solo sob cultivo de algodão não-Bt.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de bolsa de Mestrado, ao Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade e ao Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Campus de Jaboticabal.

Referencias Bibliográficas

- Allen, E. B.; M. F. Allen; Egerton-Warburton, L.; L. Corkidi; A. Gómez-Pompa. 2003. Impacts of early- and late-seral mycorrhizae during restoration in seasonal tropical forest, Mexico. **Ecological Applications** **13**: 1701-1717.
- Altschul, S. F.; T. L. Madden; A. A. Schaffer; J. Zhang; Z. Zhang; W. Miller; D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research** **25**: 3389-3402.
- Baumgarte, S. & C. C. Tebbe. 2005. Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. **Molecular Ecology** **14**: 2539–2551.
- Bending, G. D.; Friloux, M.; Walker, A. 2002. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. **FEMS Microbiology Letters** **212**: 59 – 63.
- Beura, K. & Rakshit, A. 2001. Effect of Bt cotton on nutrientdynamic under varied soil type. **Italian Journal of Agronomy** **6**: 25 – 28.
- Blackwood, C. B. & J. S. Buyer. 2004. Soil Microbial Communities Associated with Bt and Non-Bt Corn in Three Soils. **Journal Environmental Quality** **33**: 832-836.
- Borém, A. **Biotecnologia e Meio Ambiente**. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 2004, 425 p.
- Brito, A. C. & J. A. S. Quaresma. 2007. Lacaziose (doença de Jorge Lobo):revisão e atualização. **Anais Brasileiros de Dermatologia** **82**: 461-474.

Broeckling, C. D.; A. K. Broz; J. Bergelson; D. K. Manter; J. M. Vivanco. 2008. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. **Applied and Environmental Microbiology** **74**: 738-744.

Bulman, S.; S. Visnovsky; I. Hall; A. Guerin-Laguete; W. Yun. 2010. Molecular and morphological identification of truffle-producing Tuber species in New Zealand. **Mycological Progress** **9**: 205-214.

Cabello, M. N. & A. M. Arambarri. 2002. Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* forests in the eastern Buenos Aires province (Argentina). **Microbiological Research** **157**: 115-125.

Carvalho, V. G. Comunidades de fungos em solo do cerrado sob vegetação nativa e sob cultivo de soja e algodão. 2008. 62 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

Castaldini, M.; A. Turrini; C. Sbrana *et al.* 2005. Impact of Bt corn on rhizospheric and on beneficial mycorrhizal symbiosis and soil eubacterial communities in experimental microcosms. **Applied and Environmental Microbiology** **71**: 6719-6729.

Christensen, M. 1969. Soil microfungi of dry to mesic conifer-hardwood forests in northern Wisconsin. **Ecology** **50**: 9-27.

Crecchio, C. & G. Stotzky. 2001. Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* bound on complexes of montmorillonite-humic acids-A1 hydroxypolymers. **Soil Biology & Biochemistry** **33**: 573-581.

Donegan, K. K.; C. J. Palm; V. J. Fieland; L. A. Porteous; L. M. Ganio; D. L. Schaller. 1995. Changes in levels, species, and DNA fingerprints of soil microorganisms associated

with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki endotoxin. **Applied Soil Ecology** **2**: 111–124.

Dunfield, K. E. & J. J. Germida. 2003. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field grown genetically modified canola (*Brassica napus*). **Applied Environmental Microbiology** **69**: 3710-3718.

Fang, M.; P. P. Motavalli; R. J. Kremer; K. A. Nelson. 2007. Assessing changes in soil microbial communities and carbon mineralization in *Bt* and non-*Bt* corn residue-amended soils. **Applied Soil Ecology** **37**: 150– 160.

Flores, S.; D. Saxena; G. Stotzky. 2005. Transgenic *Bt* plants decompose less in soil than non-*Bt* plants. **Soil Biology & Biochemistry** **37**: 1073–1082.

Fu, Q.; H. Hu; S. Chen; Q. Huang; W. Liang. 2007. Adsorption of insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki by some Chinese soils: effects of organic acid ligands addition. **Plant & Soil** **296**: 35–41.

Gadd, G. M. 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. **Mycological Research** **III**: 3-49.

Gordon, D.; C. Abajian; P. Green. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research** **8**: 195-202.

