LUCIANA APARECIDA AVILA

**EFEITOS DO ALGODÃO Bt (BOLLGARD® EVENTO 531)
NA COMUNIDADE BACTERIANA DA RIZOSFERA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2007

LUCIANA APARECIDA AVILA

**EFEITOS DO ALGODÃO Bt (BOLLGARD® EVENTO 531) NA
COMUNIDADE BACTERIANA DA RIZOSFERA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Itamar Soares de Melo

São Paulo
2007

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Avila, Luciana Aparecida.

Efeitos do algodão Bt (Bollgard evento 531) na comunidade bacteriana da rizosfera / Luciana Aparecida Avila. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Itamar Soares de Melo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia EP/IPT/ICB/Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Ecologia de Microrganismos.

Versão do título para o inglês: Effect of Bt cotton (Bollgard event 531) on the bacterial community of the rhizosphere.

Descritores: 1. Ecologia microbiana 2. DGGE 3. Microbiologia do solo 4. Plantas geneticamente modificadas 5. Proteína Cry 6. *Pseudomonas* I. Melo, Itamar Soares de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB175/2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Luciana Aparecida Avila.

Título da Dissertação: Efeitos do algodão Bt (Bollgard evento 531) na comunidade bacteriana da rizosfera .

Orientador(a): Itamar Soares de Melo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

À minha mãe,

Maria Zenaide da Silva,

pela minha formação, pelo amor, apoio,

e por sempre acreditar em mim.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Ao Dr. Itamar Soares de Melo pela orientação, paciência, amizade, apoio, incentivo e confiança no meu trabalho.

À Dra. Deise Capalbo pela atenção e total apoio durante este período.

À minha mãe: Maria Zenaide da Silva, por todo o amor, apoio, incentivo, e todo o sacrifício em prol do meu desenvolvimento; e a toda minha família pelo incentivo.

Ao meu namorado, Rodrigo Santos Oliveira, por todo o amor, dedicação, paciência, apoio e incentivo.

A todos os amigos e colegas que já passaram, ou que ainda continuam no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, pela amizade, apoio, incentivo e momentos de descontração: Luciana Frias Reyes, Flávia Melo, Sarah Canova, Mariana Lotto, Zayame V. Pinto, Alexandre Sereda, Élide Corrêa, Liliana, Tiago Zucchi, Pietro Agostini, João Paulo Tozzi, Eduardo Bernardo, Eduardo Gottardo, Harllen Sandro da Silva, Marise T. Suzuki, César, Marcela Galo, Ivo, Mateus, Vitor, Pablo Oliveira, Harrison (Tom), Camila, Alex Moretini, Armando Dias, Francisco Gueler e Francisco E. Costa.

Aos pesquisadores Dra. Aline A. P. Kleiner, Dr. João Lúcio de Azevedo e Dr. Wellington Luiz de Araújo por permitirem a realização de análises no Laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ e aos amigos e colegas deste laboratório, por me acolherem e auxiliarem: Joelma, Francisco Andreote, Priscila Brosseti, Marise Suzuki, Danice, Carol, Aline (Romã), Léia, Rodrigo, Paulo T. Lacava, e em especial ao Fernando Dini Andreote por sua atenção, ajuda e colaboração neste trabalho.

À Dra. Olívia M. N. Arantes pela atenção, apoio, carinho, e contribuição nesta dissertação.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Laboratório de Produtos Biológicos da Embrapa Meio Ambiente: Elke, Márcia, Roseli, João Luiz, Rosângela e Cindi pelo apoio e disposição em ajudar.

Aos funcionários do Laboratório de Quarentena da Embrapa Meio Ambiente, pelo auxílio durante a condução do estudo em casa-de-vegetação.

Ào Dr. Ricardo Harakava por sua atenção e contribuição neste trabalho.

A Dra. Aline Maia pelo apoio nas análises estatísticas.

Ao Dr. Daniel Moura por suas sugestões e por permitir a utilização da infra-estrutura do Laboratório de Genética de Plantas da ESALQ.

Ao Dr. Pedro José Valarini, por todo apoio e incentivo desde minha iniciação científica.

À minha querida amiga Gabriela Semeghini, que sempre me incentivou, e assim como eu, é apaixonada pela ciência da vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Aos funcionários da Secretaria de Biotecnologia da USP (Eliane, Fábiana e Marcos) pela atenção, disposição e apoio administrativo.

À Universidade de São Paulo (ICB) pelas oportunidades.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

“Sabemos mais sobre o movimento dos corpos celestes do que sobre o solo debaixo de nossos pés.”

Leonardo da Vinci (1452-1519).

RESUMO

AVILA, L. A. **Efeitos do algodão Bt (Bollgard® evento 531) na comunidade bacteriana da rizosfera**. 2007. 90 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O algodão transgênico BOLLGARD®, contém o gene *cry1Ac* da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), que confere à planta resistência a insetos da ordem Lepidoptera. A expressão deste gene pode acarretar efeitos ecológicos adversos à comunidade bacteriana do solo e da rizosfera, como pela introdução da toxina nesse ambiente. Nesse sentido, o estudo teve por objetivo avaliar os possíveis efeitos da planta de algodão geneticamente modificado (Bollgard® evento 531) sobre a comunidade bacteriana da rizosfera. Os estudos foram conduzidos em condições de casa-de-vegetação, onde os tratamentos consistiram em combinações dos fatores: plantas de algodão transgênico (Bt) e convencional (não Bt), dois tipos de solos (argiloarenoso - ITA e franco argiloarenoso - SSE) e quatro estádios de crescimento da planta (estabelecimento, formação do botão floral, florescimento e abertura da maçã). Amostras de rizosfera foram avaliadas por meio de técnicas dependentes e independentes de cultivo. Dentre os dois tipos de solos, apenas o SSE apontou diferenças na densidade e atividade de bactérias da rizosfera de algodão Bt e não Bt. Na fase de estabelecimento, o número de colônias (expressas em UFC. g⁻¹ de solo) de *Pseudomonas* spp. na rizosfera do algodão Bt foi significativamente ($p < 0,05$) maior do que na rizosfera do algodão convencional. Para bactérias totais, foi verificado um número significativamente superior de UFC. g de solo⁻¹ ($p < 0,05$) na rizosfera do algodão Bt em relação ao algodão não-Bt, durante a fase de formação do botão floral. Na análise de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) para o grupo *Pseudomonas*, durante a fase de estabelecimento do algodão, foram observadas bandas exclusivas para amostras de planta transgênica e outras para a planta convencional, sendo esta confirmada pela Análise de Correspondência Canônica (CCA). De acordo com a CCA dos perfis do DGGE (16S-Universal), na fase de formação do botão floral foi observado efeito do algodão Bt na estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera, em solo ITA. No entanto, observou-se maior diferença na estrutura da comunidade bacteriana entre os diferentes estádios fenológicos das plantas. A toxina Bt foi detectada em amostras de rizosfera de algodão Bt em todos os estádios de desenvolvimento da planta, sendo que para o solo SSE foi verificado um aumento nos níveis de proteína no final do ciclo da cultura. Foi verificada menor atividade microbiana (hidrólise de diacetato de fluoresceína) no solo rizosférico de algodão Bt, durante a fase de estabelecimento, no entanto, nas fases de formação do botão floral e abertura das maçãs, a atividade microbiana nas amostras de rizosfera do algodão Bt foi maior do que no algodão convencional. De modo geral, esses resultados apontam para um pequeno efeito do algodão Bollgard® na estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera. Adicionalmente, este efeito é principalmente observado no estágio inicial de desenvolvimento da cultura, indicando o potencial do ambiente rizosférico em restabelecer a diversidade das comunidades após um impacto temporal.

Palavras-chave: Ecologia microbiana. DGGE. Microbiologia do solo. Plantas geneticamente modificadas. Proteína Cry. *Pseudomonas*.

