



**UFGD- Universidade Federal da Grande Dourados**  
**FCBA- Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais**  
**Programa de Pós-Graduação em**  
**Entomologia e Conservação da Biodiversidade**



**EFEITO DO ALGODÃO GENETICAMENTE MODIFICADO  
RESISTENTE A INSETOS SOBRE A POPULAÇÃO DE  
BACTÉRIAS DO SOLO**

**Renata Pires de Araújo**

**Orientador: Prof. Dr. Marcos Gino Fernandes**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira**

**Agosto - 2011**  
**Dourados- MS**  
**Brasil**



**UFGD- Universidade Federal da Grande Dourados**  
**FCBA- Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais**  
**Programa de Pós-Graduação em**  
**Entomologia e Conservação da Biodiversidade**



# **EFEITO DO ALGODÃO GENETICAMENTE MODIFICADO RESISTENTE A INSETOS SOBRE A POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS DO SOLO**

**Dissertação apresentada à  
Faculdade de Ciências  
Biológicas e Ambientais de  
Dourados – UFGD, para  
obtenção do Título de Mestre  
em Entomologia e  
Conservação da  
Biodiversidade – Área de  
Concentração Biodiversidade  
e Conservação.**

**Agosto - 2011  
Dourados– MS  
Brasil**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD**

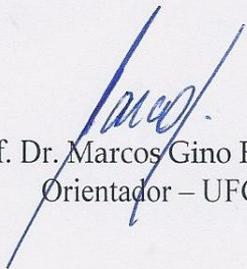
633.51 A663e	<p>Araújo, Renata Pires. Efeito do algodão geneticamente modificado resistente a insetos sobre a população de bactérias do solo / Renata Pires de Araújo. – Dourados, MS : UFGD, 2011. 65 f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Marcos Gino Fernandes. Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Algodão – Cultivo. 2. Pragas de algodão. I. Título.</p>
-----------------	---

“Efeito do algodão geneticamente modificado resistente a insetos sobre a população de bactérias do solo”

Por

**RENATA PIRES DE ARAÚJO**

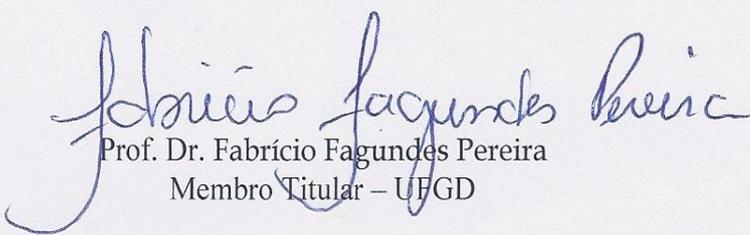
Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),  
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de  
**MESTRE EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE**  
Área de Concentração: Entomologia



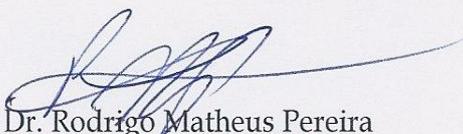
Prof. Dr. Marcos Gino Fernandes  
Orientador – UFGD



Prof. Dr. Alexa Gabriela Santana  
Membro Titular - EMBRAPA



Prof. Dr. Fabrício Fagundes Pereira  
Membro Titular – UFGD



Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira  
Membro Titular – UFGD

Aprovado em: 30 de Agosto de 2011

**Dedico meu trabalho a todos que  
fazem parte de minha vida**

Existem pessoas em nossas vidas que nos deixam felizes pelo simples fato de terem cruzado o nosso caminho. Algumas percorrem ao nosso lado, vendo muitas luas passarem, mas outras apenas vemos entre um passo e outro. A todas elas chamamos de amigo. Há muitos tipos de amigos. Talvez cada folha de uma árvore caracterize um deles. Os primeiros que nascem do broto é o amigo pai e a amiga mãe. Mostram o que é ter vida.

Depois vem o amigo irmão, com quem dividimos o nosso espaço para que ele floresça como nós. Passamos a conhecer toda a família de folhas, os quais respeitam e desejam o bem. O destino ainda nos apresenta outros amigos, os quais nós não sabíamos que iam cruzar o nosso caminho. Muitos desse são designados amigos do peito, do coração. São sinceros, são verdadeiros. Sabem quando não estamos bem, sabem o que nos faz feliz...

Mas também há aqueles amigos por um tempo, talvez umas férias ou mesmo um dia ou uma hora. Esses costumam colocar muitos sorrisos na face, durante o tempo que estamos por perto.

Falando em perto, não podemos nos esquecer dos amigos distantes, que ficam nas pontas dos galhos, mas que quando o vento sopra, aparecem novamente entre uma folha e outra.

O tempo passa, o verão se vai, o outono se aproxima, e perdemos algumas de nossas folhas. Algumas nascem num outro verão e outras permanecem por muitas estações. O que nos deixa mais felizes é quando as folhas que caíram continuam por perto, continuam alimentando as nossas raízes com alegria. Lembranças de momentos maravilhosos enquanto cruzavam o nosso caminho. Desejo a você, folha da minha árvore, paz, amor, saúde, sucesso, prosperidade... Hoje e sempre...

Simplesmente porque cada pessoa que passa em nossa vida é única. Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós. Há os que levaram muito, mas não há os que não deixaram nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso.

Autor desconhecido

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo preciso dizer que meus agradecimentos não são formais. Eu não me reconheceria neles se assim fosse. Quero agradecer a todas as pessoas que se fizeram presentes, que se preocuparam que foram solidárias, que torceram por mim. Mas bem sei que agradecer é sempre uma tarefa difícil. Posso cometer mais injustiças esquecendo pessoas que me ajudaram do que fazer jus a todas que merecem. Também, caso o resultado daquilo pelo qual se agradece seja ruim, posso passar a impressão de distribuir a culpa entre todos aqueles mencionados neste item. Minha intenção não jaz em nenhum desses dois pontos. Apesar de dever muito a todas as pessoas mencionadas aqui, intelectual e emocionalmente, as idéias contidas nesta dissertação são de minha inteira responsabilidade.

De qualquer forma, todos os que realizam um trabalho de pesquisa sabem que não o fazem sozinhos, embora seja solitário em alguns momentos, mas o resultado só é possível pela cooperação e pelo esforço de outros.

Desta forma agradeço a Deus pelo milagre da vida, pois, sem Ele nada disso teria acontecido, acredito que tudo que acontece em nossas vidas tem a mão Dele para nos abençoar, iluminar e guiar nossos caminhos.

Ao Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, pois sem o começo não existe o fim, e assim agradeço a todos componentes dele que seja de forma direta ou indireta contribuíram para meu conhecimento.

Aos professores, primeiramente a meu orientador que me incentivou a entrar e construir uma vida acadêmica, aos do peito pela colaboração indispensável e aos demais por ter transmitido o conhecimento, ajudado em horas importunas e me incentivado a seguir em frente. Aos membros da banca que de forma significativa ira contribuir com conhecimento tanto pessoal como profissional.

Aos técnicos e amigos, por todas as horas que precisei e que estavam presentes, me emprestando uma coisa ou outra.

A todos da UNESP de Jaboticabal pela recepção e oportunidade oferecida. A professora Dr<sup>a</sup> Eliana G. Lemos por possibilitar a realização das análises moleculares no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP).

Aos meus amigos, companheiros e colegas de todas as horas por me dar a mão, o ombro e me ajudar quando mais precisei me arrancar sorriso quando era mais fácil ganhar na mega sena.

A minha família, a esses nenhuma palavra representaria ao certo o que sinto, pois sem eles eu não existiria, agradeço pelo apoio, dedicação, por tolerar minha ausência em vários momentos, e o mais importante pelo amor que me deram e continuam a me dar que sempre me impulsiona a cada momento difícil em minha vida.

Ao meu amor que em todos os momentos estava ao meu lado mesmo que não presente, mas tolerava minha ausência, meu mau humor, minhas lamentações, e me apoiava em todos os momentos, me dando muito amor e carinho.

## SUMÁRIO

Abstract.....	7
Resumo.....	8
Introdução Geral .....	9
Referência.....	10
Cap1 - Efeito do algodão geneticamente modificado resistente a insetos sobre a população de bactérias do solo	
Abstrat.....	12
Resumo.....	13
Introdução .....	14
Material e métodos .....	15
Resultado e Discussão .....	19
Conclusão.....	24
Referência .....	24
Cap2 - Caracterização Molecular de Populações Bacterianas do Solo com Plantio de Algodão Geneticamente Modificado Resistente a Insetos	
Abstrat .....	30
Resumo .....	31
Introdução .....	32
Material e métodos .....	34
Resultado e Discussão .....	37
Conclusão .....	50
Referência .....	50
ANEXO I - Normas da Revista Brasileira de Entomologia.....	62

**Efeito de algodão geneticamente modificado resistente a insetos sobre a população  
de bactérias do solo**

**Effect of genetically modified cotton for insect resistance on population of soil  
bacteria**

ABSTRACT. This study aimed to evaluate the influence of cultivation of two varieties of *Gossypium hirsutum* L., being a non-Bt and Bt varieties on the dynamics of soil bacterial population in the municipality of Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. Soil samples were collected before sowing of the crop and during the plant development, which covered the period of December 2009 to May 2010, for quantitative, chemical and physical analysis; for molecular characterization was used only collection relating to the last sample, i.e. at 150 days after sowing. Soil samples were sent separately to the soil laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences and Microbiology, Faculty of Biological and Environmental Sciences of UFGD and the biotechnology laboratory at the campus of UNESP Jaboticabal for analyzing the chemical and physical factors of soil quantification of bacterial population and molecular characterization, respectively. The results concerning quantification revealed that bacterial populations were significant different when compared during the months of evaluation, but not in relation to the type of cultivation, compared the chemical characteristics of soil planted with Bt cotton showed significant differences in some parameters such as pH showing better characteristics in the molecular characterization, however did not show significant variations.

KEY-WORDS: Metagenomic, diversity, PGM's, microorganisms.

RESUMO. Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência do cultivo de duas variedades de *Gossypium hirsutum* L. sendo uma Bt e outra Não Bt sobre a dinâmica da população bacteriana do solo em uma localidade no município de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Foram coletadas amostras de solo antes da semeadura da cultura e durante o ciclo de desenvolvimento das plantas (dezembro de 2009 a maio de 2010), para análise quantitativa e químico-física e para análise de caracterização molecular utilizou-se somente a coleta referente à última amostra realizada aos 150 dias após a semeadura. Uma parte das amostras de solo foi encaminhada para o Laboratório de Solos da Faculdade de Ciências Agrárias, outra parte para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da UFGD e, uma terceira parte para o Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Campus de Jaboticabal, para análise dos fatores químico-físicos do solo, quantificação da população bacteriana e caracterização molecular, respectivamente. Os resultados referentes à quantificação das colônias de bactérias revelaram que as populações bacterianas apresentaram variações significativas quando comparadas entre os meses de avaliação, mas não em relação ao tipo de cultivo; em relação às características químicas do solo, a área cultivada com o algodão Bt apresentou diferenças significativas em relação a alguns parâmetros como, por exemplo, melhores características com relação ao pH; no entanto, a caracterização molecular não apresentou variações significativas entre os solos cultivados.

PALAVRAS- CHAVE. Metagenoma, diversidade, PGM's, microorganismos.

## INTRODUÇÃO GERAL

O algodoeiro (*Gossypium* spp.) é uma das culturas anuais mais importantes do Brasil pelo seu valor econômico e social (Richetti & Melo Filho 2002) e é uma das plantas mais atacadas por doenças e pragas, além de apresentar alta sensibilidade à concorrência imposta por plantas daninhas (Beltrão 1999). Os insetos-praga constituem um dos principais problemas agrônômicos da cultura do algodão, causando prejuízos econômicos e isso ocorre devido ao fato do algodoeiro possuir inúmeras glândulas que produzem uma secreção líquido-resinosa açucarada o que faz com que sejam atrativas para os insetos (Santos 2001). Para o controle desses insetos-praga utilizam-se produtos químicos que pode chegar até 25% do custo da produção (Fontes 2002).