Griffiths, B. S.; S. Caul; J. Thompson; A. N. E. Birch; C. Scrimgeour; J. Cortet; A. Foggo; C. A. Hackett; P. H. Krogh. 2006. Soil Microbial and Faunal Community Responses to *Bt* Maize and Insecticide in Two Soils. **Journal Environmental Quality** **35**: 734-741.

Griffiths, B. S.; S. Caul; J. Thompson; A. N. E. Birch; C. Scrimgeour; J. Cortet; A. Foggo; C. A. Hackett; P. H. Krogh. 2005. A comparison of soil microbial community structure, protozoa and nematodes in field plots of conventional and genetically modified maize expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **Plant and Soil** **275**: 135–146.

Griffiths, R. I.; A. S. Whiteley; A. G. O'Donnell; M. J. Bailey. 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. **Applied Environmental Microbiology** **66**: 5488-5491.

Gupta, V.V.S.R. & S. Watson. **Csiro Project Title**: Ecological impacts of GM cotton on soil biodiversity. Australia, 2004.

Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** **68**: 669-685.

He, J.; Xu, Z. & J. Hughes. 2005. Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA genes. **FEMS Microbiology Letters** **247**: 91-100.

Heuer, H.; R. M. Kroppenstedt; J. Lottmann; G. Berg; K. Smalla. 2002. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. **Application Environment. Microbiology** **68**: 1325–1335.

Huang, J.; R. Hu; C. Pray; F. Qiao; S. Rozelle. 2003. Biotechnology as an alternative to chemical pesticides: a case study of Bt cotton in China. **Agricultural Economics** **29**: 55–67.

Icoz, I. & G. Stotzky. 2008. Cry3Bb1 protein from *Bacillus thuringiensis* in root exudates and biomass of transgenic corn does not persist in soil. **Transgenic Research** 17:609–620.

Icoz, I.; D. Saxena; D. Andow; C. Zwahlen; G. Stotzky. 2008. Microbial populations and enzyme activities in soil in situ under transgenic corn expressing cry proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Environmental Quality** 37: 647–662.

James, C. 2010. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. ISAAA Briefs No. 42. The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, NY. Disponível em:
<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/executivesummary/pdf/Brief%2042%20-%20Executive%20Summary%20-%20English.pdf>. (Acessado em 20 de Abril de 2011).

Kirk, J. L.; L. A. Beaudette; M. Hart; P. Moutoglis; J. N. Kliromos; H. Lee; J. T. Trevors. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods** 58: 169-188.

Knox, O. G. G.; D. B. Nehl; T. Mor; G. N. Roberts; V. V. S. R. Gupta. 2008. Genetically modified cotton has no effect on arbuscular mycorrhizal colonisation of roots. **Field Crops Research** 109: 57-60.

Kuramae-Izioka, E. E. 1997. A Rapid, easy and high Yield Protocol For Total Genomic DNA Isolation of *Colletotrichum*. **Revista Unimar** 19: 683-689.

Lachnicht, S. L.; P. F. Hendrix; R. L. Potter; D. C. Coleman; D. A. Crossley. 2004. Winter decomposition of transgenic cotton residue in conventional-till and no-till systems.

Applied Soil Ecology 27: 135–142.

Lang, A.; M. Arndt; R. Beck; J. Bauchhenss; G. Pommer. 2006. Monitoring of the environmental effects of the Bt gene. Bavarian State Research Center for Agriculture No.2006/ 10, Freising-Weißenstephan. Disponível em http://www.lfl.bayern.de/publikationen/daten/schriftenreihe_url_1_43.pdf. (Acessado em 30 June 2011).

Li, X.; B. Liu; J. Cui; D. Liu; S. Ding; B. Gilna; J. Luo; Z. Fang; W. Cao; Z. Han. 2011. No evidence of persistent effects of continuously planted transgenic insect-resistant cotton on soil microorganisms. **Plant and Soil 339:** 247-257.

Li, X.; B. Liu; S. Heia; D. Liu. *et al.* 2009. The Effect of Root Exudates from Two Transgenic Insect-Resistant Cotton Lines on the Growth of *Fusarium oxysporum*. **Transgenic Research 18:** 757-67.

Lynch, M. D. J. & R. G. Thorn. 2006. Diversity of Basidiomycetes in Michigan Agricultural Soils. **Applied and Environmental Microbiology 72:** 7050-7056.