ABSTRACT

AVILA, L. A. **Effects of Bt cotton (Bollgard® event 531) on the bacterial community of the rhizosphere.** 2007.90 p. Master thesis (Biotechnology). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The transgenic cotton Bollgard® (Bt cotton) contains the *cry1Ac* gene from *Bacillus thuringiensis* bacterium, that confers the plant resistance against insects of the Lepidoptera order. The expression of this gene can cause adverse ecological effects on the bacterial community of soil and rhizosphere, mainly because of the introduction of the toxin in this environment. Therefore, the objective of this study was to evaluate the possible effects of the genetically modified cotton plants (Bollgard® event 531) on the bacterial community of the rhizosphere. The studies were conducted in greenhouse conditions, where the treatments consisted of combinations of the factors: transgenic (Bt) and conventional (not Bt) cotton plants, growing in two types of soil and sampled in four plant development stages (establishment, floral button formation, flowering and opening of the apple). Rhizosphere communities were evaluated by dependent and independent culture techniques. Results reveal that amongst the two types of soils, only the one with minor clay content (SSE) presented differences in density and activity of bacterial community from rhizosphere of Bt and non Bt cotton. In the establishment phase, the number of *Pseudomonas* spp. colony formation unit (UFC).g of soil⁻¹ in the rhizosphere of the Bt cotton was significantly higher ($p < 0.05$) of the one found in the rhizosphere of the conventional cotton. For total bacteria, it was verified a significantly higher UFC.g of soil⁻¹ ($p < 0.05$) in the rhizosphere of the Bt cotton during the phase of floral button formation. In the analysis of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the *Pseudomonas* group, during the establishment phase of the culture, exclusive bands for rhizosphere samples of transgenic plant and others for the conventional plant were observed, which was confirmed by Canonical Correspondence Analysis (CCA). According to the CCA of the DGGE patterns (16S-Universal) in the phase of formation of the floral button was observed effect of the Bt cotton in the structure of the bacterial community of the rhizosphere, in soil ITA. However, higher differences in the structure of the bacterial community were observed among different plant development stages rather to the fate of Bt and not Bt plants. The Cry toxin was detected in rhizosphere samples of Bt cotton in all development stages of the plant. Lesser microbial activity (fluorescein diacetate hydrolysis) was verified in the rhizosphere of Bt cotton, during the establishment phase of the culture, however, in the phases of floral button formation and apple opening, the microbial activity in the rhizosphere of the Bt cotton was bigger than in the non Bt cotton. The results of this work show a small effect of the Bollgard® cotton in the structure of the bacterial community of the rhizosphere. Additionally, this effect is mainly observed in the initial period of development of the culture, indicating the potential of the rhizosphere environment to reestablish the diversity of the communities after a temporary impact.

Key-words: Microbial ecology; DGGE; Soil Microbiology; Genetically Modified Plant; Cry Protein; *Pseudomonas*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do plasmídeo PV-GHBK04 usado no desenvolvimento do algodão transgênico Bollgard. -----	23
Figura 2 – Curva padrão para quantificação da proteína Cry1Ac em amostras de rizosfera de algodão Bt por ELISA. -----	40
Figura 3 - Número de bactérias totais (Log UFC/g de solo) em solo rizosférico argiloarenoso (ITA) de algodão transgênico e convencional nas quatro fases do ciclo da cultura (coletas). * $p < 0,10$ -----	45
Figura 4 - Número de bactérias totais (Log UFC/g de solo) em solo rizosférico franco-argiloarenoso (SSE) de algodão transgênico e convencional nas quatro fases do ciclo da cultura (coletas). ** $p < 0,05$ -----	45
Figura 5 - Número de <i>Pseudomonas</i> (Log UFC/g de solo) em solo rizosférico argiloarenoso (ITA) de algodão transgênico e convencional nas quatro fases do ciclo da cultura (coletas). -----	46
Figura 6 - Número de <i>Pseudomonas</i> (Log UFC/g de solo) em solo rizosférico franco-argiloarenoso (SSE) de algodão transgênico e convencional nas quatro fases do ciclo da cultura (coletas). ** $p < 0,05$ -----	46
Figura 7 – Porcentagem de espécies de <i>Pseudomonas</i> isoladas em meio KB da rizosfera de algodão transgênico e algodão convencional, em dois tipos de solo. Tratamentos: CSSE- algodão convencional em solo SSE; TSSE- algodão transgênico em solo SSE; CITA- algodão convencional em solo ITA; TITA- algodão transgênico em solo ITA -----	48
Figura 8 – Colonização da região superior da raiz de algodão Bt por <i>P. fluorescens</i> . A seta indica a região em alta magnificação -----	49
Figura 9 – <i>P. fluorescens</i> colonizando a superfície (A) e região lesionada (B) da coifa da raiz de algodão Bt. -----	49
Figura 10 – Região da coifa da raiz de algodão Bt colonizada por <i>P. fluorescens</i> . A seta indica a região em alta magnificação-----	50
Figura 11 – Colonização da da raiz de algodão covencional por <i>P. fluorescens</i> . A seta indica a região em alta magnificação -----	50
Figura 12 - Atividade microbiana (FDA) em solo rizosférico argiloarenoso (ITA) de algodão transgênico e convencional nas quatro fases do ciclo da cultura (coletas). -----	52
Figura 13 - Atividade microbiana (FDA) em solo rizosférico franco-argiloarenoso (SSE) de algodão transgênico e convencional nas quatro fases do ciclo da cultura (coletas). ** $p < 0,05$ -----	52
Figura 14 - Resultado do teste de detecção da toxina Cry1Ac em amostras de solo rizosférico de algodão em fase de formação do botão floral (2ª coleta): A) C2SSE: amostra de solo SSE de algodão não-Bt (controle); B e C) T2SSE: amostras de solo	

SSE de algodão Bt; D e E) T2ITA: amostras de solo ITA de algodão Bt; F) T2ITA: amostra de solo ITA de algodão não-Bt (controle). A seta preta indica a linha controle e a seta vermelha indica a linha teste (avermelhada para amostras positivas: B,C, D e E).---53

Figura 15 – Comparação dos níveis de proteína Cry1Ac detectados em solo rizosférico SSE (círculo preenchido) e em solo rizosférico ITA (círculo vazio), em diferentes estádios de desenvolvimento (coleta) do algodão Bt. -----54

Figura 16 - Agrupamento hierárquico com base na separação dos amplicons do 16S Universal por DGGE. As amostras de rizosfera de algodão transgênico e convencional foram coletadas em quatro fases do ciclo da cultura, em solo SSE. As amostras transgênicas são indicadas pela letra T e as convencionais pela letra C, o número seguinte se refere a coleta, seguidas pelo tipo de solo (SSE) e número da repetição. -----56

Figura 17 - Agrupamento hierárquico com base na separação dos amplicons do 16S Universal por DGGE. As amostras de rizosfera de algodão transgênico e convencional foram coletadas em quatro fases do ciclo da cultura, em solo ITA. As amostras transgênicas são indicadas pela letra T e as convencionais pela letra C, o número seguinte se refere a coleta, seguidas pelo tipo de solo (ITA) e número da repetição. As setas indicam a presença de bandas mais intensas em amostras de rizosfera do algodão convencional do que do algodão Bt. -----57

Figura 18 - Agrupamento hierárquico com base na separação dos amplicons do 16S de *Pseudomonas* por DGGE. As amostras de rizosfera de algodão transgênico e convencional foram coletadas em quatro fases do ciclo da cultura, em solo SSE. As amostras transgênicas são indicadas pela letra T e as convencionais pela letra C, o número seguinte se refere a coleta, seguidas pelo tipo de solo (SSE) e número da repetição.-----58

Figura 19 - Agrupamento hierárquico com base na separação dos amplicons do 16S de *Pseudomonas* por DGGE. As amostras de rizosfera de algodão transgênico e convencional foram coletadas em quatro fases do ciclo da cultura, em solo ITA. As amostras transgênicas são indicadas pela letra T e as convencionais pela letra C, o número seguinte se refere a coleta, seguidas pelo tipo de solo (ITA) e número da repetição.-----59

Figura 20 - Análises de correspondência canônica (CCA) da estrutura de comunidades de bactérias associadas à rizosfera de algodão Bt (TR) e algodão não-Bt (NT) em dois tipos de solos (SSE e ITA). (A) 1ª Coleta: fase de estabelecimento do algodão; (B) 2ª Coleta: formação do botão floral e flores; (C) 3ª Coleta: florescimento e formação da maçã; (D) 4ª Coleta: abertura do capulho. Os gráficos foram gerados a partir da análise de correlação canônica dos perfis de DGGE-16S Universal, comparando os diferentes fatores que determinam a composição da comunidade bacteriana. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos. As variáveis ambientais indicadas com * foram significantes ($p < 0,05$) utilizando o teste de permutação de MonteCarlo. -----61