Para o controle dessas pragas, um gene de *Bacillus thuringiensis* (Bt) foi introduzido em plantas de algodão, dando origem ao algodão geneticamente modificado para apresentar resistência a insetos do qual representa um avanço agrônômico graças à Engenharia Genética. Este tem sido aceito por parte dos agricultores, devido à sua produtividade e redução dos custos de produção pela redução do uso de inseticidas químicos (Sharma & Ortiz 2000).

Apesar da eficácia e da aceitação do algodão Bt pelos agricultores, são levantadas preocupações a respeito de riscos potenciais desta tecnologia a organismos não-alvo. Sendo assim, com a liberação do algodão Bt para o plantio comercial no Brasil, considerando características regionais específicas, faz-se necessário a realização de estudos para avaliar os possíveis efeitos dessa tecnologia sobre a diversidade bacteriana de solos brasileiros, pois a atividade metabólica no solo é fortemente influenciada pela presença de raízes e materiais orgânicos em decomposição. Na rizosfera observa-se uma intensa atividade microbiana, em razão da presença de exsudatos e secreções radiculares que representam as maiores fontes de carbono

prontamente disponíveis para os microrganismos (Grayston & Jones 1996). A diversidade de microrganismos é importante para o funcionamento do ecossistema, pois existe a necessidade da manutenção de processos ecológicos como decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, agregação do solo e controle de patógenos dentro do ecossistema (Kennedy 1999).

Com o objetivo de avaliar o impacto das atividades agrícolas sobre a diversidade bacteriana, este trabalho avaliou dois solos: um com cultura de algodão não-Bt e o outro com cultura de algodão Bt, ambos localizados no município de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. A avaliação foi realizada por meio de análise quantitativa e qualitativa, análise macro e micronutrientes e a análise metagenômica do solo entre os dois tipos de cultivo.

Para tanto, essa dissertação foi dividida em dois capítulos (artigos científicos): Capítulo 1 – Efeito de algodão geneticamente modificado resistente a insetos sobre a população de bactérias do solo, e Capítulo 2 – Caracterização Molecular de Populações Bacterianas de Solo com Plantio de Algodão Geneticamente Modificado Resistente a Insetos. Ambos os artigos foram preparados de acordo com as instruções para autores da Revista Brasileira de Entomologia, com adaptações para facilitar a leitura.

## REFERÊNCIAS

Beltrão, N. E. M. 1999. **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia.

Fontes, E. M. G. 2002. Avaliação de segurança ambiental de algodoeiro geneticamente modificado para resistência a insetos. In: **Rede: “Biossegurança de Organismos Geneticamente Modificados”**. Embrapa, 69p.

Grayston, S. J. & D. V. D. JONES. 1996. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with an annual plant: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. **Applied Soil Ecology** 5: 29-56.

Kennedy, A. C. 1999. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environmental** 74: 65-76.

Richetti, A. & G.A. Melo Filho. 2002. Aspectos econômicos do algodoeiro. In: **Algodão: tecnologia de produção. Embrapa** Agropecuária Oeste. Embrapa Algodão. P.296.

Santos, W. J. 2001. Identificação, biologia, amostragem e controle das pragas do algodoeiro. In: **ALGODÃO: tecnologia de produção**. Campina Grande: Embrapa Algodão. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, p. 181-203.

Sharma, H.C. & R. Ortiz. 2000. Transgenics, pest management, and the environment. **Current Science** 79 : 421-437.

## Capítulo 1

### **Efeito de algodão geneticamente modificado resistente a insetos sobre a população de bactérias do solo**

#### **Effect of cotton genetically modified resistant to insects on the population of bacteria of the soil**

ABSTRACT. This study aimed to evaluate the influence of cultivation of two varieties of *Gossypium hirsutum L.*, being a non-Bt and another Bt on the dynamics of soil bacterial populations, and on soil chemical properties in the municipality of Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. Soil samples were collected before sowing of the crop cycle and during plant development, which covered the period from December 2009 to May 2010. A portion of the soil samples were sent to the Laboratory of Soils, Faculty of Agricultural Sciences and another portion for the Laboratory of Microbiology, School of Biological and Environmental Sciences of UFGD for analysis of soil chemical factors and quantification of the bacterial population, respectively. The results showed that bacterial populations' showed significant variations in colony forming units (UFC) on the basis of statistical analyses during the months of evaluation, but not in relation to the type of cultivation, in relation to soil chemical properties. The area planted with Bt cotton showed significant differences for some parameters, such as pH featuring the best features.

KEYWORDS. PGM's, microorganisms, *Gossypium hirsutum L.*

RESUMO. Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência do cultivo de duas variedades de *Gossypium hirsutum* L., sendo uma Bt e outra não-Bt, sobre a dinâmica da população bacteriana do solo e sobre as características químicas do solo no município de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Foram coletadas amostras de solo antes da semeadura da cultura e durante o ciclo de desenvolvimento das plantas (dezembro de 2009 a maio de 2010). Uma parte das amostras de solo foi encaminhada para o Laboratório de Solos da Faculdade de Ciências Agrárias, e outra para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da UFGD, para análise dos fatores químicos do solo e quantificação da população bacteriana, respectivamente. Os resultados revelaram que as populações bacterianas apresentaram variações significativas em relação às unidades formadoras de colônia (UFC) com base nas análises estatísticas quando comparadas durante os meses de avaliação, mas não em relação ao tipo de cultivo.

PALAVRAS-CHAVE. PGM's, microorganismos, *Gossypium hirsutum* L.

## INTRODUÇÃO

A agricultura passa por constantes transformações, a fim de atender a demanda mundial de alimentos que cresce de forma exponencial. Dentre as inúmeras transformações, estão as plantas geneticamente modificadas ou transgênicas (PGM's), plantas que são oriundas de tecnologias do DNA recombinante, correspondendo ao resultado da inserção, em seu genoma, de genes exógenos, os quais podem ser de diferentes fontes, como microrganismos, animais e outras plantas. Uma das características implantadas às plantas geneticamente modificadas refere-se à resistência a insetos pragas, sendo essa característica obtida pela inserção de genes que codificam a proteína cristal da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt). Essas proteínas, denominadas  $\delta$ -endotoxina ou proteínas cristal (Cry), apresentam ação extremamente tóxica e altamente específica para larvas de insetos de três ordens: Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, dependendo da proteína. Existem mais de 120 diferentes genes *cry*, e as proteínas Cry estão agrupadas em 22 classes (Monnerat & Bravo 2000).

Porém, os efeitos ambientais das PGM's não se limitam aos insetos, pois a interação entre planta e solo pode influenciar na ação e no crescimento das populações microbianas do solo visto que estes estão diretamente envolvidos na manutenção de processos ecológicos dentro do ecossistema, como decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, agregação do solo e controle de patógenos (Kennedy 1999; Vieira & Nahas 2005). As toxinas Bt podem ser incorporadas no solo junto com resíduos de folhas durante a decomposição desse material ou no momento em que os agricultores preparam a terra com os restos dos cultivos transgênicos, logo após a colheita. As toxinas podem persistir por dois ou três meses mantendo sua atividade tóxica porque resistem à degradação quando unidas à argila e aos ácidos húmicos

presentes no solo (Palm *et al.* 1996). Segundo Donnegan & Seidler (1999), tais toxinas Bt ativas que se acumulam no solo e na água, junto com os resíduos de folhas transgênicas, podem causar impactos negativos sobre os organismos do solo e sobre os invertebrados aquáticos, assim como sobre a reciclagem de nutrientes.

Visto que os microrganismos estão diretamente envolvidos nos ciclos dos nutrientes no solo e são estimulados por exsudatos e tecidos radiculares mortos, sendo esse efeito pronunciado para as bactérias, a avaliação da quantificação total de bactérias indica como os processos bioquímicos estão ocorrendo (Cattelan & Vidor 1990). Segundo Brookes (1995), apesar da contagem de microrganismos no solo ser vista com ressalvas, ela melhora a compreensão dos processos que ocorrem e serve como indicador do impacto de diferentes atividades antrópicas.

Desta forma, este trabalho tem por objetivo determinar a existência de impactos do algodão Bt geneticamente modificado para resistência a insetos, sobre a população de bactérias existente no solo, comparando-os com outra cultura de algodão não-Bt, através de análise quantitativa de bactérias totais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos em área agrícola da Fazenda Experimental da Universidade Federal da Grande Dourados, em Dourados, Mato Grosso do Sul (L 22°11'53" S, L 54° 55' 59" W, e A. de 430 m). O clima, de acordo com a classificação de Koppen, é Cfa (Clima Mesotérmico Úmido sem estiagem, em que a temperatura do mês mais quente é superior a 22°C, apresentando, no mês mais seco, precipitação superior a 30 mm). A precipitação pluviométrica total anual da região é 1200 a 1400 mm. Já a evapotranspiração real anual é de 1100 a 1200 mm, e a temperatura média anual de 22°C. A variação mesoclimática é de Úmido a Sub-úmido, com excedente

hídrico anual de 800 a 1200 mm durante cinco a seis meses e deficiência hídrica de 350 a 500 mm durante quatro meses. O solo predominante da região é o Latossolo Vermelho distroférico, porém, encontra-se também, Argissolo Vermelho e Neossolos Quartzarênicos. O Latossolo Vermelho distroférico apresenta-se com textura argilosa e fertilidade natural variável, além de textura média e caráter álico, porém, é profundo, friável, e com grande homogeneidade ao longo de todo o perfil. O relevo é plano e suave ondulado. A cobertura vegetal consiste basicamente de pastagem e agricultura formadas em região da Floresta Estacional Semidecidual e região de Cerrado.

Nesse local foram demarcadas duas áreas amostrais de 5000 m<sup>2</sup> cada uma, onde foram implantadas as culturas que constituíram os tratamentos que foram avaliados. O primeiro tratamento foi a cultivar de algodão-Bt NuOpal<sup>®</sup> Bollgard<sup>®</sup>, e o segundo tratamento foi sua isolinha, a cultivar não-Bt Delta Opal<sup>®</sup>, de características agrônômicas semelhantes à utilizada no primeiro tratamento.

As amostragens foram realizadas mensalmente, totalizando seis avaliações, sendo a primeira um dia antes da semeadura da cultura (zero dia – 0 D.), 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 coleta, realizada um dia antes do plantio, objetivou a determinação das características químicas e biológicas do solo antes da implantação da cultura. As coletas das amostras de solo abrangeram o período de dezembro de 2009 a maio de 2010. Os tratamentos culturais padrão foram adotados com base nas práticas agrícolas nas duas áreas, de acordo com recomendações da EMBRAPA (2001) e em ambas as áreas não houve tratamento com nenhum tipo de fungicida ou inseticida. A semeadura nas duas áreas foi realizada no dia 31 de dezembro de 2009, com uma densidade de 10 a 14 sementes por metro linear, e o espaçamento entre fileiras de 0,90 metros.

Uma parte das amostras coletadas foi encaminhada ao Laboratório de Solos da Faculdade de Ciências Agrárias da UFGD para análise química referente à análise física granulométrica (Tabela I), pH (Tabela II) e quantidade dos micro e macronutrientes (Tabela III), e outra parte das amostras foi para o laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da UFGD para as análises microbiológicas. As amostras de solo foram coletadas em três repetições, com auxílio de trado tipo holandês, com 0 a 15 cm de profundidade. As amostras coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos, no interior de caixa de isopor em condições ambientais (para manutenção de seu teor de umidade) (Pereira *et al.* 1996). Nos Laboratórios as amostras de solo foram conservadas sob refrigeração por no máximo 24 horas para posterior análise da microbiota e dos parâmetros físicos e químicos do solo. Posteriormente, as amostras de solo foram peneiradas em peneira de malha de 2 mm (Olsen & Bakken 1987).

Tabela I– Caracterização física dos solos cultivados com algodão, de acordo com os meses avaliados.