Maloney, P. E.; A. H. C. van Bruggen; S. Hu. 1997. Bacterial Community Structure in Relation to the Carbon Environments in Lettuce and Tomato Rhizospheres and in Bulk Soil. **Microbial Ecology 34:** 109-117.

Malosso, E.; I. S. Waite; L. English; D. W. Hopkins; A. G. O'Donnell. 2006. Fungal diversity in maritime Antarctic soils determined using a combination of culture isolation, molecular fingerprinting and cloning techniques. **Polar Biology 29:** 552- 561.

- Martin, J. P. 1950. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science** **69**: 215-232.
- Moreira, F.M.S. & J. O. Siqueira. 2002. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 626 p.
- Mulder, C.; M. Wouterse; M. Raubuch; W. Roelofs; M. Rutgers. 2006. Can transgenic maize affect soil microbial communities? **PLoS Computational Biology** **2**: 128.
- Neder, R. N. **Microbiologia**: manual de laboratório. São Paulo: Nobel, 1992. 138p.
- O'Brien, H. E.; J. L. Parrent; J. A. Jackson; J. M. Moncalvo; R. Vilgalys. 2005. Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology** **71**:5544-5550.
- Palm, C. J.; D. L. Schaller; K. K. Donegan; R. J. Seidler. 1996. Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin. **Canadian Journal of Microbiology** **42**: 1258–1262.
- Rodrigues, W.C. 2005. DivEs - Diversidade de espécies. Versão 2.0. Software e Guia do Usuário. 2005. Disponível em: <http://www.ebras.bio.br/dives> (acessado em: 10 julho 2011).
- Sambrook, J. & Russell, D.W. 2001. **Molecular cloning**: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarkar, B.; A. K. Patra; T. J. Purakayastha; M. Megharaj. 2008. Assessment of biological and biochemical indicators in soil under transgenic *Bt* and non-*Bt* Cotton crop in a sub-tropical environment. **Environmental Monitoring and Assessment** **156**: 595-604.

- Saxena, D. & G. Stotzky. 2001. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. **Soil Biology and Biochemistry** **33**: 1225–1230.
- Saxena, D. & G. Stotzky. 2003. Fate and effects in soil of the insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* in transgenic plants. **Biosafety Reviews** **1**: 7-83.
- Saxena, D.; S. Flores; G. Stotzky. 2002. Vertical movement in soil of insecticidal Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis*. **Soil Biology and Biochemistry** **34**: 11-120.
- Shen, R. F.; H. Cai; W. H. Gong. 2006. Transgenic Bt cotton has no apparent effect on enzymatic activities or functional diversity of microbial communities in rhizosphere soil. **Plant and Soil** **285**: 149–159.
- Silva, F. C. 2009. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. - 2. ed. Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 627 p.
- Siqueira, J. O.; I. C. B. Trannin; M. A. P. Ramalho; E. M. G. Fontes. 2004. Interferências no agroecossistema e riscos ambientais de culturas transgênicas tolerantes a herbicidas e protegidas contra insetos. **Cadernos de Ciência & Tecnologia** **21**: 11-81.
- Stajich, J. E.; M. L. Berbee; M. Blackwell; D. S. Hibbett; T. Y. James; J. W. Spatafora; J. W. Taylor. 2009. The Fungi. **Current Biology** **19**: 840-845.
- Turrini, A.; C. Sbrana; M. P. Nuti; B. Pietrangeli; M. Giovannetti. 2004. Development of a model system to assess the impact of genetically modified corn and aubergine plants on arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil** **266**: 69–75.

White, T. J.; T. Bruns; S. Lee; J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A.; D. H. Gelfand; J. J. Shinsky; T. J. White. editors. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, 315–322. Academic Press, San Diego.

Widmer, F. 2007. Assessing effects of transgenic crops on soil microbial communities. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 107**: 207-34.

Wilkinson, J. E.; D. Twell; K. Lindsey. 1997. Activities of CaMV 35S and nos promoters in pollen: implications for field release of transgenic plants. **Journal of Experimental Botany 48**: 265–275.

Anexo I - Normas da Revista Brasileira de Entomologia

Escopo e política

A **Revista Brasileira de Entomologia** (RBE), órgão da Sociedade Brasileira de Entomologia (SBE), publica trabalhos científicos inéditos produzidos na área da Entomologia. A RBE mantém seções destinadas à divulgação de comunicações científicas, resenhas bibliográficas e notícias de interesse. A RBE eventualmente poderá publicar sessões contendo pontos de vistas ou revisões a convite da Comissão Editorial.