Figura 21 - Análises de correspondência canônica (CCA) da estrutura das populações de *Pseudomonas* associadas à rizosfera de algodão Bt (TR) e algodão não-Bt (NT) em dois tipos de solos (SSE e ITA). (A) 1ª Coleta: fase de estabelecimento do algodão; (B) 2ª Coleta: formação do botão floral e flores; (C) 3ª Coleta: florescimento e formação da maçã; (D) 4ª Coleta: abertura do capulho. Os gráficos foram gerados a partir da CCA dos perfis de DGGE-*Pseudomonas*, comparando os diferentes fatores que determinam a composição dessas populações. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da

variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos. As variáveis ambientais indicadas com * foram significantes ($p < 0,05$) utilizando o teste de permutação de MonteCarlo. -----62

Figura 22 – DGGE- *Pseudomonas* e DNA extraído de amostras de rizosfera de algodão transgênico (Bt) e algodão convencional (não-Bt) na fase de estabelecimento do algodão (coleta1), em dois tipos de solo (SSE e ITA). Tratamentos: C1SSE (algodão convencional em solo SSE); T1SSE (algodão transgênico em solo SSE); C1ITA (algodão convencional em solo ITA); T1ITA (algodão transgênico em solo ITA). As setas indicam as bandas eluídas selecionadas para seqüenciamento, sendo que as setas vermelhas correspondem as diferenças observadas entre amostras de plantas transgênica e convencional. M=marcador, MPS=marcador com espécies de *Pseudomonas*-----63

Figura 23 – Dendograma com base na sequência de 16S rDNA, mostrando a relação entre bandas eluídas do DGGE para *Pseudomonas* (coleta 1) e sequências presentes no GenBank. A barra indica a distância em nucleotídeos substituídos -----65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características químicas dos solos utilizados neste estudo-----	34
Tabela 2 - Oligonucleotídeos -----	42
Tabela 3 - Concentração de proteína Cry1Ac na rizosfera de algodão Bt, em diferentes estádios de desenvolvimento da planta, em solo SSE. -----	54
Tabela 4 - Concentração de proteína Cry1Ac na rizosfera de algodão Bt, em diferentes estádios de desenvolvimento da planta, em solo ITA -----	55
Tabela 5 - Resultado da análise de sequências de bandas eluídas do DGGE- <i>Pseudomonas</i> -----	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - Trifosfato de adenosina

Bt - *Bacillus thuringiensis*

CCA – *Canonical Correspondence Analysis* - Análise de Correspondência Canônica

CTC - Capacidade de troca catiônica

CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

DGGE – Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

DNA - Ácido desoxirribonucléico

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FAME - *Fatty Acid Methyl Ester*

FDA – Diacetato de fluoresceína

ITA - Solo de Itapira (Argiloarenoso)

KB - King B

OGM - Organismo geneticamente modificado

PBS - *Phosphate buffered saline* - tampão fosfato

PCR - *Polymerase Chain Reaction* - reação em cadeia da polimerase

PGM - Planta Geneticamente Modificada

RPCP - Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas

SSE - Solo Santa Elisa (Franco-argiloarenoso)

TGGE – Eletroforese em gel com gradiente de temperatura

TSB - Caldo triptona de soja

UFC - Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 O Algodoeiro	21
3.1.1 O cultivo do algodoeiro	21
3.1.2 Algodão Bt (Bollgard [®])	22
3.1.2.1 Caracterização do evento de transformação	22
3.1.2.2 Expressão do transgene	23
3.2 Toxina Inseticida de <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
3.3 Possíveis Impactos de Plantas Geneticamente Modificadas	25
3.4 Comunidade Microbiana do Solo Rizosférico	26
3.5 O Gênero <i>Pseudomonas</i>	27
3.5.1 Características Taxonômicas	27
3.5.2 Importância para a sanidade e desenvolvimento de plantas	27
3.6 Fatores que influenciam a comunidade bacteriana do solo e da rizosfera	28
3.7 Efeitos potenciais de plantas transgênicas sobre a microbiota do solo	29
3.8 Técnicas para Estudo da Comunidade Bacteriana do Solo	31
3.8.1 Técnica de cultivo	31
3.8.2 Técnicas moleculares	31
3.8.3 Análise da atividade microbiana no solo	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Origem e caracterização dos solos	34
4.2 Delineamento Experimental	34
4.3 Coleta e processamento das amostras	35
4.4 Isolamento e contagem de bactérias cultiváveis da rizosfera	35
4.5 Identificação de linhagens de <i>Pseudomonas</i> pela extração de ácidos graxos da membrana celular	36
4.6 Avaliação “ <i>in vitro</i> ” do efeito do algodão geneticamente modificado sobre a colonização de raízes por <i>Pseudomonas fluorescens</i>	37
4.7 Determinação da atividade microbiana no solo por hidrólise de FDA (diacetato de fluoresceína)	38
4.8 Monitoramento da toxina Cry1Ac na rizosfera de algodão Bt	38
4.8.1 Teste qualitativo para detecção da proteína Cry1Ac em amostras de rizosfera de algodão Bt	38

4.8.2 Quantificação da proteína Cry1Ac em amostras de rizosfera de algodão Bt-----	39
4.9 Eletroforese em gel por gradiente de desnaturação (DGGE)-----	40
4.9.1 Extração de DNA de solo -----	40
4.9.2 Amplificação do gene 16S r DNA para análise em DGGE-----	40
4.9.3 Amplificação do gene 16S r DNA de <i>Pseudomonas</i> para análise em DGGE-----	41
4.9.4 Processamento da imagens de DGGE -----	42
4.9.5 Eluição e identificação das bandas do DGGE -----	42
4.10 Análises estatísticas -----	43
5 RESULTADOS-----	44
5.1 Número de Bactérias Cultiváveis-----	44
5.1.1 Bactérias totais na rizosfera de algodão Bt e não Bt-----	44
5.1.2 População de <i>Pseudomonas</i> em amostras de rizosfera de algodão Bt e não Bt-----	45
5.2 Diversidade de <i>Pseudomonas</i> sp. cultiváveis na rizosfera de algodão Bt e não-Bt-----	47
5.3 Estudo “in vitro” do efeito do algodão Bt sobre a colonização de raízes por <i>Pseudomonas fluorescens</i> -----	48
5.4 Determinação da atividade microbiana no solo por hidrólise de FDA (diacetato de fluoresceína)-----	51
5.5 Monitoramento da toxina Cry1Ac na rizosfera de algodão Bt-----	52
5.5.1 Detecção da toxina Cry1Ac na rizosfera de algodão Bt -----	52
5.5.2 Quantificação da toxina Cry1Ac na rizosfera de algodão Bt por ELISA-----	53
5.6 Eletroforese em gel por gradiente de desnaturação (DGGE)-----	55
6 DISCUSSÃO-----	66
7 CONCLUSÕES -----	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	74
ANEXOS -----	85
ANEXO A - Efeito do tipo de solo (ITA - argiloarenoso ou SSE – franco-argiloarenoso) no número (Log UFC/g de solo) de bactérias totais (1 e 2), de <i>Pseudomonas</i> (3 e 4) e na atividade (FDA/g de solo/min) de bactérias (5 e 6) da rizosfera do algodão convencional e transgênico (Bt), nas quatro fases do ciclo da cultura (coletas). *p<0,01 e ** p≤0,0001 -----	86
ANEXO B - Tabela com estimativas das diferenças das médias de Log UFC/g de solo de bactérias totais entre coletas, em cada combinação solo (SSE e ITA) versus tipo de algodão (convencional ou transgênico) e respectivos valores p dos testes t para contrastes utilizados para quantificar a evidência de variabilidade temporal em cada uma das variáveis objeto de estudo.-----	87

ANEXO C - Tabela com estimativas das diferenças das médias de LogUFC/g de solo de *Pseudomonas* entre coletas, em cada combinação solo (SSE ou ITA) versus tipo de algodão (convencional ou transgênico) e respectivos valores p dos testes t para contrastes utilizados para quantificar a evidência de variabilidade temporal em cada uma das variáveis objeto de estudo.----- 88