<b>Solo com os cultivos</b>	<b>D.A.S.</b>	<b>Areia</b>	<b>Argila</b>	<b>Silte</b>
<b>Bt</b>	0	10,76%	68,36%	20,88%
	30	10,66%	64,53%	24,81%
	60	13,98%	57,06%	28,96%
	90	11,12%	72,20%	16,68%
	120	11,05%	74,86%	14,10%
	150	11,41%	76,91%	11,67%
<b>Não Bt.</b>	0	11,93%	66,23%	21,84%
	30	12,21%	64,05%	23,74%
	60	11,34%	70,41%	18,25%
	90	11,75%	70,86%	17,39%
	120	11,63%	78,81%	9,56%
	150	12,47%	78,53%	9,00%

Tabela II- Caracterização pH dos cultivos de acordo com os meses.

Solos com os cultivos	D.A.S.	pH CaCl <sub>2</sub>	pH H <sub>2</sub> O	pH SMP
Bt	0	5,4	6,3	6,2
	30	5,2	5,9	6,3
	60	5,3	6,1	6,3
	90	5,6	6,4	6,2
	120	5,4	6,2	6,3
	150	5,0	6,1	6,2
Não Bt.	0	5,1	5,9	6,0
	30	4,6	5,4	6,1
	60	5,0	5,9	6,3
	90	5,4	6,0	6,1
	120	5,2	5,9	6,3
	150	5,2	6,0	6,0

Tabela III – Caracterização química dos cultivos de acordo com os meses .

Solo	D.A.S.	P	K	Al	Ca	Mg	H+Al	SB	T	V%	%C	MOS	Cu	Mn	Fe	Zn
Bt	0	41,1	12,1	1,2	6,2	2,8	4,5	101,7	147,1	69,0	1,2	21,3	17,8	114,6	60,5	6,9
	30	23,4	7,4	2,0	5,7	2,4	4,0	88,8	128,5	68,9	1,1	19,0	20,3	96,9	84,3	27,5
	60	11,6	3,5	1,2	6,4	2,6	4,0	93,9	133,5	70,3	1,2	20,9	20,2	100,7	77,9	2,7
	90	33,0	21,4	1,2	5,7	2,7	4,3	105,0	147,9	70,9	1,3	22,3	17,3	124,7	58,7	5,2
	120	17,6	6,5	1,2	5,3	2,4	3,9	83,1	122,3	67,8	1,1	19,5	13,0	92,8	64,2	6,0
	150	20,4	7,6	1,6	5,2	2,3	4,6	82,3	128,2	64,5	1,2	20,9	9,3	71,6	51,4	2,4
Conv.	0	46,6	8,9	6,5	6,5	2,7	5,9	100,9	159,4	63,3	1,3	22,3	20,0	122,8	45,1	4,7
	30	16,7	8,0	1,6	5,5	2,6	5,1	88,6	139,6	63,5	1,2	21,3	15,8	106,4	46,8	3,7
	60	10,5	3,6	1,2	5,9	2,3	4,3	85,6	128,4	67,0	1,2	20,4	11,6	62,0	47,0	2,1
	90	36,4	17,2	1,2	6,7	3,0	5,0	114,5	164,9	69,4	1,3	21,8	17,1	132,3	42,5	4,0
	120	17,5	6,2	2,9	4,8	2,2	4,1	75,5	116,9	64,5	1,0	17,2	9,5	73,0	38,4	1,7
	150	24,6	10,7	2,9	5,8	2,7	5,4	95,7	149,5	63,6	1,0	17,2	6,5	55,2	22,5	1,3

P, Cu, Fe, Zn e Mn- mg/dm<sup>3</sup>; Ca, Mg e H+Al - cmol; K, Al- mmol;

Para a avaliação da população bacteriana foram adicionados 10 g de solo em Erlenmeyer contendo 90 mL de uma solução salina, sendo essa a diluição 10<sup>-1</sup> esta suspensão inicial foi agitada vigorosamente por 5 minutos. Dessa suspensão, foi transferido 1 mL para o tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina e

homogeneizada manualmente. Esse processo foi repetido até obter-se uma diluição de  $10^{-7}$  (adaptado de Neder 1992). Em seguida, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram transferidas pelo método de plaqueamento em superfície em placas de Petri contendo meio de cultura. As placas foram envolvidas por papel filme para evitar contaminação e ressecamento do meio de cultura (Olsen & Bakken 1987; Sorheim *et al.* 1989) e incubadas em câmara climatizada à 25°C, com fotofase. A contagem foi feita 48 horas após a inoculação. Para a contagem de bactérias foi selecionado o meio de Thorton (1922), meio de cultura específico para bactéria (Sorheim *et al.* 1989).

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, em fatorial com três repetições, constituído dos fatores de diluição e plantio, com objetivo de comparar estimativas de variâncias dentro de cada mês de plantio e o mesmo antes da semeadura. Para verificar se a quantidade de bactérias diferiu entre as variedades de algodão e os meses de coleta, utilizou-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.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

Durante o período de avaliação da cultura transgênica em condição de campo foi possível observar que a mesma não apresentou variação significativa na quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC's) comparada com o plantio de algodão não transgênico ( $F = 2,12$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,16$ ) (Tabela IV). Trabalhos realizados com o cultivo de milho e algodão transgênicos resistentes a insetos não demonstraram efeitos significativos sobre as populações de vários microrganismos do solo em comparação com cultivares convencionais (Flores *et al.* 2005; Lang *et al.* 2006; Shen *et al.* 2006, Icoz *et al.* 2008.; Li *et al.* 2011), corroborando com o presente estudo. Diferenças

significativas também não foram encontradas em relação a interação entre tipo de planta e meses de coleta ( $gl = 5$ ;  $F = 3,57$ ;  $p = >0,05$ ) (Tabela IV).

Em relação aos meses de coletas (isto é, diferentes estágios de desenvolvimento das plantas), estas apresentam diferenças significativas ( $F = 2,76$ ;  $gl = 5$ ;  $p = 0,04$ ) (Tabela IV). Tais resultados corroboram com Li *et al.* (2011) que em seu estudo avaliou o impacto do algodão transgênico resistente a insetos Cry1Ac durante três anos de cultivos consecutivos e relatou que durante o meses e anos houve flutuação no número de Unidades formadoras de colônia (UFC's), porém a longo prazo o plantio de algodão transgênico não teve efeito significativo adverso ou de outra forma sobre os microrganismos do solo. Quaisquer efeitos foram referentes às variações sazonais, o que sugere que as diferenças são insignificantes em comparação com variação de fundo natural. Assim como Rui *et al.* (2005) que não encontrou variação significativa em seu estudo de avaliação das alterações do teor da toxina Bt na rizosfera do algodão geneticamente modificado e sua influência sobre bactérias do solo. Esses autores comprovaram que ao longo do estudo não houve diferença significativa do cultivo do algodão Bt sobre as bactérias do solo, somente entre os meses de coleta foram observadas variações significativas. Tais autores também sugerem que mudanças significativas indicariam que a toxina Bt não foi o fator causador direto da diminuição do número de bactérias na rizosfera, e outros fatores podem estar envolvidos.

Tabela IV. Número UFC de bactérias totais do solo observadas em cultivo de algodão não-Bt e Bt por repetição.

Solo	Coleta	Diluição	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3
			UFC/mL		
Não Bt	0 D.A.S. <sup>B</sup>	10 <sup>-2</sup>	2,7 x 10 <sup>-5</sup>	1,3 x 10 <sup>-5</sup>	2,5 x 10 <sup>-5</sup>
	30 D.A.S. <sup>AB</sup>	10 <sup>-2</sup>	2,6 x 10 <sup>-5</sup>	1,7 x 10 <sup>-5</sup>	3,0 x 10 <sup>-5</sup>
	60 D.A.S. <sup>B</sup>	10 <sup>-2</sup>	2,4 x 10 <sup>-5</sup>	1,7 x 10 <sup>-5</sup>	1,5 x 10 <sup>-5</sup>
	90 D.A.S. <sup>AB</sup>	10 <sup>-2</sup>	1,4 x 10 <sup>-5</sup>	2,2 x 10 <sup>-5</sup>	2,1 x 10 <sup>-5</sup>
	120 D.A.S. <sup>A</sup>	10 <sup>-2</sup>	2,3 x 10 <sup>-5</sup>	2,1 x 10 <sup>-5</sup>	1,5 x 10 <sup>-5</sup>
	150 D.A.S. <sup>AB</sup>	10 <sup>-2</sup>	2,6 x 10 <sup>-5</sup>	2,9 x 10 <sup>-5</sup>	2,2 x 10 <sup>-5</sup>
Bt	0 D.A.S. <sup>B</sup>	10 <sup>-2</sup>	2,75 x 10 <sup>-5</sup>	3,0 x 10 <sup>-5</sup>	2,5 x 10 <sup>-5</sup>
	30 D.A.S. <sup>AB</sup>	10 <sup>-2</sup>	2,5 x 10 <sup>-5</sup>	2,0 x 10 <sup>-5</sup>	1,8 x 10 <sup>-5</sup>
	60 D.A.S. <sup>B</sup>	10 <sup>-2</sup>	2,9 x 10 <sup>-5</sup>	2,9 x 10 <sup>-5</sup>	2,0 x 10 <sup>-5</sup>
	90 D.A.S. <sup>AB</sup>	10 <sup>-2</sup>	1,7 x 10 <sup>-5</sup>	1,9 x 10 <sup>-5</sup>	1,9 x 10 <sup>-5</sup>
	120 D.A.S. <sup>A</sup>	10 <sup>-2</sup>	2,0 x 10 <sup>-5</sup>	2,1 x 10 <sup>-5</sup>	2,1 x 10 <sup>-5</sup>
	150 D.A.S. <sup>AB</sup>	10 <sup>-2</sup>	2,7 x 10 <sup>-5</sup>	2,9 x 10 <sup>-5</sup>	2,9 x 10 <sup>-5</sup>

Quantidade de unidades formadoras de colônias de bactérias (UFCs) por volume (0,1 mL) ao longo dos meses de coleta (dezembro de 2009 a maio de 2010) com média das três parcelas em uma área de cultivo de algodão geneticamente modificado Bt (Bt) e outra área de algodão convencional (Não Bt). Meses e culturas seguidos pela mesma letra não diferiram significativamente na média das três parcelas (Teste de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

Outros trabalhos, assim como este, também não encontraram variações significativas na população de bactérias no solo com plantio de algodão transgênicos tais como Donegan *et al.* (1995) também relataram que não houve nenhuma alteração significativa na rizosfera de algodão expressando Cry. Neste sentido, Siqueira *et al.* (2004) referem que uma das preocupações com a segurança dos cultivos transgênicos são os potenciais efeitos das proteínas expressas, particularmente da proteína Cry de *Bacillus thuringiensis*, que é uma bactéria de ocorrência natural no ambiente (solo e fitosfera). Essas proteínas, que são o princípio tóxico de controle de pragas, atuam com alta especificidade, ocorrem em baixas concentrações na planta, apresentam baixa persistência no solo (biodegradável) e têm toxicidade reduzida para organismos não-

alvo. Por essas razões, segundo esses autores, essas plantas não representam riscos de impacto ambiental.

Trabalhos realizados em outras condições tais como em laboratório e não em campo corroboram com este, como o de Koskella & Stotzky (2002) que evidenciaram que o emprego de várias toxinas Bt purificadas e adicionadas em meios de cultura em concentrações de até  $10 \text{ g.mL}^{-1}$  demonstraram baixa toxicidade dessas proteínas para representantes de variados e populosos grupos de microrganismos. Siqueira *et al.* (2004) citam que, de maneira geral, os resultados de pesquisas mostram que o cultivo de PGM's expressando proteínas Cry pode causar pequenas alterações biológicas no agroecossistema, mas enfatizam que essas alterações são de rara ocorrência, de reduzida quantidade e sem consequências deletérias à biota e aos processos biológicos do solo. Escher *et al.* (2000) não verificaram efeito da biomassa do milho expressando a proteína Cry1Ab mesma proteína expressa pelo algodão Bt em populações do decompositor *Porcellio scaber* da ordem Isopoda e família Porcellionidae e de microrganismos colonizadores de serrapilheira. Esses autores salientam que o baixo teor relativo das proteínas Cry nas plantas, de 0,01% a 0,02% do total de proteína solúvel (Strizhov *et al.* 1996), provavelmente contribuiu para a ausência de efeitos da biomassa de plantas Bt sobre esses organismos. Dados moleculares obtidos por Castaldini *et al.* (2005) também mostraram que resíduos liberados por milho transgênico não reduziu a riqueza bacteriana de espécies no solo rizosférico. A proteína Cry1Ab também não teve efeitos consistentes sobre minhocas, nematoides, protozoários, bactérias e fungos em solo ou *in vitro*, em investigação conduzida por Stotzky (2003). Porém, Donegan *et al.* (1995) observaram que a incorporação da biomassa de algodão, Não Bt ou expressando Cry1Ac, aumentou temporariamente as populações de bactérias do solo.