Para publicar na RBE pelo menos um dos autores deve ser sócio da SBE e estar em dia com a anuidade. No caso de nenhum dos autores ser sócio a taxa de publicação será de R\$ 50,00, para autores brasileiros e de US\$ 25, para estrangeiros, por página impressa; em ambos os casos para manuscritos com até três autores. Para manuscritos com mais de três autores a taxa de publicação será de R\$ 100,00 por página impressa, para brasileiros e de US\$ 50 para estrangeiros.

As pranchas coloridas terão um custo de R\$ 300,00 para os sócios nacionais e US\$ 150 para os estrangeiros. As pranchas podem ser publicadas em preto e branco na versão impressa e obtidas em cores, sem custo, na versão eletrônica (pdf) por meio da página eletrônica da RBE no SciELO (www.scielo.br/rbent).

Os trabalhos deverão ser preferencialmente redigidos em inglês. Manuscritos em outro idioma (português, espanhol) poderão ser aceitos para a publicação a critério da Comissão Editorial. Os manuscritos deverão ter, no máximo, 120 páginas incluindo as pranchas das figuras. Para manuscritos maiores, os autores deverão consultar a comissão editorial previamente à submissão.

Forma e preparação de manuscritos

Os manuscritos devem ser enviados online pelo endereço <http://submission.scielo.br/index.php/rbent/login>. O texto deve ser editado, de preferência, em Microsoft Word®, em página formato A4, usando fonte Times New Roman tamanho 12, espaço duplo entre as linhas, com margem direita não justificada e com páginas numeradas. Usar a fonte Times New Roman também para rotulagem das figuras e dos gráficos. Apenas tabelas e gráficos podem ser incorporados no arquivo contendo o texto do manuscrito.

O manuscrito deve começar com uma página de rosto, contendo: título do trabalho e nome(s) do(s) autor(es) seguido(s) de número(s) (sobrescrito) com endereço(s) completo(s), inclusive endereço eletrônico, e com respectivos algarismos arábicos para remissão. Não utilizar palavras escritas totalmente em maiúsculas, exceto nas indicações a seguir. Em seguida, apresentar ABSTRACT, com no máximo 250 palavras, com o

título do trabalho em inglês e em parágrafo único; KEYWORDS, em inglês, em ordem alfabética e no máximo cinco. Na seqüência virá o RESUMO em português, incluindo o título e PALAVRAS-CHAVE, em ordem alfabética e equivalentes às KEYWORDS. Devem ser evitadas palavras-chave que constem do título e do resumo do artigo.

No corpo do texto, os nomes do grupo-gênero e do grupo-espécie devem ser escritos em itálico. Os nomes científicos devem ser seguidos de autor e data, pelo menos na primeira vez. Não usar sinais de marcação, de ênfase, ou quaisquer outros. Conforme o caso (manuscritos de outra área, que não sejam de Sistemática, Morfologia e Biogeografia), a Comissão Editorial decidirá como proceder.

As referências devem ser citadas da seguinte forma: Canhedo (2004); (Canhedo 2003, 2004); (Canhedo 2004; Martins & Galileo 2004); Parra *et al.*(2004).

As figuras (fotografias, desenhos, gráficos e mapas) devem ser sempre numeradas com algarismos arábicos e, na medida do possível, na ordem de chamada no texto. As escalas devem ser colocadas na posição vertical ou horizontal. As tabelas devem ser numeradas com algarismos romanos e incluídas, no final do texto em páginas separadas. Se necessário, gráficos podem ser incluídos no arquivo do texto e, como as tabelas, deverão vir no final do texto. As figuras devem ser enviadas em arquivos suplementares, com, no mínimo, 300 dpi de resolução para fotos coloridas e 600 dpi para desenhos a traço e fotos branco e preto, em formato tiff ou jpeg de baixa compactação, sendo que os manuscritos que não atendam às configurações indicadas acima serão devolvidos. O tamanho da prancha deve ser proporcional ao espelho da página (23 x 17,5 cm), de preferência não superior a duas vezes. Para a numeração das figuras utilizar Times New Roman 11, com o número colocado à direita e abaixo. Isto só deve ser aplicado para as pranchas quando em seu tamanho final de publicação. A fonte Times New Roman deve ser usada também para rotulagem inserida em fotos, desenhos e mapas (letras ou números utilizados para indicar nomes das estruturas, abreviaturas etc.) e em tamanho apropriado de modo que em seu tamanho final não fique mais destacada que as figuras propriamente ditas. Fotografias (preto e branco ou coloridas) e desenhos a traço devem ser montados em pranchas distintas. A Comissão Editorial poderá fazer alterações ou solicitar aos autores uma nova montagem, bem como o envio de novos arquivos de figuras. As legendas das figuras devem ser apresentadas no arquivo de texto. O custo da publicação de pranchas coloridas deverá ser arcado pelos autores.