ANEXO D - Tabela com estimativas das diferenças das médias de FDA entre coletas, em cada combinação solo (SSE ou ITA) versus tipo de algodão (convencional ou transgênico) e respectivos valores p dos testes t para contrastes utilizados para quantificar a evidência de variabilidade temporal em cada uma das variáveis objeto de estudo.----- 89

ANEXO E - Análises de correspondência canônica (CCA) da estrutura de comunidades de bactérias associadas à rizosfera de algodão Bt (TR) e algodão não-Bt (NT) em dois tipos de solos (SSE e ITA) e quatro estádios de desenvolvimento da planta (coletas). Os gráficos foram gerados a partir da análise de correlação canônica dos perfis de DGGE-16S Universal (Gráfico1) e do DGGE para *Pseudomonas* (Gráfico 2), com os fatores ambientais. * $p < 0,05$ ----- 90

1 INTRODUÇÃO

O plantio do algodão geneticamente modificado para resistência a insetos (algodão Bt), conferida pela expressão do gene *cry1Ac* da bactéria *Bacillus thuringiensis* na planta, tem se expandido por grandes áreas nos países onde é cultivado, como Estado Unidos, México, Argentina, Austrália, África do Sul e China.

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 (Bollgard evento 531) para o plantio comercial no Brasil, considerando características regionais específicas, faz-se necessário a realização de estudos para avaliar os possíveis efeitos da transgenese sobre a diversidade bacteriana de solos brasileiros.

A diversidade de microrganismos no solo rizosférico é determinada dentre outros fatores pela composição dos exsudados da raiz da planta. Dessa forma, o algodão Bt poderia alterar a dinâmica microbiana (crescimento e composição) e as funções essenciais do ecossistema por meio da liberação da toxina nos exsudados da raiz, estando disponível para a degradação biótica, ou ainda por produzir alterações inesperadas na composição química desses exsudados decorrentes da transgenese (efeito pleiotrópico). Sendo assim, é importante que a possibilidade de impacto do algodoeiro Bt sobre a comunidade bacteriana do solo seja investigada, pois estes microrganismos além de serem ecologicamente importantes, são também de grande interesse agrícola e biotecnológico.

Microrganismos do solo regulam inúmeros processos críticos para a produtividade de biomassa e são essenciais para a manutenção da “saúde” do ecossistema. Bactérias benéficas da rizosfera (rizobactérias) são capazes de promover o crescimento da planta pelo aumento da disponibilização de nutrientes, produção de hormônios de crescimento e supressão de patógenos. Estas bactérias, que estão intimamente associadas às raízes da planta, sofrem efeito direto das alterações da planta hospedeira, o que pode alterar o equilíbrio desta comunidade. Portanto, a comunidade bacteriana da rizosfera pode ser utilizada como indicadora de impacto nesse ambiente.

Dessa forma, no presente estudo foram utilizados métodos dependentes e independentes de cultivo para estudar a comunidade bacteriana da rizosfera de algodão Bt e algodão não-Bt, em dois tipos de solo, ao longo do ciclo da cultura. A presença da toxina Cry1Ac em amostras de rizosfera foi monitorada por ELISA. As metodologias adotadas possibilitarão maior conhecimento dos possíveis efeitos de plantas Bt sobre bactérias da rizosfera, dos fatores que influenciam essa interação e ainda do comportamento e liberação da proteína Cry na rizosfera.

2 OBJETIVOS

Avaliar os possíveis efeitos do algodão Bt (BOLLGARD®) sobre a comunidade bacteriana da rizosfera. Especificamente propõe-se:

- Enumerar bactérias totais e populações de *Pseudomonas* na rizosfera de algodão Bt e algodão não-Bt (convencional);
- Avaliar a diversidade da comunidade bacteriana da rizosfera de algodão Bt (BOLLGARD®) e algodão não-Bt (convencional) em dois tipos de solos, e em diferentes estádios de crescimento da planta, pela técnica de DGGE;
- Avaliar o efeito do algodão Bt sobre o gênero *Pseudomonas*;
- Determinar a atividade microbiana em amostras de solo rizosférico de algodão Bt e algodão não-Bt;
- Monitorar a presença (ou ausência) da proteína Cry1Ac na rizosfera de algodão Bt em diferentes fases do ciclo da cultura e em dois tipos de solos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O Algodoeiro

3.1.1 O cultivo do algodoeiro

A cultura do algodão está classificada entre as dez principais culturas agrícolas do Brasil, ocupando o quinto lugar na produção mundial (GONDIN *et al.*, 2001; FNP, 2005). No país, o algodão (*Gossypium hirsutum*) é produzido principalmente nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e Bahia, além dos estados de São Paulo e Paraná (HILBECK *et al.*, 2006).

O algodão também está entre as principais culturas geneticamente modificadas (GM) comercializadas no mundo, juntamente com a soja, o milho e a canola. Entre 2000 e 2001, a área global plantada com algodão transgênico aumentou em 1,5 milhão de hectares, devido principalmente, ao incremento da produção norte-americana desta cultura GM, que ocupa quase 70% da área plantada de algodão nos Estados Unidos e a expansão de mais de 10% da área plantada na China (GUERRANTE, 2003).

Variedades de algodoeiro geneticamente modificado para a resistência a insetos têm sido avaliadas a campo no Brasil desde 1998 (FONTES, 2002) e em março de 2005, o algodão transgênico Bollgard®, resistente a lepidópteros, foi liberado para plantio e comercialização no país (Parecer Técnico Conclusivo, CTNBio nº513/2005).

Insetos praga constituem um dos principais problemas agrônômicos da cultura do algodão, causando grandes prejuízos econômicos. O uso de produtos químicos para o controle de pragas pode chegar a até 25% do custo da produção (FONTES, 2002). Dentre as pragas da parte aérea do algodão, destacam-se os pulgões (*Aphis gossypii* e *Myzus persicae*) e Thrips, como pragas da fase inicial. Lepidópteros são as principais pragas durante a fase vegetativa e o início da fase reprodutiva do algodão, como o curuquerê do algodão (*Alabama argilaceae*) e a lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*). Durante a fase reprodutiva, o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman), a lagarta da maçã (*Helicoverpa virescens* F.) e a lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella* Saunders) são as pragas dominantes (GONDIN *et al.*, 2001).

No Brasil, existem cerca de 260 espécies de insetos associadas à cultura do algodão, das quais 12 são consideradas pragas importantes (GALLO *et al.*, 1988), sendo *Spodoptera frugiperda* e o bicudo do algodoeiro as duas principais pragas dessa cultura no país (FONTES, 2002). Ainda não existem variedades de algodão GM efetivas contra o bicudo do algodoeiro, embora esta seja uma praga dominante que merece maior atenção, pois, tem causado prejuízos no Paraná, São Paulo, no Nordeste e com alguns indícios de infestação em Goiás (FERREIRA; ECHER, 2003).

O algodão GM (Bollgard®), liberado no Brasil, é resistente a pragas que ocorrem no país da ordem Lepidóptera, como o curuquerê (*Alabama argillacea*), a lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*) e a lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens*) (BORÉM, 2004).

Espera-se que o plantio de algodão transgênico resistente a insetos (Algodão Bt) possa minimizar o impacto ambiental causado pelo uso massivo de pesticidas nas lavouras (DALE *et al.*, 2002). Uma pesquisa feita pelo *United States National Research Council* (2000) verificou queda de cerca de 1 milhão de quilogramas na quantidade de inseticidas aplicados nas lavouras de algodão Bt. A adoção do algodão Bt na China reduziu drasticamente o número de contaminações com inseticidas entre os agricultores, e na Austrália e Estados Unidos, foi documentado um efeito positivo no número e diversidade de insetos nos campos de algodão Bt (CARPENTER *et al.*, 2002).

Betz *et al.* (2000) relatam aumento na produção de algumas culturas onde se utilizaram plantas Bt. No cultivo do algodão Bt (Cry1Ac), houve uma eficácia de 70 a 99% para insetos alvos (da ordem Lepidóptera), aumentando assim o controle dessas pragas (HALCOMB *et al.*, 1996). Quando comparado o rendimento de uma produção convencional e uma geneticamente modificada foi observado um aumento em torno de 30% para o algodão Bt (FALK-ZEPEDA *et al.*, 1999).