Nessa mesma perspectiva, estudos detectaram diferenças nas características microbiológicas em solos cultivados com variedades transgênicas e variedades de plantas controles. Tais estudos realizados contradizem os resultados obtidos nessa pesquisa. Em alguns estudos que obtiveram efeitos significativos das plantas transgênicas sobre a microbiota do solo, os efeitos foram atribuídos aos fatores ambientais, e, muitas vezes, verificou-se que estes fatores têm uma maior influência sobre as características microbiológicas dos solos do que o fator de responsabilidade da engenharia genética. Os efeitos são muitas vezes limitados à rizosfera das plantas transgênicas durante um período de tempo limitado ou quando estas plantas estão presentes (Widmer 2007).

Ao se tentar compreender os diferentes resultados de pesquisas observados no mundo todo, deve-se considerar que, como salienta Siqueira *et al.* (1994), a biota do solo encontra-se sob constantes interferências causadas por mudanças ambientais, disponibilidade de energia e deposição de fatores adversos, que geram variações quantitativas e qualitativas nas populações em tempo e espaço. À princípio, as alterações causadas pelos cultivos transgênicos sobre estas são raras, transitórias, de baixa intensidade e, apesar de ainda não completamente entendidas, como se verifica neste trabalho com relação à própria biologia do solo, não há evidência da existência de riscos reais a esse componente do agroecossistema. Segundo Siqueira *et al.* (2004), a análise dos resultados disponíveis na literatura científica mundial indica que as modificações relatadas para organismos e processos do solo em função da utilização de plantas Bt não diferem em qualidade e magnitude daquelas causadas por outras ações antrópicas e variações naturais do solo. A complexidade biológica e funcional do solo pode contribuir para minimizar os eventuais riscos da introdução dos cultivos transgênicos. Os mesmos autores ainda afirmam que, no caso dos organismos do solo,

as toxinas Bt são praticamente atóxicas para a maioria destes. Além disso, a concentração ambiental estimada encontrada no solo é muito baixa em relação a concentrações não tóxicas determinadas em ensaios controlados.

Na verdade, o ambiente rizosfera hospeda uma complexa rede de microrganismos que interage muito estreitamente com raízes de plantas, e os resultados dessa interação podem ser vistos na forte influência do tipo de planta sobre o ecossistema microbiano do solo. De fato, sabe-se que as comunidades bacterianas do solo são mais fortemente influenciadas por diferentes espécies de plantas e cultivares do que por outros fatores ambientais como o solo tipo e as práticas agrícolas (Gomes *et al.* 2001; Heuer *et al.* 2002) e, como comprovado por este trabalho, do que pela tecnologia Bt.

## CONCLUSÕES

De acordo com as condições em que a pesquisa foi conduzida, o cultivo de algodão geneticamente modificado (Bt) não alterou significativamente a quantificação de UFC's quando comparado com a cultivar não-Bt. No entanto, quando se comparam os diferentes meses de avaliação, observam-se diferenças no tamanho dessas populações que podem ocorrer em função de várias alterações ambientais do meio.

## REFERÊNCIAS

Brookes, P. C. 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. **Biology and Fertility of Soils** 19: 269-279.

Castaldini, M.; A.Turrini; C. Sbrana; A. Benedetti; M. Marchionni; S. Mocali; A. Fabiani; S. Landi;F. Santomassimo; B. Pietrangeli; M.P.Nuti; N. Miclaus & M. Giovannetti. 2005. Impact of Bt Corn on Rhizospheric and Soil Eubacterial

Communities and on Beneficial Mycorrhizal Symbiosis in Experimental Microcosms. **Applied and Environmental Microbiology** 71: 6719-6729.

Cattelan, A.J. & C. Vidor. 1990. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 14 : 125-132.

Donegan, K. K.; C. J. Palm; V. J. Field; L.A. Porteus; L.M. Ganio; D. L. Schaller; L.Q. Bucao.& R.J. Seidler. 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.

Donnegan, K.K. & R. Seidler. 1999. Effects of transgenic plants on soil and plant microorganisms. **Recent Research Developments in Microbiology** 3: 415-424.

Escher, N.; Käch, B. & W. Nentwig. 2000. Decomposition of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize by microorganisms and woodlice *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). **Basic and Applied Ecology** 1: 161–169.

Embrapa. 2001. **Algodão: tecnologia de produção. Embrapa.** Algodão. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste. 296 p.

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

Gomes, N. C. M.; H. Heuer; J. Schönfeld; R. Costa; L. Medonça-Hagler & K. SMALLA. 2001. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant Soil** 232: 167–180.

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.

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.

Kennedy, A. C. 1999. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment** 74: 65-76.

Koskella, J. & G. Stotzky. 2002. Larvicidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, *morrisoni* (strain tenebrionis), and *israelensis* have no microbicidal or microbiostatic activity against selected bacteria, fungi and algae in vitro. **Canadian Journal of Microbiology** 48: 262–167.

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-Weihenstephan. <http://www.lfl-neu.bayern>.

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 Soil** 339: 247-257.

Monnerat, R. & A. Bravo. 2000. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente 3: 163-200.

Neder, R. N. 1992. Microbiologia: manual de laboratório. São Paulo: **Nobel**. 138 p.,

Olsen, R.A. & L.R. Bakken. 1987. Viability of soil bacteria: optimization of plate counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. **Microbial Ecology** 13: 59-74.

Palm, C.J.; D.L. Schaller; K.K. Donegan & R.J. Seidler. 1996. Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *Kustaki* endotoxin. **Canadian Journal of Microbiology** 42 : 1258-1262.

Pereira, J.C.; M.C.P. Neves & A. Drozdowicz. 1996. **Quantificações das populações de bactérias em geral, de bactérias resistentes a antibióticos e de actinomicetos em solos**. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 26). Seropédica : **Embrapa-CNPAB**, 20 p.

Rui, Y.K. & G.X. Yi. 2005. Changes of Bt toxin in the rhizosphere of transgenic Bt cotton and its influence on soil functional bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 21: 1279–1284.

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 Soil** 285:149–159.

Siqueira, J. O.; F. M. S. Moreira; B. M. Grisi; M. Hungria & R. Araújo. 1994. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. Brasília: Embrapa-CNPAF. p. 142.

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.

Sorheim, R.; V.L. Torsvik; J. Goksoyr. 1989. Phenotypical divergences between populations of soil bacteria isolated on different media. **Microbial Ecology** 17:181-192.

Stotzky, G. 2003. Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. **Plant and Soil** 266: 77–89.

Strizhov, N.; M. Keller; J. Mathur; Z. Koncz-Kalman; D. Bosch; E. Prudovsky; J. Schell; B. Sneh; C. Koncz & A. Zilberstein. 1996. A synthetic cryIC gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* deltaendotoxin, confers *Spodoptera* resistance in alfalfa and tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 93: 15012–15017.

Thorton, H. G. 1922. On the development of a standardized agar medium for counting soilbacteria with special regard to the repression of spreading colonies. **Annals of Applied Biology** 9: 241-274.

Vieira, F.C.S.& E. Nahas. 2005.Comparison of microbial numbers in soils by using various culture media and temperatures. **Microbiological Research** 160:197-202,

Widmer, F. 2007. Assessing Effects of Transgenic Crops on Soil Microbial Communities. **Biochemical Engine Biotechnology** 107: 207–234.

## Capítulo 2

### Caracterização Molecular de Populações Bacterianas de Solo com Cultivo de Algodão Geneticamente Modificado Resistente a Insetos

#### Molecular Characterization of Bacterial Populations in Soil Planting Cotton genetically modified insect resistance

ABSTRACT. Analyses of soil bacterial populations are methods to identify effects of plantations on the ground. So this study aimed to characterize the bacterial populations in soil by analysis of 16S rRNA, analyzing soil with two varieties of *Gossypium hirsutum* L. being one a Bt and another a non-Bt variety, both in Dourados City, Mato Grosso do Sul, Brazil. We used primers specific for 16S rRNA genes for the DNA sequencing of both soil metagenomics, these were amplified by PCR, the amplicons were cloned and 371 clones of two libraries were sequenced. Using the technique of 16S rRNA generated the identification of different populations of soil bacteria and Archaea belonging to the phylum *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Crenarchaeota*, *Deinococcus-Thermus*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaeta*, *Thermotogae* and uncultivated bacteria distributed among the two cultivars. In this context, genetically modified plants did not show significant differences between the populations of bacteria studied crops.

KEYWORDS. Metagenomic , *Gossypium hirsutum* L., 16S rRNA

RESUMO. Análise de populações bacterianas do solo é um método para identificar efeitos das plantações agrícolas sobre o solo. Desta forma, este trabalho teve por objetivo caracterizar as populações bacterianas presentes no solo através da análise do gene 16S rRNA, analisando o solo onde foram cultivadas duas variedades de *Gossypium hirsutum L.*, sendo uma Bt e outra não-Bt, ambos no município de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Foram utilizados oligonucleotídeos específicos, de genes 16S rRNA para o sequenciamento do DNA metagenômico de ambos os solos, estes foram amplificados por PCR, os amplicons foram clonados e 371 clones de duas bibliotecas genômicas foram sequenciados. O uso dessa técnica gerou a identificação de diferentes populações de bactérias e Archaeas de solo pertencentes aos filos *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Crenarchaeota*, *Deinococcus-Thermus*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Thermotogae*, além de bactérias não cultivadas distribuídas dentre as duas cultivares. Neste âmbito, as plantas geneticamente modificadas não apresentaram diferenças significativas das populações de bactérias entre os cultivos estudados.

PALAVRAS-CHAVES. Metagenoma, *Gossypium hirsutum L.*, 16S rRNA.

## INTRODUÇÃO

Na agricultura busca-se constantemente o aumento da produtividade das culturas por meio da utilização do melhoramento genético de plantas. Com isso genes exógenos, os quais podem ser de diferentes fontes, como plantas, microrganismos e animais, vêm sendo inseridos nas plantas a fim de conferir resistência, maior produção e menor gastos com produtos químicos, além de outras características (Siqueira *et al.* 2004).

Dentre as principais culturas geneticamente modificadas comercializadas no mundo, estão o algodão, a soja, o milho e a canola (Guerrante 2003). O algodão Bt foi geneticamente modificado para expressar o gene cry 1AC através da inserção de genes que codificam a proteína cristal da bactéria entomopatôgena *Bacillus thuringiensis* (Bt). Tais proteínas possuem ação tóxica e altamente específica para larvas de insetos de três ordens: Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (Valadares-Inglis *et al.* 1998).

Apesar das vantagens que as culturas transgênicas apresentam, existe uma preocupação em relação aos efeitos que podem acarretar no ambiente e em organismos não alvo, devido a produção de diferentes compostos que são incorporadas no solo por meio dos exsudatos liberados pelas raízes, resíduos de folhas durante a decomposição, ou a incorporação dos restos dos cultivos transgênicos após a colheita promovendo o contato direto dos microrganismos do solo com a endotoxina Cry (Motavalli *et al.* 2004; Rui *et al.* 2005; Fang *et al.* 2007).

A microbiota do solo desempenha funções no ecossistema, tais como armazenamento de água, decomposição de resíduos orgânicos, reciclagem de nutrientes, sequestro e desintoxicação de substâncias tóxicas e é influenciada pelo manejo e cobertura vegetal do solo, sendo as bactérias influenciadas por exsudatos e tecidos radiculares mortos, tornando-se sensíveis às alterações causadas pelos sistemas de manejo utilizados (Cattelan & Vidor 1990; Costanza *et al.* 1997).