Os AGRADECIMENTOS devem ser relacionados no final do trabalho, imediatamente antes das Referências. Sugere-se aos autores que sejam sucintos e objetivos. Para as REFERÊNCIAS, adota-se o seguinte:

1. Periódicos (os títulos dos periódicos devem ser escritos por extenso e em negrito, assim como o volume do periódico):

Zanol, K. M. R. 1999. Revisão do gênero *Bahita* Oman, 1936 (Homoptera, Cicadellidae, Deltocephalinae). **Biociências** 7: 73-145.

Martins, U. R. & M. H. M. Galileo. 2004. Contribuição ao conhecimento dos Hemilophini (Coleoptera, Cerambycidae, Lamiinae), principalmente da Costa Rica. **Revista Brasileira de Entomologia** **48**: 467-472.

Alves-dos-Santos, I. 2004. Biologia da nidificação de *Anthodioctes megachiloides* Holmberg (Anthidiini, Megachilidae, Apoidea). **Revista Brasileira de Zoologia** **21**: 739-744.

2. Livros:

Michener, C. D. 2000. **The Bees of the World**. Baltimore, Johns Hopkins University Press, xiv+913 p.

3. Capítulo de livro:

Ball, G. E. 1985. Reconstructed phylogeny and geographical history of genera of the tribe Galeritini (Coleoptera: Carabidae), p. 276-321. *In*: G. E. Ball (ed.). **Taxonomy, Phylogeny and Zoogeography of Beetles and Ants**. Dordrecht, W. Junk Publishers, xiii+514 p.

4. Internet:

Geller-Grimm, F. 2008. Database Asilidae: Catalog of species. Disponível em: <http://www.geller-grimm.de/catalog/species.htm> (acessado em 19 de novembro de 2008).

Referências a resumos de eventos não são permitidas e deve-se evitar a citação de dissertações e teses.

Nas Comunicações Científicas o texto deve ser corrido sem divisão em itens (Material e Métodos, Resultados e Discussão). Inclua o Abstract e o Resumo seguidos das Keywords e Palavras-Chave.

A **RBE** encoraja os autores a depositarem voucher dos espécimes em museus ou coleções permanentes de Universidades públicas. É aconselhável que os autores, no momento da apresentação, indiquem claramente no manuscrito onde o material deve ser depositado. Rotulagem e indicação adequada dos voucher dos espécimes são de responsabilidade dos autores.

Provas serão enviadas eletronicamente ao autor responsável e deverão ser devolvidas, com as devidas correções, no tempo solicitado.

O teor científico do trabalho assim como a observância às normas gramaticais são de inteira responsabilidade do(s) autor(es). Para cada trabalho publicado serão fornecidas 10 (dez) separatas, independente do número de autores.

Sugere-se aos autores que consultem a última edição da revista para verificar o estilo e lay-out. Ao submeter o manuscrito o autor poderá sugerir até três nomes de revisores para analisar o trabalho, enviando: nome completo, endereço e e-mail. Entretanto, a

escolha final dos consultores permanecerá com os Editores.

Envio de manuscritos

<http://submission.scielo.br/index.php/rbent/login>

E-mail: rbe@ufpr.br

Fone/FAX: (41) 3266-0502

Endereço para correspondência:

Revista Brasileira de Entomologia/Editor Chefe

Claudio José Barros de Carvalho

Departamento de Zoologia - UFPR

Caixa Postal 19030

81531-980, Curitiba, PR

Obs: Para melhor visualização, as figuras e tabelas foram colocadas na ordem em que aparecem no texto, e não em arquivos separados, conforme a norma da revista.