3.1.2 Algodão Bt (Bollgard®)

3.1.2.1 Caracterização do evento de transformação

O algodão geneticamente modificado (GM), referido como Algodão Bollgard evento 531, foi obtido por meio do sistema de transformação de plantas mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Esse processo resultou na introdução estável de três genes no genoma do algodão (*Gossypium hirsutum*), variedade convencional Coker C312 com plasmídeo PV-GHBK04 (Figura 1): o gene *cry1Ac*, o gene neomicina fosfotransferase tipo II (*nptII*) e o 3''(9)-O-aminoglicosídeo adeniltransferase (*aad*) (ZAMBRYSKI, 1992). O gene *cry1Ac*, induzido pelo promotor 35S, codifica para a produção da proteína Cry1Ac praticamente em todas as partes da planta. A proteína Cry1Ac tem ação biocida sobre insetos lepidópteros. Os genes *nptII* e *aad* são derivados da bactéria *Escherichia coli*, e codificam para a produção das proteínas NPTII e AAD. A proteína NPTII confere resistência aos antibióticos canamicina e neomicina, funcionando como marcador de seleção de células bacterianas transformadas. A proteína AAD confere resistência aos antibióticos espectinomicina e estreptomicina, funcionando como marcador, assim como o NPTII. O gene *aad* não é expresso no algodão GM, pois é controlado por um promotor bacteriano e a proteína ADD não é detectada no tecido do Algodão Bollgard evento 531 (BORÉM, 2004).

Figura 1. Mapa do plasmídeo PV-GHBK04 usado no desenvolvimento do algodão transgênico Bollgard.

3.1.2.2 Expressão do transgene

Estudos revelaram que a proteína Cry1Ac é expressa no algodão Bollgard evento 531 nos níveis de 1,56 µg de proteína/g e 0,86 µg de proteína/g de peso fresco da folha e tecidos da semente, respectivamente. Em toda a planta, foi quantificada 0,044 µg de proteína/g de peso fresco (25 µg/planta), para um total de 0,58 g/ha. Os níveis da proteína na planta triplicaram até o fim do estágio de crescimento. Sendo quantificadas 1,1 µg de proteína/g de peso fresco (200 µg/planta), para um total de 4,94 g/ha (HILBECK et al., 2006). Dessa forma estima-se que a quantidade de proteína Cry incorporada ao solo por resíduos da colheita do algodão Bt seja extremamente inferior àquela proveniente de aplicações de formulações à base da bactéria *Bacillus thuringiensis*, que corresponde a 10g/ha (CAPALBO, comunicação pessoal). No entanto, deve-se considerar que no caso da planta Bt a toxina Cry encontra-se na forma ativa e em formulações encontra-se na forma de pró-toxina (inativa), sendo mais susceptível a degradação por temperaturas elevadas e luz UV (KOSKELLA; STOTZKY, 1997), quando na forma de formulações.

A quantidade de proteína Cry1Ac expressa no grão de pólen foi de 11,5 ng/g de peso fresco (HILBECK et al., 2006). Greenplate (1997) detectou níveis mais altos de proteína Cry expressa no grão de pólen (0,6 µg/g de peso fresco pólen).

Para a proteína NPTII, os níveis na linhagem 531 foram 3,14 e 2,45 µg de proteína/g de peso fresco na folha e tecidos da semente, respectivamente. Os níveis de expressão duplicaram durante o estágio de crescimento (HILBECK et al., 2006).

3.2 Toxina Inseticida de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria aeróbia facultativa, móvel, Gram-positiva, que durante a fase de esporulação forma uma inclusão cristalina constituída por polipeptídeos denominados de δ -endotoxinas ou proteína cristal (Cry) (HANNAY; FITZ-JAMES, 1955; DEAN, 1984), e as libera no meio ambiente no final da esporulação. O cristal protéico apresenta ação tóxica (centenas a milhares de vezes mais potentes que agrotóxicos) e altamente específica para larvas de insetos de três ordens: Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (VALADARES-INGLIS et al., 1998). A proteína cristal, quando sintetizada, apresenta-se na forma não-patogênica (inativa) e é denominada de pró-toxina. Na autólise da bactéria, os cristais de proteína são liberados. Para torná-lo tóxico é necessário ativá-lo. Isso ocorre quando a larva de um inseto susceptível ingere o cristal e é capaz de solubilizá-lo em seu intestino (pH alcalino). Dessa forma, a toxina é liberada e pode se ligar a receptores de membrana celular, provocando desequilíbrio do potencial osmótico e lise da célula e conseqüentemente paralisia do intestino médio do inseto (SCHNEPF et al., 1998).

Os inseticidas biológicos à base de Bt vêm sendo utilizados há mais de 50 anos no Brasil, para o controle mais seletivo de insetos nocivos (pragas e vetores). A obtenção de plantas transgênicas resistentes a insetos constitui-se em mais uma alternativa, com grande potencial de proteção às culturas contra as perdas causadas por insetos-praga (SCHULER et al., 1998; HILDER; BOULTER, 1999; BETZ et al., 2000). Dentre as vantagens na utilização dessas plantas transgênicas destacam-se: a capacidade de conferir proteção a tecidos inacessíveis, durante o controle com formulações convencionais de *B. thuringiensis*; independência das condições climáticas; a limitada distribuição (tecidos da planta); a redução da quantidade de toxina no meio ambiente; a constante proteção por todo o período de cultivo; e a restrição do controle aos insetos que se alimentam dessas plantas (VALADARES-INGLIS et al., 1998; ARANTES et al., 2002).

Genes codificadores da δ -endotoxina inseticida foram clonados já em 1980 (SCHNEPF; WHITELEY, 1981) e a expressão deste transgene em tabaco e tomate foram os primeiros exemplos de plantas geneticamente modificadas para resistência a insetos (BARTON et al., 1987; FISCHHOFF et al., 1987; VAECK et al., 1987).

As variedades transgênicas resistentes a insetos mais comercializadas contêm genes *cry* de *B. thuringiensis* responsáveis pela expressão dessas toxinas inseticidas. Atualmente, existem mais de 20 espécies de plantas expressando esses genes, sendo milho, alfafa, batata, brócolis, maçã e algodão, alguns desses exemplos (ARANTES et al., 2002).

3.3 Possíveis Impactos de Plantas Geneticamente Modificadas

Plantas geneticamente modificadas (GM) vêm sendo cultivadas desde 1995, a partir de então, a área de plantio de culturas GM tem aumentado significativamente. Em 2003, mais de 167 milhões de hectares de culturas GM foram mundialmente plantados por 7 milhões de agricultores (JAMES et al., 2004). Em particular, culturas expressando a proteína inseticida de *B. thuringiensis* têm demonstrado grande vantagem na produção agrícola, assim como na redução do uso de pesticidas e possibilidade para manejo de resistência de insetos (SHAN et al., 2005). Assim como culturas Bt dominam o sistema de produção agrícola de forma crescente, o potencial de impactos ecológicos dessas culturas mantém o interesse, particularmente sobre os efeitos sobre organismos no solo.

Alguns desses possíveis efeitos adversos produzidos por um organismo geneticamente modificado (OGM) são os danos diretos e indiretos sobre organismos benéficos, incluindo, agentes de controle biológico; organismos polinizadores; representantes da flora e fauna de importância econômica, ecológica e social; organismos benéficos decompositores de matéria orgânica; fixadores de nitrogênio, entre outros. Até mesmo a saúde humana, poderia ser diretamente afetada pela ingestão de alimentos, pela alteração de infectividade e patogenicidade de microrganismos (como àqueles da flora intestinal) pela transferência de características das plantas GM aos organismos do ambiente. As plantas GM também podem produzir efeitos indiretos por alterações ambientais e da cadeia alimentar através de um desequilíbrio nas populações de um determinado ecossistema (FONTES, 2002).

Os possíveis fatores de risco incluem o fluxo gênico, por polinização cruzada para espécies compatíveis, inclusive plantas daninhas (DALE, 1992), e o aumento de plantas invasoras (WILLIAMSON, 1992).