A diversidade microbiana estrutural vem atualmente sendo estudada por meio de métodos que se baseiam na investigação de parte da sequência do DNA, notadamente o gene 16S rDNA em bactérias, e 18S rDNA em fungos, que é amplificado por PCR e posteriormente caracterizado por meio da clonagem e sequenciamento ou, então, analisado por eletroforese, por meio das técnicas de Ardra, T-RFLP, RAPD, RISA, DGGE/TGGE e SSCP, obtendo-se um perfil da comunidade microbiana (Ranjard *et al.* 2000; Kozdrój & Van Elsas 2001).

Métodos moleculares de análise da estrutura e diversidade microbiana, utilizando DNA genômico extraído diretamente de amostras ambientais, surgiram na última década e têm permitido um avanço considerável no estudo da ecologia de microrganismos (O'Donnell & Göres 1999; Ranjard *et al.* 2000). Essas técnicas permitem a identificação de fatores empregados no manejo do solo que interferem nas múltiplas funções e habitats da comunidade microbiana (Sayler & Layton 1990; Peters *et al.* 2000), bem como a caracterização detalhada da estrutura e sucessão microbiana em solos agrícolas, incluindo os microrganismos não cultiváveis (Hugenholtz *et al.* 1998) e as espécies predominantes, que podem ser utilizadas como indicadoras de funcionalidade e qualidade do solo (O'Donnell & Göres 1999).

Com objetivo de estudar se o algodão Bt afeta a população de bactérias existente no solo, foram realizadas análises metagenômicas de dois solos, sendo um proveniente do cultivo com algodão Bt (NuOpal<sup>®</sup> Bollgard<sup>®</sup>) e outro com algodão não-Bt (Delta Opal<sup>®</sup>), por meio da análise 16S rRNA .

## MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos em área agrícola da Fazenda Experimental da Universidade Federal da Grande Dourados, em Dourados, Mato Grosso do Sul, (L 22°11'53" S, L 54° 55' 59" W, A 430 m). O clima, de acordo com a classificação de Koppen, é Cfa (Clima Mesotérmico Úmido sem estiagem, em que a temperatura do mês mais quente é superior a 22°C, apresentando, no mês mais seco, precipitação superior a 30 mm). A precipitação pluviométrica total anual da região é 1200 a 1400 mm. Já a evapotranspiração real anual é de 1100 a 1200 mm, e a temperatura média anual de 22°C. A variação mesoclimática é de Úmido a Sub-úmido, com excedente hídrico anual de 800 a 1200 mm durante cinco a seis meses e deficiência hídrica de 350 a 500 mm durante quatro meses.

O solo predominante da região é o Latossolo Vermelho distroférico, porém, encontra-se também, Argissolo Vermelho e Neossolos Quartzarênicos. O Latossolo Vermelho distroférico apresenta-se com textura argilosa e fertilidade natural variável, além de textura média e caráter álico, porém, é profundo, friável, e com grande homogeneidade ao longo de todo o perfil. O relevo é plano e suave ondulado, as características físicas e químicas dos solos utilizados encontram-se na tabela 1. A cobertura vegetal consiste basicamente de pastagem e agricultura formada em região da Floresta Estacional Semidecidual e região de Cerrado. O sistema aplicado é o cultivo direto tendo como cultura antecessora o milho da cultivar BRS 1501<sup>®</sup> (*Pennisetum glaucum* L.).

Nesse local foram demarcadas duas áreas amostrais de 5000 m<sup>2</sup> cada, onde foram implantadas as culturas que constituíram os tratamentos avaliados. O primeiro tratamento foi uma cultivar de algodão-Bt (NuOpal<sup>®</sup> Bollgard<sup>®</sup>) e o segundo tratamento

foi sua isolinha, uma cultivar não-Bt (Delta Opal<sup>®</sup>) de características agronômicas semelhantes à utilizada no primeiro tratamento.

A amostragem foi realizada em maio de 2010, aos 150 D.A.S. (dias após a semeadura) e as amostras de solo coletadas em três repetições em cada área, com auxílio de trado tipo holandês, com 0 a 15 cm de profundidade, que resultou em uma amostra total de cada cultivar, depois de terem sido reunidas e homogeneizadas. O solo coletado foi acondicionado em sacos plásticos, no interior de caixa de isopor em condições ambientais (para manutenção de seu teor de umidade) (Pereira *et al.* 1996), conduzido ao Laboratório de Microbiologia e conservado em ambiente refrigerado. Os tratamentos culturais padrão foram adotados com base na boa prática agrícola em todas as áreas, de acordo com recomendações de Embrapa (2001) e em ambas as áreas não houve tratamento com nenhum tipo de fungicida ou inseticida. A semeadura nas duas áreas foi realizada no dia 31 de dezembro de 2009, com uma densidade de 10 a 14 sementes por metro linear, o espaçamento entre fileiras foi de 0,90 metros.

As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Solos da Faculdade de Ciências Agrárias da UFGD para análise química referente à quantidade dos micro e macronutrientes, pH e para análise física granulométrica (Tabela I) e para o Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas – LBMP na Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Campus de Jaboticabal, para as análises moleculares.

A extração do DNA das amostras dos solos foi realizada utilizando FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit (Bio 101 – catálogo # 6560-200). O DNA metagenômico, após extraído e quantificado, foi amplificado em uma reação de PCR utilizando primers específicos fD1: (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1: (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') que amplificam a região 16s rDNA. As reações de PCRs foram realizadas segundo

metodologia descrita por Pereira *et al.* (2006) e Silveira *et al.* (2006). O produto da PCR amplificado de ambas as amostras foram clonados no vector pJET1.2/blunt utilizando o kit de clonagem Clone Jet (Fermentas - catálogo #K1231), e usado para a transformação da cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Após o cultivo dos clones transformados, o DNA plasmidial foi isolado por miniprep (Saitou & Nei 1987). O seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA foi realizado segundo metodologia descrita por Pereira *et al.* (2006) e Silveira *et al.* (2006). Cada uma das seqüências clone original foi definida operacionalmente como uma unidade taxonômica operacional (OTU).

Após o sequenciamento das amostras, a imagem do gel foi analisada pelo programa "Sequencing Analysis 3.4", que gerou os eletroferogramas das seqüências. Os eletroferogramas foram submetidos ao pacote de programas "Phred/Phrap/Consed" (Gordon *et al.* 1998), a fim de verificar a qualidade da seqüência e a presença de DNA quimérico. As seqüências foram comparadas com seqüências do banco de dados RDP database (Ribossomal Database Project - <http://rdp.cme.msu.edu/>) através do programa Seqmath (Dunbar *et al.* 1999).

Árvores filogenéticas foram construídas oriundos do sequenciamento de 371 seqüências com o auxílio dos programas ClustalW para alinhamento global das seqüências, rodado dentro programa Mega 5.0. Posteriormente, o arquivo alinhado seguiu para reconstrução filogenética, utilizando o método Neighbor-joining, o modelo de substituição de nucleotídeos utilizado foi Jukes-cantor. Utilizou-se o teste de filogenia bootstrap rodado 1000 vezes.

Para mensurar o índice de diversidade foram utilizados os índices Simpson's e Shannon's, para mensurar o índice de dominância foi utilizado o índice Simpson's; tais índices foram calculados no software DivEs (Rodrigues 2005).

## RESULTADO E DISCUSSÃO

A fim de investigar possíveis efeitos das PGM's sobre a comunidade bacteriana do solo, este trabalho avaliou um total de 371 clones parcialmente sequenciados pertencentes a duas bibliotecas metagênicas: uma Bt composta por 181 clones e a outra não-Bt composta por 190 clones. As bibliotecas de ambos os tratamentos foram comparadas com sequências do banco de dados RDP database (Ribosomal Database Project - <http://rdp.cme.msu.edu/>). Para a comparação das bibliotecas os dados foram normalizados já que de um cultivar para o outro apresentou diferenças no número de clones. Na biblioteca Bt, das 181 sequências foram detectados 11 filos dentro do domínio *Archaea* e *Bacteria*, destes 7,8% pertenciam ao filo *Actinobacteria*; 1,1% *Bacteroidetes*; 0,5% *Chloroflexi*; 3% *Crenarchaeota*; 0,3% *Deinococcus-Thermus*; 2,7% *Euryarchaeota*; 3% *Firmicutes*; 0,3% *Gemmatimonadetes*; 27,5% *Proteobacteria*; 0,5% *Spirochaetes*, 0,8% *Thermotogae* e 1,3% não se agruparam em nenhum filo (Figura 1). Na biblioteca não-Bt foram detectados 13 filos dentro do domínio *Archaea* e *Bacteria* destes 0,3% pertenciam ao filo *Acidobacteria*; 7,5% ao *Actinobacteria*; 0,3% ao *Aquificae*; 0,3% *Bacteroidetes*; 0,5% *Crenarchaeota*; 0,3% *Euryarchaeota*; 3,5% *Firmicutes*; 0,3% *Fusobacteria*; 0,3% *Gemmatimonadetes*; 0,3% *Planctomycetes*; 36,9% *Proteobacteria*; 0,3% *Spirochaetes*; 0,3 de *Thermotogae*; 0,3% não se agruparam em nenhum filo (Figura 2). Nos dois cultivos a maioria das sequências observadas pertencia ao domínio *Bacteria*, apesar de ter sido detectado a presença do domínio *Archaea*, embora o oligonucleotídeo utilizado ser específico para as bactérias (Tabela II).

Foram realizadas análises das árvores filogenéticas que se pôde determinar em qual grupo os organismos não identificados pertenciam e estimar quais os grupos mais abundantes observados em cada solo estudado. Deste modo foi feita uma análise dos

principais grupos encontrados no solo com cultivo de algodão transgênico e não transgênico (Figura 4 e 5).

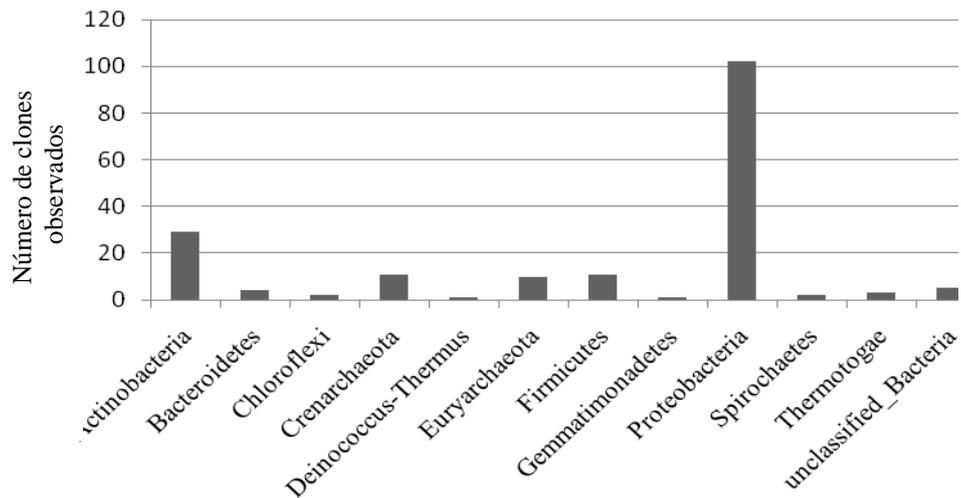


Fig.1- Clones obtido a partir de sequências parciais do gene 16S rRNA do solo com cultivo de algodão Bt.