Existe a possibilidade de transferência não intencional de informações genéticas entre organismos, de forma que microrganismos originalmente não patogênicos podem vir a se tornar pragas ou ter sua amplitude de hospedeiros aumentada (MEADOWS, 1993).

Alguns autores alertam sobre a possibilidade de que em cultivares que expressam a toxina Bt, os insetos poderiam, rapidamente, criar resistência devido à pressão de seleção e a toxina gerada poderia ser incorporada ao meio ambiente afetando solos e ecossistemas aquáticos (METZ; NAP, 1997; ARANTES et al., 2002).

Com relação ao impacto ambiental de culturas Bt, Betz et al. (2000), acreditam que a quantidade exposta da proteína Cry em plantas seria menor que a quantidade aplicada pelos produtos à base de Bt. Animais (vertebrados e invertebrados) não alvo, quando expostos à alta quantidade de toxina, mostraram-se não susceptíveis.

3.4 Comunidade microbiana do solo rizosférico

A rizosfera é o volume de solo que está adjacente a raiz, sendo por ela influenciado (HILTNER, 1904). O interesse na microbiologia da rizosfera deriva da habilidade da microbiota ser influenciada pelo crescimento da planta e vice versa (BOLTON et al., 1992).

Microorganismos são os seres vivos dominantes no solo rizosférico, tanto em termos de biomassa, correspondendo a mais de 80% da biomassa total (excluindo raízes), quanto de atividade (respiração), e basicamente determinam o funcionamento do ecossistema terrestre (BRUINSMA et al., 2003). Os microrganismos desenvolvem um papel crucial na decomposição da matéria orgânica e na ciclagem de nutrientes e podem contribuir para a supressão de patógenos (WALL; VIRGINIA, 1999; SMITH; GOODMAN, 1999).

Os microrganismos que habitam a rizosfera têm sido bastante estudados porque, neste habitat, a atividade microbiana, a quantidade e o tipo de exsudados são diferentes do solo não rizosférico, acarretando uma maior diversidade de populações de bactérias, fungos, protozoários e nematóides. Nesta região, os fatores físico-químicos também diferem, tais como acidez, umidade, disponibilidade de nutrientes, condutividade elétrica e potencial redox. Os microrganismos podem interagir com os componentes do ambiente das raízes, alterando-os e gerando efeitos benéficos, deletérios ou neutros às plantas (LYNCH, 1990).

Inúmeros trabalhos relatam a importância dos microrganismos benéficos da rizosfera na manutenção da sustentabilidade do agrossistema e seus benefícios à planta com a qual se associam, dentre os quais encontram-se as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP). As RPCP são caracterizadas por colonizar ativamente as raízes e aumentar o crescimento da planta (KLOPPER et al., 1980). Essas rizobactérias têm sido aplicadas sobre ampla extensão de plantas com o propósito de controle de doenças e aumento do crescimento (KLOPPER et al., 1996; VALARINI et al., 2003). Os mecanismos pelos quais as RPCPs afetam sanidade e o crescimento da planta são: promoção direta de crescimento, indução de resistência sistêmica, mineralização, detoxificação, produção de antibióticos, produção de quitinase, produção de HCN e produção de sideróforos (MOURA; ROMEIRO, 2000).

A maioria das estirpes de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas documentadas, pertence aos gêneros *Pseudomonas* (Gram-negativas) e *Bacillus* (Gram-positivas). Entre outros gêneros importantes de RPCPs estão *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*. Muitas espécies destes gêneros citados também são descritas na literatura como diazotróficas, sendo capazes de fixar o nitrogênio atmosférico. As bactérias diazotróficas são extremamente importantes para muitas culturas agrícolas, especialmente em solos com deficiência de nitrogênio (MELO, 1998).

3.5 O Gênero *Pseudomonas*

3.5.1 Características taxonômicas

O gênero *Pseudomonas* compreende um taxon de organismos muito versáteis metabolicamente, capazes de utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos simples ou complexos. Conseqüentemente, eles estão distribuídos por solos e água, sendo importantes como patógenos de plantas, animais e humanos, com algumas estirpes relacionadas à promoção de crescimento de plantas e biocontrole de fitopatógenos (LATOURE; LEMANCEAU, 1997).

O gênero *Pseudomonas* Migula 1894 foi originalmente estabelecido baseado em características morfológicas e metabolismo celular. O reconhecimento de que se trata de um gênero bastante heterogêneo e as subseqüentes reorganizações taxonômicas, são resultados de muitos anos estudos moleculares. Reconhece-se, atualmente, como *Pseudomonas* (*stricto sensu*), apenas as espécies que se agrupam com *P.aeruginosa* e *P. fluorescens* no grupo I de homologia DNA-rRNA (PALLERONI et al., 1973) e subclasse das γ - Proteobacteria (WOESE, 1987), com pelo menos 30 espécies validadas.

Com base nas características fenotípicas, as espécies do gênero *Pseudomonas* do grupo I DNA-rDNA, são divididas em dois grupos distintos, segundo suas propriedades de produzir pigmentos fluorescentes (pioverdininas) ou de acumular nas células inclusões de poli- α -hidroxibutirato (não-fluorescentes) (KIMURA; RIBEIRO, 1994). No entanto, muitas dúvidas ainda permanecem quanto à taxonomia deste gênero.

3.5.2 Importância para sanidade e desenvolvimento de plantas

O gênero *Pseudomonas* está entre os grupos de rizobactérias promotoras do crescimento mais estudadas por possuir grande capacidade de colonizar raízes, suprimir patógenos de solo, ocorrer naturalmente em diversas espécies vegetais, serem nutricionalmente versáteis, possuírem habilidade de crescer numa ampla faixa de condições ambientais, além de produzirem uma grande variedade de antibióticos, sideróforos e hormônios do crescimento vegetal (COLYER; MOUNT, 1984; KLOEPPER et al., 1980; LIU; BAKER, 1980; MELO, 1998).

Para as rizobactérias influenciarem a fisiologia do crescimento das plantas, elas precisam primeiramente colonizar a superfície da raiz (JAMES et al., 1985). O crescimento de bactérias Gram negativas é estimulado por fatores seletivos. Assim, o grupo de organismos que inclui as *Pseudomonas* ssp. foi encontrado em forma de microcolônias recobrendo aproximadamente 4-10% da superfície da raiz, mostrando uma forte interação com a planta (TATE III, 1995).

Dentre o gênero das *Pseudomonas*, o maior número das espécies refere-se ao grupo das fluorescentes. *Pseudomonas* spp. fluorescentes também estão envolvidas na conservação do ambiente. Seus metabolismos de carbono e energia são responsáveis pela dissimilação de nitrato e degradação de compostos xenobióticos. A diversidade metabólica das *Pseudomonas* spp. fluorescentes, dá a estas bactérias uma grande habilidade para adaptação a vários ambientes, tais como solo e rizosfera (LATOUR; LEMANCEAU, 1997).

O interesse em *Pseudomonas* fluorescentes para controle biológico e produção de sideróforos tem aumentado pelo fato de reduzirem a população rizosférica de bactérias e fungos fitopatogênicos (VILLEGAS et al., 2002).

3.6 Fatores que influenciam a comunidade bacteriana do solo e da rizosfera

As comunidades bacterianas são em sua maioria bastante complexas e sensíveis a alterações ambientais. Considerando as associações entre bactérias e plantas, estas podem ser sensíveis a alterações bióticas ou abióticas (MISAGHI; DONNDELINGER, 1990). As interações estabelecidas entre as diversas espécies bacterianas e as plantas determinam a composição das comunidades bacterianas, que são sensíveis dentre outros fatores, à alterações nos genótipos da planta (DUNFIELD; GERMIDA, 2004), do tipo de solo (OVREAS; TORSVIK, 1998), à inoculações de bactérias a essas comunidades (ANDREOTE, 2007) ou da presença de patógeno como *X. fastidiosa* (ARAUJO et al., 2002).

Alguns estudos têm mostrado que a estrutura da comunidade microbiana da rizosfera é influenciada pelas espécies de plantas, devido diferenças na exsudação radicular e rizodeposição em diferentes regiões da raiz (JAEGER et al., 1999; COSTA et al., 2006).

Salles et al. (2004) observou em seus estudos, que a composição da comunidade bacteriana (*Bulkholderia*) do solo foi mais afetada pelo manejo do solo, do que pela espécie de planta cultivada. Lupwayi et al. (1998) observaram que o plantio convencional reduziu significativamente a diversidade microbiana, além de observar que as comunidades bacterianas no plantio convencional foram mais similares em estrutura do que no plantio direto. Feng et al. (2003) observaram que o plantio direto levou a um aumento no carbono orgânico no solo, nitrogênio e biomassa microbiana. Essas mudanças na comunidade microbiana durante os diferentes estágios de crescimento foram determinadas principalmente pela exsudação da raiz e condições ambientais (umidade e temperatura) do que por condições do solo determinadas pelo sistema de plantio.

Muitos estudos têm mostrado que a transgênese também pode alterar a composição da comunidade bacteriana do solo e da rizosfera (CASTALDINI et al., 2005; FANG et al., 2005; HEUER; SMALLA, 1999; LOTTMANN et al., 1999; RASCHE et al., 2006).

3.7 Efeitos potenciais de plantas transgênicas sobre a microbiota do solo

Transformações genéticas (transgenese), como a inserção do gene *cry* de *B.thuringiensis* no genoma de plantas, podem acarretar efeitos ecológicos adversos à microbiota do solo e organismos da rizosfera (composição ou funções ambientais) por meio da introdução da toxina ativa nesses ambientes seja por resíduos da cultura, exsudados da raiz, células senescentes da raiz e inclusive pólen (DONEGAN et al., 1995; SAXENA; STOTZKY, 2000; LOSEY et al., 1999).

Plantas geneticamente modificadas (PGM) apresentam um metabolismo diferenciado em relação à planta não modificada, produzindo exsudados diversificados, implicando em um novo equilíbrio na comunidade microbiana da rizosfera (BRUINSMA et al., 2003).

Compostos orgânicos, incluindo carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos e fatores de crescimento liberados nos exsudados das raízes de plantas e encontrados nos solos estimulam a atividade e o crescimento microbiano, podendo atuar como promotores ou inibidores da colonização (ROVIRA, 1956; HAWES; BRIGHAM, 1992).

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)).

Estudos em laboratório detectaram a exsudação da toxina Bt pela raiz do milho transgênico (SAXENA et al., 1999), trazendo questionamento sobre as possíveis interações dos exsudados da raiz com a biota de solo (rizosfera). Em 2001, Saxena e Stotzky concluíram que a proteína Cry1Ab presente nos exsudados e biomassa de milho Bt, não provocou variações na quantidade de nematóides, protozoários, bactérias e fungos e ainda que presente no intestino de minhocas, não produziu nenhum efeito para este organismo.

Vyllany et al. (2004) verificaram altos níveis de atividade microbiana e colonização micorrízica na rizosfera de milho geneticamente modificado pelo gene *cry1Ab* de *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* (milho Bt), quando comparada à rizosfera do milho isogênico não-Bt. Os autores não observaram diferença no número de bactérias e fungos na rizosfera de milho Bt e não Bt.

A comunidade bacteriana de plantas de milho Bt (gene *cry3Bb*), também não apresentou alterações significativas em relação à variedade isogênica não-Bt (DEVARE et al., 2004). Em estudo de campo, Baumgarte e Tebbe (2005) verificaram que a estrutura da comunidade bacteriana na rizosfera do milho-Bt MON810 foi menos afetada pela presença

da proteína Cry1Ab do que por outros fatores ambientais, contudo enfatizaram a importância de se considerar os efeitos da proteína Cry1Ab sobre organismos não-alvo após a colheita, pois a toxina pode ser detectada até sete meses após a colheita, em resíduos de folhas e principalmente de raízes.

Foi verificado que a proteína Cry pode se acumular no solo durante o crescimento da planta através de exsudados produzidos e de resíduos da colheita, retendo atividade imunológica e biológica em níveis similares aos que tem sido observado em produções microbianas de endotoxinas Bt (PALM et al., 1994).

Existem relatos de que a toxina da planta transgênica Bt é rapidamente adsorvida e imobilizada às partículas do solo (FERREIRA et al., 2003; SAXENA et al., 1999). Outros estudos mostram que parte da proteína é, numa primeira instância, adsorvida nas partículas de solo e a outra parte é biodegradada pelos microrganismos (TAPP; STOTZKY, 1998; KOSKELLA; STOTZKY, 1997; CRECCHIO; STOTZKY, 2001). Palm et al. (1996) observaram que o declínio da proteína no solo, na sua maior parte, é devido à degradação biótica e não à adsorção das partículas do solo. A biodegradação de toxinas Bt é reduzida em solos ácidos e com alto teor de argila, onde a mesma permanece detectável durante meses.

Tipicamente, proteínas são rapidamente quebradas e utilizadas como nutrientes por microrganismos do solo. Isso indica que proteínas Cry não persistem no solo e são degradadas em semanas (PALM et al., 1994; SIMS; HOLDEN, 1996; PALM et al., 1996; DONEGAN; SLEIDER, 1999). A estabilidade da proteína cristal é altamente variável, desde poucos dias a vários meses dependendo das condições ambientais (PEFERÖEN, 1997). Os mecanismos da degradação da proteína Cry e os organismos responsáveis foram pouco estudados (CLARK et al., 2005).

Além das plantas Bt, outras plantas geneticamente modificadas tem sido investigadas, quanto à possibilidade de impacto na microbiota do solo e da rizosfera. 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. Porém, em alguns estudos não são observados efeitos da transgênese nas comunidades microbianas. Asao et al. (2003) não observaram diferença entre a microbiota do solo de morangueiros transgênicos (gene de quitinase de arroz) e não transgênicos.

Estudos de campo com outros transgênicos demonstram mudanças na diversidade de comunidades microbianas do solo (DI GIOVANNI et al., 1999; DONEGAN et al., 1999). Contudo, alguns trabalhos apontam que fatores edafo-climáticos são mais determinantes na

atividade e composição de comunidades microbianas do que os efeitos das plantas transgênicas (LUKOW et al., 2000; BLACKWOOD; BUYER, 2004; WU et al., 2004). Outras pesquisas demonstram que apesar das plantas transgênicas produzirem mudanças na diversidade estrutural e funcional da comunidade bacteriana, estes efeitos são transientes ou incapazes de alterar o funcionamento do solo (GRIFFITHS et al., 2000; COWGILL et al., 2002).

3.8 Técnicas para estudo da comunidade bacteriana do solo

3.8.1 Técnica de cultivo

O solo representa provavelmente o ambiente mais complexo e mais difícil para estudo. A maioria dos estudos de estrutura da comunidade bacteriana do solo indicando a diversidade foi realizada pela da técnica de cultivo (MILLER *et al.*, 1989). Esta técnica é limitada, pois apenas uma pequena porção das populações microbianas pode ser recuperada da rizosfera e do solo (AMANN; SCHLEIFER, 1995; PACE, 1997; AZEVEDO, 1998; KIRK et al., 2004). Aproximadamente 1% da população bacteriana do solo pode ser cultivada pelas práticas padrões de laboratório (TORSVIK et al., 1998).

Torsvik et al. (1998) demonstraram por meio de análises de reassociação de DNA, que a comunidade bacteriana pode conter mais de 10.000 genomas diferentes de bactéria e que a diversidade da comunidade total do solo é pelo menos 200 vezes maior do que a diversidade de bactérias isoladas.

3.8.2 Técnicas Moleculares

As limitações encontradas em estudos de diversidade microbiana com técnicas dependentes de cultivo podem ser superadas através da análise de DNA, onde o material genético é extraído diretamente de amostras de solo e/ou da rizosfera. Análises dos fragmentos do DNAr 16S, amplificado por PCR tem sido usadas para estudar a comunidade bacteriana. Essas pequenas subunidades de DNAr, ou suas codificações de genes, são as principais moléculas utilizadas para análises da comunidade microbiana (O' DONNELL *et al.*, 1994) devido a sua importância para a classificação filogenética (WOESE *et al.*, 1990) e sequências disponíveis em bancos de dados (MAIDAK *et al.*, 1999).