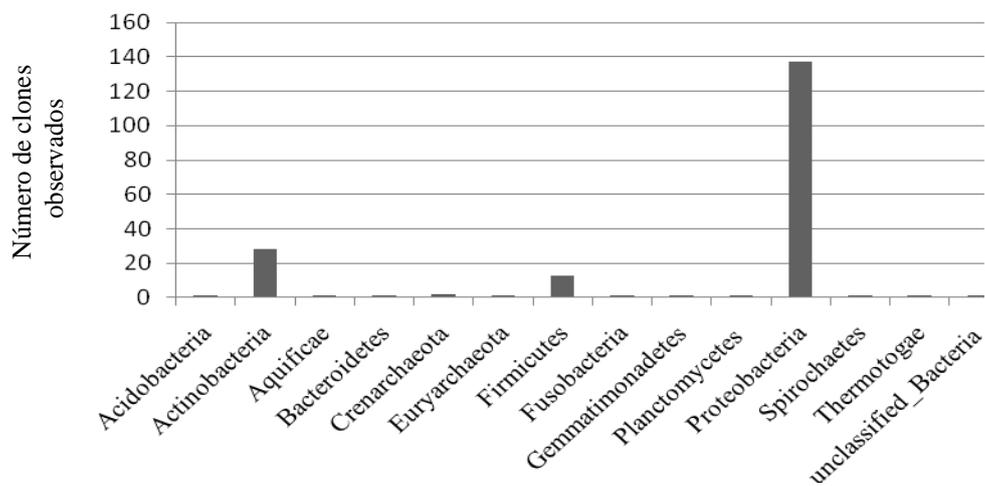


Fig. 2 - Clones obtido a partir de sequências parciais do gene 16S rRNA do solo com cultivo de algodão não Bt.

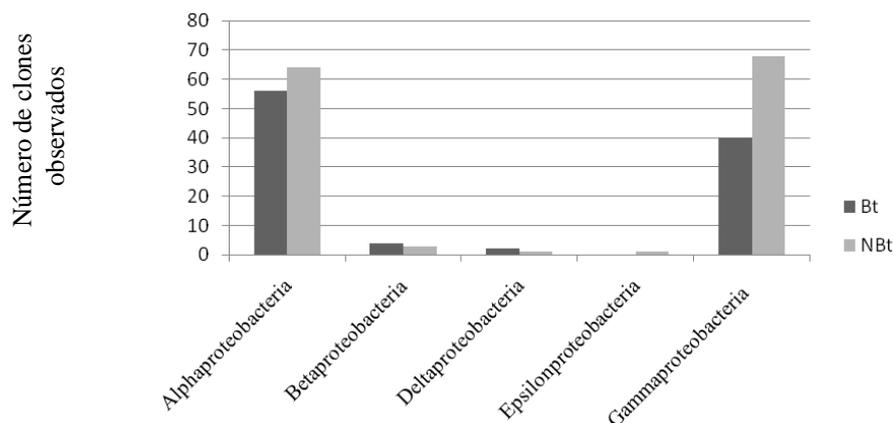


Fig.3 – Clones pertencentes a Proteobactéria, obtido a partir de seqüências parciais do gene 16 S rRNA do solo com cultivo de algodão Bt e não Bt.

Tabela I - Caracterizações químicas e físicas dos solos cultivados com algodoeiro. Dourados, MS.

Parâmetros	Solos com cultivos	
	Bt	Não Bt
Argila	76,9	78,5
Areia	11,4	12,5
Silte	11,7	9,0
K	7,6	10,7
P	20,4	24,6
Al	1,6	2,9
Ca	5,2	5,8
Mg	2,3	2,7
H+Al	4,6	5,4
V%	64,5	63,6
T	128,2	149,5
S.B.	82,3	95,7
C%	1,2	1,0
M.O.	20,9	17,2
pH H <sub>2</sub> O	6,1	6,0
pH CaCl <sub>2</sub>	5,0	5,2
pH SMP	6,2	6,0
Cu	9,2	6,5
Zn	2,4	1,2
Fe	51,3	22,5
Mn	71,5	55,2

P, Cu, Fe, Zn e Mn- mg/dm<sup>3</sup>; Ca, Mg e H+Al - cmol; K, Al- mmol; M.O - %.

Tabela II – Distribuição das seqüências dos clones 16S rRNA observados nos solos Bt e Não Bt.

Domínio Archaea/ Bacteria	Número de Clones Observados				
	Filo	Bt	%	Não Bt	%
Domínio Archaea/Bacteria					
<i>Acidobacteria</i>	0	0,0	1	0,3	
<i>Actinobacteria</i>	29	7,8	28	7,5	
<i>Aquificae</i>	0	0,0	1	0,3	
<i>Bacteroidetes</i>	4	1,1	1	0,3	
<i>Chloroflexi</i>	2	0,5	0	0,0	
<i>Crenarchaeota</i>	11	3,0	2	0,5	
<i>Deinococcus-Thermus</i>	1	0,3	0	0,0	
<i>Euryarchaeota</i>	10	2,7	1	0,3	
<i>Firmicutes</i>	11	3,0	13	3,5	
<i>Fusobacteria</i>	0	0,0	1	0,3	
<i>Gemmatimonadetes</i>	1	0,3	1	0,3	
<i>Planctomycetes</i>	0	0,0	1	0,3	
<i>Proteobacteria</i>	102	27,5	137	36,9	
<i>Spirochaetes</i>	2	0,5	1	0,3	
<i>Thermotogae</i>	3	0,8	1	0,3	
<i>unclassified_Bacteria</i>	5	1,3	1	0,3	
<b>TOTAL</b>	<b>181</b>	<b>48,8</b>	<b>190</b>	<b>51,2</b>	

% referente a quantidade do filo dentro do cultivo comparando através de dados normalizados, obtidos através de comparação com RDP database.

Dentre os filios encontrados, *Chloroflexi* foi encontrado somente no solo Bt e *Planctomycetes* somente no não-Bt (Tabela II); esses, segundo Beer *et al.* (2002) e Liu *et al.* (2001), têm sido os filios menos estudados pela pesquisa mundial.

O filo *Planctomycetes* apresentou 0,3% de ocorrência no solo não Bt (Tabela II), tal filo é composto por organismos aeróbios, que se dividem por brotamento e é um dos poucos grupos bacterianos que não possui peptidoglicano em sua parede celular. Apesar de possuir cepas em coleções de culturas, segundo Gripenburg *et al.* (1999) este filo foi pouco obtido a partir de amostras de solo, o que justifica o seu surgimento em apenas uma das culturas estudadas neste trabalho .



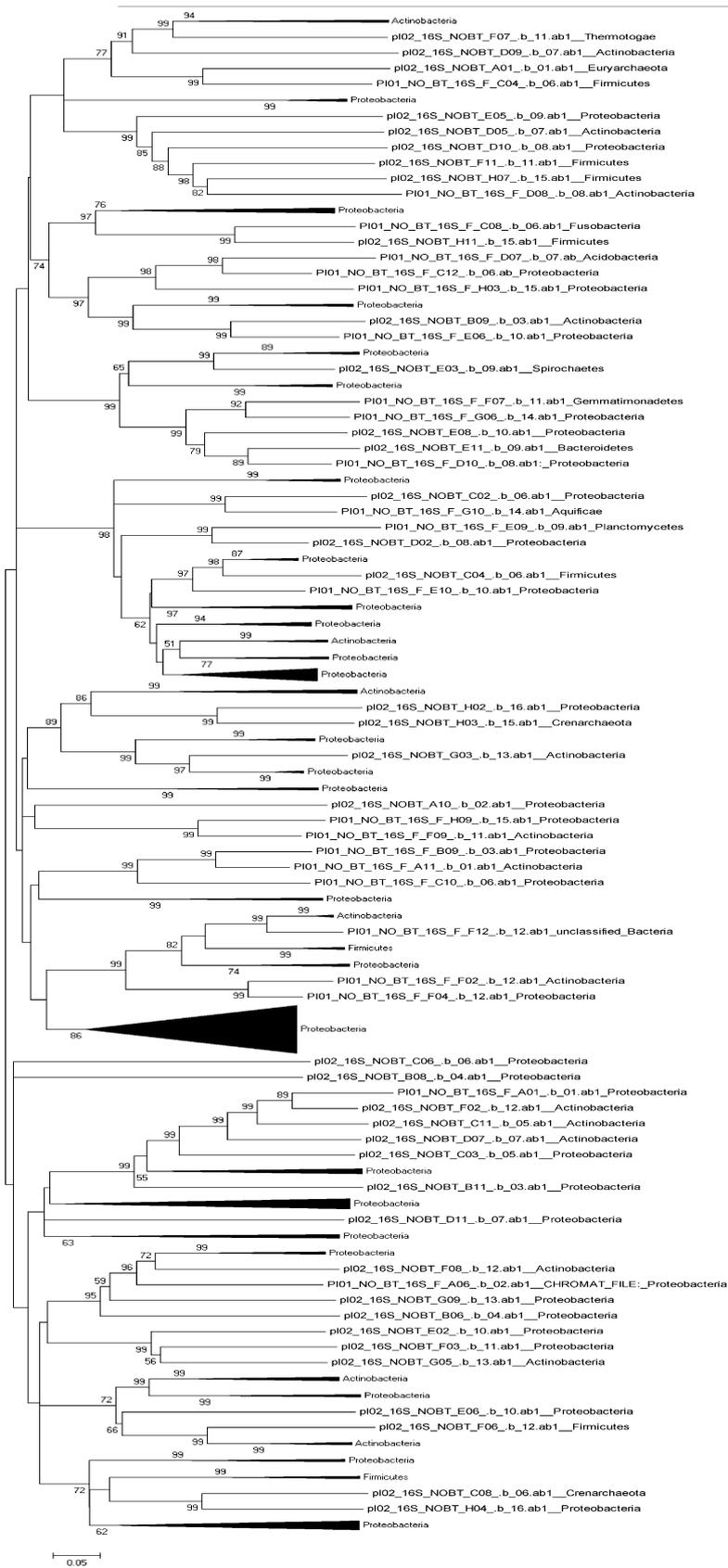


Fig. 5- Árvore filogenética demonstrando a relação filogenética entre seqüências obtidas pelo método de sequenciamento parcial do gene 16S do solo Não Bt.

O filo *Chloroflexi* apresentou 0,5% de ocorrência no solo Bt (Tabela II), este filo é constituído de organismos heterotróficos, aeróbios, filamentosos e, apesar de serem encontrados nos solos, pouco se sabe sobre a função que exercem; estes possuem uma alta diversidade de fenótipos mesmo entre os poucos isolados que têm sido cultivados (Rappé & Giovannoni 2003).

O filo *Deinococcus-Thermus* apresentou ocorrência de 0,3% e teve ocorrência apenas em solo com plantio Bt (Tabela II) este filo é bem conhecido devido sua resistência aos raios UV, dessecação, radiação ionizante, à água oxigenada e a outros agentes que danificam o DNA. Esta resistência se deve a uma alta eficiência no sistema de reparo do DNA. Existe um grande interesse neste filo em relação à biorremediação de sítios contaminados com radiação e produtos químicos tóxicos e também devido à produção de uma série de enzimas termoestáveis de importância biotecnológica, como por exemplo, a Taq polimerase (Minton 1994; Battista 1997; Ferreira *et al.* 1997; Brim *et al.* 2000).

Dentre os filios observados somente em solos com plantio de algodão não-Bt estão *Acidobacteria*, *Aquificae* e *Fusobacteria*, tais filios apresentaram 1% de ocorrência (Tabela II). O filo *Acidobacteria* serve como indicativo da condição nutricional do solo com baixo potencial de crescimento (Smit *et al.* 2001). Este filo costuma ser bastante numeroso na maioria dos solos (Kuske *et al.* 1997; Nogales *et al.* 1999; Felske *et al.*, 2000), no entanto, neste trabalho somente foi registrado na biblioteca não-Bt e mesmo assim somente um clone deste foi encontrado, o que corrobora com trabalho de Kishimoto & Tano 1987 e Sait *et al.* 2002. O filo *Aquificae* constitui a linha evolutiva mais antiga entre as bactérias, engloba organismos gram-negativos autotróficos; tais organismos são estritamente termofílicas com crescimento ótimo geralmente acima de 65 °C (Deckert *et al.* 1998; Reysenbach 2001; Huber & Eder 2002) o que justifica seu

surgimento apenas no cultivar Não-Bt já que tal área estudada não possui temperatura adequada para seu crescimento e desenvolvimento. Em termos do seu metabolismo, a maioria das espécies do filo *Aquificae* é hidrogênio-oxidantes e utilizam o hidrogênio como o doador de elétrons único e oxigênio como receptor de elétrons (Reysenbach 2001; Huber & Eder 2002). Alternativamente, tiosulfato ou enxofre também podem ser usados como fontes de energia devido à sua termoestabilidade, muitas das enzimas resultantes de seu metabolismo são de interesse para aplicações industriais e biotecnológicas (Huber & Stetter 1998; Van den Burg 2003).

Em relação aos filos encontrados em ambas as culturas, o filo *Proteobacteria* foi o que obteve um maior número de clones seguido por *Actinobacteria* e *Firmicutes* apresentando 27,5% Bt e 36,9% não Bt, 7,8% Bt e 7,5% não Bt e 3,0% Bt e 3,5% não-Bt, respectivamente (Tabela II). O filo *Proteobacteria* foi desmembrado em classe dos quais foram encontrados nos solos estudados *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Epsilonproteobacteria* (Figura 3). Este filo é um dos maiores e mais variados dentre os filos de bactérias cultivadas, apresentando uma grande diversidade morfológica e metabólica. Devido a tais características, ocorre em diversos ambientes (Hugenholtz *et al.* 1998; Dunbar *et al.* 1999; Smit 2001) o que caracteriza o aparecimento em ambas as culturas. O resultado deste trabalho corrobora com Lee *et al.* (2011) que, analisando o efeito de *Zoysia Grass* geneticamente modificada sobre a comunidade bacteriana do solo, também obteve o filo *Proteobacteria* como um dos filos mais abundantes dentre as culturas avaliadas. Outros trabalhos como de Janssen (2006) também obtiveram tal filo como mais abundante. Este filo também foi dominante em amostras de solo da Mata Atlântica (Faoro *et al.* 2010). E em comparação com a linhagem *Acidobacteria*, que em vários trabalhos são relatados como um dos filos de maior abundância, o filo *Proteobacteria* é mais estável e não

parecem diferir em resposta à rotação de lavoura, colheita e tipo de cultura o que corrobora com o fato de que Acidobacterias não ter tido grande presença neste trabalho. Resultados semelhantes foram observados por Val-Moraes *et al.* (2009) sugerindo que a razão entre o número de Proteobactérias serve como indicativo da condição nutricional do solo, pois possui um alto potencial de crescimento.

O filo *Actinobacteria* foi o segundo filo que teve maior ocorrência nos dois cultivares de algodão 7,8% Bt e 7,5% Não Bt (Tabela II). Os *Actinomicetos* são amplamente distribuídos na natureza, habitando principalmente o solo. Estes possuem importantes compostos bioativos de alto valor comercial (Oskay *et al.* 2004). O filo *Actinobacteria* é um grupo, também conhecido por Bactérias gram-positivas de elevado conteúdo G+C, é constituído por organismos cujo teor de G+C do DNA é superior a 50–55. Os membros deste grupo são procariotas com uma enorme diversidade morfológica, desde cocos, a bastonetes regulares ou irregulares, e hifas ramificadas. Nenhuma destas bactérias produz endósporos verdadeiros, embora muitas formem esporos assexuados e algumas tenham ciclos de vida complexos. As paredes celulares apresentam considerável variação na sua composição química, em particular no peptidoglicano (Janssen *et al.* 2002). Este filo é considerado muito importante, devido a sua característica de produção de diversos antibióticos e deste modo podem controlar diversos grupos bacterianos (Keller & Zengler 2004) o que sugere que este filo tenha inibido o desenvolvimento de outros filios neste estudo.

Os filios *Proteobacteria* e *Actinobacteria* estão relacionados com o ambiente solo e, conseqüentemente, são menos afetados por alterações no metabolismo das plantas e liberação de nutrientes no ambiente rizosférico (Gomes *et al.* 2001; Araujo *et al.* 2002; Salles *et al.* 2006) com isso explica o aparecimento de ambos os filios em maior abundância em ambas as culturas estudadas.

O filo *Firmicutes* foi o terceiro filo que possui maior ocorrência em ambos cultivares, 3% Bt e 3,5% não Bt (Tabela II), este filo também conhecido por Bactérias gram-positivas de baixo conteúdo G+C, é constituído por organismos cujo teor de G+C do DNA é inferior a 50. A maioria destes organismos é gram-positiva e heterotrófica. Os micoplasmas encontram-se também incluídos neste grupo apesar de não possuírem parede celular e (consequentemente) reagirem como gram-negativas. Este grupo apresenta uma considerável diversidade morfológica (cocos, bastonetes lineares, espirilos e formas pleomórficas, no caso dos micoplasmas). Alguns membros formam endósporos tais como as *Bacillus thuringiensis* (Ahmad *et al.* 2000) bactéria da qual o gene foi implantado na planta relatada neste trabalho.

Foi detectada a presença do domínio *Archaea* em ambos os cultivos, este domínio têm sido, na sua maioria, isoladas de habitats extremófilos e possuem geralmente um metabolismo quimioautotrófico. As *Archaea* dividem-se em dois filios, com base nas suas sequências de rRNA: o filo *Euryarchaeota* e o filo *Crenarchaeota*.

Nos respectivos solos, pôde-se observar também a existência de alguns microrganismos que não foram classificados e nem se agruparam a nenhum filo bacteriano 1,3% Bt e 0,3% Não Bt, estes segundo Ward (2003) indicam possibilidade de serem novos filios incultiváveis pertencentes ao Domínio Bactéria.

Com relação aos índices de diversidade avaliados, Shannon's e Simpson's, ambos apresentaram-se maior na cultura Bt do que na não-Bt (Tabela III). Este se deve pelo fato que na análise de diversidade de Shannon's referir-se a termos de abundância, entre as espécies desta área, uma vez que o máximo de diversidade em uma amostra que pode ser obtida com este índice é a condição onde todas as espécies são igualmente abundantes (Stiling 1999). Já o índice de Simpson's caracteriza que na área Bt, a dominância de poucas espécies é maior, ou seja, como este índice valoriza as espécies

abundantes em detrimento das espécies raras, pode-se afirmar que o número de espécies abundantes no cultivar Bt é maior que no não Bt, onde as espécies raras ocorrem em maior número. Em relação ao índice de dominância de Simpson's, o solo não Bt apresentou-se maior por possuir um número maior de filos (Tabela III).

Tabela III - Índices de Shannon's e Simpson's de ambos cultivares expresso em porcentagem.

	Índice de diversidade		Dominância
	Shannon's	Simpson's	Simpson's
Bt	0,6625	0,6481	0,3519
Não Bt	0,4454	0,4557	0,5443

Todos os parâmetros avaliados neste trabalho não apresentam efeito específico das PGM's sobre as populações de bactérias do solo. Ambos os cultivos apresentaram alguns filos que não se apresentaram no outro, tendo sido encontrado *Acidobacteria*, *Aquificae*, *Fusobacteria*, *Planctomycetes* no cultivo não Bt e *Chloroflexi* e *Deinococcus-Thermus* no cultivo Bt (Figura 1 e 2), apesar destes filos estarem presentes em um e não no outro cultivo, o número representativo de cada um destes filos não são considerados significativos e assim não deve ser atribuído como um impacto e nem como favorecimento de espécies, pois a comunidade bacteriana em um ambiente é dinâmico, possui flutuações e sucessões o tempo todo (Jung 2007). Deste modo, avaliações de impacto de culturas transgênicas sobre estes microorganismos podem apresentar variações em relação a outras características que nem sempre estão associadas ao cultivo de PGM's, mas sim a fatores ambientais, como temperatura e umidade, por exemplo. Diferenças naturais entre as amostras, ao invés de efeitos das plantas geneticamente modificadas foram sugeridas como as principais causas de variação por alguns estudos anteriores (Heuer *et al* 2002;. Blackwood & Buyer 2004; Fang *et al.* 2005).

Widmer (2007) em sua revisão sobre os efeitos de culturas transgênicas para as comunidades microbianas do solo concluiu que os fatores ambientais ou o tipo de cultura, frequentemente, tem maiores efeitos sobre as características microbiológicas do solo do que os tratamentos transgênicos propriamente ditos, e que os efeitos relatados são restritos à rizosfera das plantas transgênicas e permanecem apenas no período em que elas se encontram presentes.

Corroborando com os resultados encontrados neste trabalho outros estudos com plantas transgênicas também não detectaram efeitos significativo de tais culturas (Chiarini *et al.* 1998; Min *et al.* 2005). Schmalenberger & Tebbe 2002 não encontraram diferenças significativas na comunidade bacteriana do solo com cultivo de milho resistente a herbicida e sua isolinha não transgênico de acordo com a técnica 16S rDNA PCR- SSCP (Single-strand conformation polymorphism). Lottmann *et al.* (2000) não detectaram diferenças na comunidade bacteriana na rizosfera com plantio de batata transgênica comparando com o tipo selvagem através da técnica de eletrofore em gel com gradiente desnaturante DGGE.

Li *et al.* (2011) avaliou o impacto do algodão transgênico resistente a insetos cry1Ac durante três anos de cultivos consecutivos e descobriu que ao longo prazo o plantio de algodão transgênico não tem efeito significativo adversos ou de outra forma sobre os microrganismos do solo. Qualquer efeitos referente ao algodão transgênico foram referentes as variações sazonais, o que sugere que as diferenças são insignificantes em comparação com variação de fundo natural.

Trabalhos como o de Shen *et al.* (2006) que não encontrou efeitos significativos do algodão Bt na diversidade microbiana do solo, e o de Saxena & Stotzky (2001), não encontraram alterações nos números de bactérias aeróbias e fungos devido à presença da proteína Cry1Ab nos exsudatos radiculares de milho e durante a decomposição dos

tecidos reforçam o resultado da presente pesquisa que o algodão Bt não apresentou diferenças significativas sobre a população de bactérias do solo em ambos os cultivares estudados em condições de campo.

Porém, outros estudos como de Donegan *et al.* (1995) observaram que dois híbridos de algodão, que expressam a endotoxina de *B. thuringiensis*, causaram aumento nos níveis de bactérias totais e populações fúngicas em relação aos outros tratamentos, sendo também detectadas mudanças na composição da comunidade bacteriana. No entanto, Rui *et al.* (2005) observaram maior número de bactérias funcionais associadas às raízes do algodão convencional do que na rizosfera de variedades de algodão transgênico (NuCOTN99 (Bt) e SGK321 (Bt + CpTI)).

Em estudo com mamão transgênico resistente a vírus, foram observados aumentos significativos no número de bactérias, actinomicetos e fungos no solo, em relação ao solo de mamão convencional (Wei *et al.* 2006). Dunfield *et al.* (2001) observaram que a diversidade funcional e composição da comunidade microbiana da rizosfera de uma variedade transgênica de canola (*Brassica napus*) tolerante a herbicida, foram diferentes da variedade convencional.

Alguns autores, tais como Dunfield & Germida (2003, 2004), revelam que quando existe a presença de algum tipo de efeito das PGM's sobre tais organismos do solo tal efeito é considerado temporário e transitório, pois desaparece com a remoção da cultura do campo.

A questão recorrente: se as culturas PGM possuem alguma ou nenhuma influência substancial sobre a comunidade bacteriana do solo, nunca é uma pergunta fácil de responder, deste modo monitoramento contínuo e sistemático de tais efeitos utilizando diferentes abordagens seria ideal para responder a tal pergunta com confiança.

## CONCLUSÃO

No presente estudo não foram observados diferenças significativas entre os cultivares transgênicos e não transgênicos, apesar das bibliotecas terem apresentado alguns filos diferentes do qual foi encontrado em uma e não em outra, no entanto as causas para essas diferenças podem ser atribuídas às condições ambientais e estruturais do solo e, não propriamente, ao efeito da transgenia.

## REFERÊNCIAS

Araujo, W.L.; J. Marcon; W. Maccheroni; J.D. Van Elsas; J.W.L. Van Vuurde & J.L. Azevedo. 2002 Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied Environmental Microbiology** **68**: 4906–4914.

Ahmad, S.; A. Selvapandiyan & R.K. Bhatnagar. 2000. Phylogenetic analysis of Gram-positive bacteria based on *grpE*, encoded by the *dna* Koperon. **International Journal of Systematic Microbiology** **50**:1761–1766

Battista, J. R. 1997. Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. **Annual Review Microbiology** **51**:203–224

Beer, M.; E.M. Seviour; Y. Kong; M. Cunningham; L.L. Blackall & R.J. Seviour. 2002. Phylogenetic of the filamentous bacterium Eikelboom type 1851, and design and

application of a 16S rRNA targeted oligonucleotide for its in situ identification in activated sludge. **FEMS Microbiology Letters** **207**: 179-183.

Blackwood, C.B. & J.S. Buyer. 2004. Soil microbial communities associated with Bt and non-Bt corn in three soils. **Journal of Environmental Quality** **33**: 832-836.

Brim, H.; S. C. McFarlan; J. K. Fredrickson; K. W. Minton; M. Zhai; L.P. Wackett & M.J. Daly. 2000. Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. **Nature Biotechnology** **18**:85–90.

Cattelan, A.J. & C. Vidor. 1990. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** **14**: 125-132.

Chiarini, L.; A. Bevivino; C. Dalmastrri; C. Nacamulli & S. Tabacchioni. 1998. Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. **Applied Soil Ecology** **8**: 11–18.

Costanza, R.; R. D'Arge; R. De Groot; S. Faber; M. Grasso; B. Hannon; K. Limburg; S. Naeem; R.V. O'Neill; J. Paruelo; R.G. Raskin; P. Sutton; M. Belt & Van den. 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature** **387**: 253-260.

Deckert, G.; Warren, P.V.; Gaasterland, T.; Young, W.G.; Lenox, A.L.; Graham, D.E.; Overbeek, R.; Snead, M.A.; Keller, M.; Aujay, M.; Huber, R.; Feldman, R.A.; Short, J.M.; Olsen, G.J. & Swanson, R.V. 1998. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. **Nature** **392**: 353–358.

Donegan, K. K.; C.J. Palm; V.J. Field; L.A. Porteus; L.M. Ganio; D.L. Schaller; L. Q. Bucao & R.J. Seidler. 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.

Dunbar, J.; S. Takala; S.M. Barns; J.A. Davis & C.R. Kuske. 1999. Levels of Bacterial Community Diversity in Four Arid Soils Compared by Cultivation and 16S rRNA Gene Cloning **Applied Environmental Microbiology** **65**: 1662-1669.

Dunfield, K.E. & J.J. Germida. 2001. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. **FEMS Microbiology Ecology** **38**: 1-9.

Dunfield, K.E. & Germida, J.J. 2003. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). **Applied and Environmental Microbiology** **69**: 7310-7318.

Dunfield, K.E. & J.J. Germida. 2004. Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities. **Journal of Environmental Quality** **33**: 806-815.

EMBRAPA. 2001. **Algodão: tecnologia de produção**. Embrapa Algodão. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste. 296 p.

Fang, M., R.J. Kremer; P.P. Motavalli & G. Davis. 2005. Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn. **Applied Environmental Microbiology** **41**: 4132-4136.

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.

Faoro, H.; A.C. Alves; E.M. Souza; L.U. Rigo; L.M. Cruz; S.M. Al-Janabi; R.A. Monteiro; V.A. Baura & F.O.Pedrosa. 2010. Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the southern Brazilian Atlantic forest. **Applied and Environmental Microbiology** **76**: 4744e4749.

Felske, A.; A. Wolterink; R.Van Lis; W.M. De Vos & A.D. Akkermans. 2000 Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitored by 16S rRNA levels of the predominant ribotypes. **Applied Environmental Microbiology** **66**:3998–4003

Ferreira, A. C., M.F. Nobre; F.A. Rainey; M.T.Silva; R. Wait; J. Burghardt; A.P. Chung & M.S. Costa. 1997. *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs. **International Journal of Systematic Bacteriology** **47**:939–947.

Gomes, N.C.M.; H. Heuer; J. Schonfeld; R. Costa; L. Mendonca-Hagler; & K. Smalla. 2001. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant Soil** **232**:167–180.

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

GUERRANTE, R. D. S. 2003. Potenciais riscos e benefícios da tecnologia dos OGMs. In: GUERRANTE, R. D. S. (Ed.). Transgênicos: uma visão estratégica. Rio de Janeiro: **Interciência**, p. 27-46.

Gripenburg, U.; N. Ward-Rainey; S. Mohamed; H. Schlesner; H. Marxsen; F.A.Rainey; E. Stackebrandt & G. Auling. 1999. Phylogenetic diversity, polyamine pattern and DNA base composition of members of the order Planctomycetales. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** **49**:689–696

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. **Applied Environmental Microbiology** **68**: 1325-1335.

Huber, H. & K.O. Stetter. 1998. Hyperthermophiles and their possible potential in biotechnology **Journal of Biotechnology** **64**: 39–52.

Huber, R. & W. Eder. 2002. Aquificales. In *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Release 3.8. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: **Springer**. <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>

Hugenholtz, P.; K.L. Pitulle & N.R. Pace. 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. **Journal of Bacteriology** **180**: 366-76.

Janssen, P.H.; P.S. Yates; B.E. Grinton; P.M. Taylor & M. Sait. 2002 Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. **Applied Environmental Microbiology** **68**:2391–2396

Janssen, P.H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied Environmental Microbiology** **72**: 1719-1728.

Jung, S. 2007. Study on the effects of genetically modified *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* on the rhizosphere microbiota. MSc. thesis. Chungnam National University, Daejeon, Republic of Korea.

Keller, M. & K. Zengler. 2004. Tapping into microbial diversity. **Nature Review Microbiology** **02**: 141-150.

Kishimoto, N. & T. Tano. 1987. Acidophilic heterotrophic bacteria isolated from acidic mine drainage, sewage, and soils. **Journal Gen. Applied Microbiology** **33**:11–25.

Kozdrój, J. & J.D. Van Elsas. 2001. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. **Journal of Microbiological Methods** **43**: 197 – 212.

Kuske, C. R.; S.M. Barns & J.D. Busch. 1997. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. **Applied Environmental Microbiology** **63**:3614– 3621.

Lee, Y-E.; S-H. Yang; T-W. Bae; H-G. Kang; P-O. Lim & H-Y. Lee. 2011. Effects of Field-Grown Genetically Modified Zoysia Grass on Bacterial Community Structure. **Journal of Microbiology and Biotechnology** **21**: 333–340.

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 Soil** **339**: 247-257.

Liu, J. R.; C.A. McKenzie; E.M. Seviour; R.I. Webb; L.L. Blackall; C.P. Saint & R.J. Seviour. 2001. Phylogenic of the filamentous bacterium ‘Nostocoida limicola’ III from activated sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** **51**: 195-202.

Lottmann, J.; H. Heuer; J.D. Vries; A. Mahn; K. Muring; W. Wackernagel; K. Smalla & G. Berg. 2000. Establishment of introduced antagonistic bacteria in the rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community. **FEMS Microbiology Ecology** **33**: 41–49.

Min, F.; R.J. Kremer; P.P. Motavalli & G. Davis. 2005. Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn. **Applied and Environmental Microbiology** 71: 4132–4136.

Minton, K. W. 1994. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. **Molecular Microbiology** 13:9–15.

Motavalli, P. P.; R.J. Kremer; M. Fang & N. E. Means. 2004. Impact of genetically modified crops and their management on soil microbially mediated plant nutrient transformations. **Journal of Environmental Quality** 33: 816–824.

Nogales, B.; E.R.B. Moore; E. Llobet-Brossa; R. Rossello-Mora; R. Amann & K.N. Timmis. 2001. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. **Applied Environmental Microbiology** 67:1874–1884.

O'Donnell, A. G. & H.E. Göres. 1999. 16S rDNA methods in soil microbiology. **Current Opinion in Biotechnology** 10: 225-229.

Oskay, M.; A.U. Tamer & C. Azeri. 2004. Antibacterial activities of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey **African Journal of Biotechnology** 3: 441- 446.

Pereira, J.C.; M.C.P. Neves & A. Drozdowicz. 1996. **Quantificações das populações de bactérias em geral, de bactérias resistentes a antibióticos e de actinomicetos em solos.** (Embrapa-CNPAB. Documentos, 26). Seropédica : Embrapa-CNPAB, 20 p.

Pereira, R. M.; E.L. Silveira; D.C. Scaquitto; E.A.N. Pedrinho; S.P. Val-Moraes; E. Wickert; L.M. Carareto-Alves & E.G.M. Lemos. 2006. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. **Brazilian Journal of Microbiology** **4**: 439-447.

Peters, S.; S. Koschinsky; F. Schwieger & C.C. Tebbe. 2000. Secession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-Single-Strand- Conformation Polymorphism-based genetics profiles of small-subunit rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology** **66**: 930-936.

Ranjard, L.; F. Poly; J. Combrisson; A. Richaume; F. Gourbière; J. Thioulouse & S. Nazaret. 2000. Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). **Microbial Ecology** **39**: 263-72.

Rappé, M. S. & S. J. Giovannoni. 2003. The uncultured microbial majority. **Annual Review Microbiology**. **57**:369–394.

Reysenbach, A.L. 2001. Phylum BI. Aquificae phy. nov. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** 1: 359–367.

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).

Rui, Y. K.; G.X. Yi; J. Zhao; B.M.Wang; Z.H. Li & Z. X. Zhai. 2005. Changes of *Bt* toxin in the rhizosphere of transgenic *Bt* cotton and its influence on soil functional bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** **21**: 1279–1284.

Sait, M.; P. Hugenholtz & P.H. Janssen. 2002. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. **Environmental Microbiology** **4**:654–666.

Saitou, N. & M. NEI. 1987. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution** **4**: 406-425.

Salles, J.F.; J.D.Van Elsas & J.A.Van Veen. 2006. Effect of agricultural management regime on Burkholderia community structure in soil. **Microbiology Ecology** **52**:267–279.

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 Biochemistry** **33**: 1225-1230.

Sayler, G. S. & A.C. Layton. 1990. Environmental and application of nucleic acid hybridization. **Annual Review of Microbiology** **44**: 625-648.

Schmalenberger, A. & C.C.Tebbe. 2002. Bacterial community composition in the rhizosphere of a transgenic, herbicide-resistant maize (*Zea mays*) and comparison to its non-transgenic cultivar Bosphore. **FEMS Microbiology Ecology** 40: 29–37.

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 Soil** 285:149–159.

Silveira, E. L.; R.M. Pereira; D.C. Scaquitto; E.A.N. Pedrinho; S.P.Val-Moraes; E. Wickert; L.M. Carareto-Alves & E.G.M. Lemos. 2006. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 41: 1507-1516.

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.

Smit, E.; P. Leeflang & S. Gommans. 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology** 67: 2284-2291.

Stiling, P. 1999. **Ecology. Theories and Applications**. 3<sup>a</sup> ed. Prattice Hall. Apper Sadle River, New Jersey, 638 p.

Valadares-Inglis, M. C. C.; W. Shiler & M.T. De-Souza. 1998. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 1, p. 201-230.

Val-Moraes, S. P.; M.J. Valarini; R. Ghini; E.G.M. Lemos & L.M. Carareto-Alves. 2009. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. **Revista Ciência Agronômica 40**: 7-16.

Van den Burg, B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. **Current Opinion in Microbiology 6**: 213–218.

Ward, B. B. 2003. How many species of prokaryotes are there. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99**: 10234-10236.

Wei, S. D.; H.L. Zou; L.M. Chu; C.M. Liao & C.Y. Lan. Field released transgenica papaya affects microbial communities and enzyme activities in soil. **Plant and Soil 285**: 347-358

Widmer, F. 2007. Assessing Effects of Transgenic Crops on Soil Microbial Communities. **Biochemical Engine Biotechnology 107**: 207–234.

## 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](http://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); Parraet *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.

**ARBE**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**

##### **Envio dos manuscritos:**

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

E-mail: [rbe@ufpr.br](mailto:rbe@ufpr.br)

Fone/FAX: (41) 3266-0502

##### **Endereço para correspondência:**

Revista Brasileira de Entomologia/Editor Chefe

Claudio José Barros de Carvalh

Departamento de Zoologia - UFPR

Caixa Postal 19030

81531-980, Curitiba, PR