Técnicas moleculares como a Eletroforese em Gel por Gradiente de Desnaturação (DGGE) ou temperatura (TGGE) (HEUER; SMALLA, 1997) são ferramentas bem estabelecidas na microbiologia ambiental e permitem o estudo da complexidade e do comportamento da comunidade microbiana. O DGGE é uma técnica autêntica, viável,

rápida, barata e, além disso, permite a realização de análises simultâneas de amostras, a observação da dinâmica da comunidade e também a identificação dos microrganismos presentes pelo seqüenciamento da banda extraída do gel (MUYZER, 1999).

A comparação de comunidades microbianas pela técnica de DGGE pode ser realizada pelo uso da análise multivariada. A análise multivariada foi muito utilizada na macroecologia e mais recentemente para descrição da estrutura da comunidade microbiana (TER BRAAK, 1995). Esta é uma ferramenta de grande importância no estudo e comparação de comunidades microbianas, onde diferentes fatores atuam determinando sua composição. Steenwerth *et al.* (2002) foram os primeiros a aplicar a análise multivariada em estudos de comunidades bacterianas do solo. Posteriormente, Salles *et al.* (2004) utilizou esta ferramenta no estudo sobre alterações na comunidade bacteriana de *Burkholderia* spp. causada por diferentes tratamentos agrícolas do solo.

Embora a análise multivariada possa ser aplicada a todo o método que fornece a distribuição da espécie por amostra coletada, só recentemente ela tem sido aplicada como uma ferramenta estatística para interpretar o fingerprinting de DGGE (MARSCHNER; BAUMANN, 2003; McCAIG *et al.*, 2001; MUYLAERT *et al.*, 2002). A maneira tradicional de analisar perfis de DGGE é agrupando a análise usando UPGMA como o algoritmo. Este método usa uma maneira hierárquica de identificar os padrões similares baseados na presença ou na ausência de bandas, mas não permite a quantificação das bandas, nem a correlação entre o perfil de DGGE e as variáveis ambientais, o que pode ser conseguido usando a análise multivariada. A análise multivariada como a análise de correspondência canônica (CCA) pode ser aplicada para estudar mudanças no ambiente, correlacionando a estrutura da comunidade com as variáveis explanatórias, que podem ser avaliadas por testes estatísticos (SALLES *et al.*, 2004).

A CCA usa o modelo unimodal para modelar as respostas de espécies às variações ambientais como uma simplificação matemática para permitir a avaliação de um grande número de parâmetros e identificação de um pequeno número de eixos ordinários (RAMETTE, 2007). A CCA tem sido amplamente utilizada para identificar fatores ambientais que influenciam a diversidade de bactérias entre grandes números de parâmetros ambientais avaliados para a mesma amostra, quando a diversidade é determinada por técnicas independentes de cultura, técnicas de "fingerprinting", tais como, ARISA (YANNARELL; TRIPLETT, 2005), DGGE (SALLES *et al.*, 2004; SAPP *et al.*, 2007) ou T-RFLP (C´ORDOVA-KREYLOS *et al.*, 2006).

3.8.3 Análise da atividade microbiana do solo

A diversidade e quantidade de microrganismos do solo são imensas. A massa microbiana é responsável direta e indiretamente por processos microbiológicos e bioquímicos diversos, os quais exercem enorme influência na produtividade e sustentabilidade dos ecossistemas terrestres (SIQUEIRA et al., 1994). Os microrganismos ocupam 5% do espaço poroso do solo e a ocorrência de um microorganismo em determinado solo é a expressão da sua reação às condições ambientais, dentro dos limites da bagagem genética possuída pelo microorganismo (SILVA et al., 2004).

A atividade microbiológica inclui todas as reações metabólicas celulares, suas interações e seus processos bioquímicos mediados ou conduzidos pelos organismos do solo (SIQUEIRA et al., 1994).

A atividade metabólica microbiana pode ser determinada através da avaliação da taxa de respiração, produção de ATP, produção ou liberação de calor, biossíntese de macromoléculas, consumo de substratos ou acúmulo de produtos, atividade enzimática total ou específica, taxa de mineralização, densidade populacional e biomassa, reações bioquímicas específicas ou observações microscópicas (SIQUEIRA et al., 1994).

Amostras de solo podem ter a atividade microbiana determinada pela hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA), um método que avalia a atividade hidrolítica indiscriminada (SCHNÜNER; ROSSWALL, 1982). Segundo Alencar e Costa (2000); Costa et al. (1996, 2000), o FDA é hidrolisado por várias classes de enzimas (lipases, proteases e esterases), presente nos microrganismos. A fluoresceína permanece nas células causando fluorescência intracelular, que pode ser visualizada por microscopia de fluorescência ou quantificada por fluorometria ou espectrofotometria (BOEHM et al., 1992; COSTA et al. 1996, 2000).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Origem e caracterização dos solos

Para realização dos estudos, foram utilizados solos de cultura de algodão não transgênico provenientes de propriedades localizadas em Campinas (Fazenda Santa Elisa – Instituto Agrônomo de Campinas) e Itapira (Sítio Jatobá). Foram amostrados de cada área, 515 Kg de solo disperso com profundidade de 0 a 20 cm. Nas áreas de amostragem de solo, foi cultivado algodão por um período aproximado de 3 e 10 anos respectivamente. Os solos foram submetidos à análise granulométrica pelo método do densímetro, para sua caracterização, realizada pelo Laboratório de Física do Solo do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). O solo coletado em Campinas (aqui denominado SSE) foi caracterizado como Franco-argiloarenoso (30% argila; 10,2% silte; 59,8% areia) e o solo coletado em Itapira (ITA) foi caracterizado com Argiloarenoso (45% argila; 9,6% silte; 45,4% areia total).

Também foi realizada a análise química dos solos pelo IAC (Tabela 1) para proceder-se a adubação e calagem para o ensaio em casa-de-vegetação. Segundo indicações das análises dos solos, para a adubação mineral do solo SSE, foi utilizado: 1,17 g/vaso de uréia; 20,25 g/vaso de super fosfato simples; 2,70 g/vaso de cloreto de potássio e 0,16 g/vaso de ácido bórico. Para adubação mineral do solo ITA, foi utilizado: 1,17 g/vaso de uréia; 13,50 g/vaso de super fosfato simples; 3,60 g/vaso de cloreto de potássio e 0,16 g/vaso de ácido bórico.

Tabela 1. Características químicas dos solos utilizados neste estudo

Solo	M. O. (g/dm ³)	pH	P (mg/dm ³)	K	Ca	Mg	S.B.	H+Al	CTC	V(%)	B	Cu (mg/dm ³)	Fe (mg/dm ³)	Mn	Zn
ITA	28	5,8	41	5,2	45	12	62,2	18	80,4	77	0,62	1,3	20	25,5	1,6
SSE	27	4,7	36	3,1	23	7	33,1	42	75,4	44	0,43	4	16	18,1	1,5

^a M.O., Matéria orgânica; ^b S.B., Soma de bases; ^c H+Al, Ácido potencial; ^d CTC, Capacidade de troca catiônica; ^e V(%), Saturação de Bases

4.2 Delineamento Experimental

Os estudos foram conduzidos em condições controladas de casa-de-vegetação ($\pm 28^{\circ}\text{C}$), no Laboratório de Quarentena “Costa Lima” (LQC) da Embrapa Meio Ambiente. Os tratamentos consistiram de combinações dos fatores: plantas de algodão transgênico (Bollgard evento 531) e algodão isogênico (variedade parental Coker 312), dois tipos de solo (descritos no item 4.1) e quatro estádios de crescimento da planta (descritos no item 4.3).

Sementes de algodão transgênico e isogênico convencional, fornecidas pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (originadas da Monsanto do Brasil Ltda.)

foram semeadas em vasos com capacidade para 8L (17 cm de diâmetro e 21 cm de altura), em dois tipos de solos. Foram distribuídas seis sementes por vaso, sendo realizado desbaste após emergência para estabelecimento de três plantas por vaso. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, para um total de 80 unidades experimentais.

4.3 Coleta e processamento das amostras

As coletas foram realizadas em quatro estádios de crescimento do algodão, compreendendo as fases de estabelecimento (1-20 dias após emergência), formação dos botões florais e flores (21-60 após emergência), florescimento e formação de capulhos (61-100 após emergência) e por fim maturação e abertura dos capulhos do algodão (101-140 após emergência), conforme descrito por Souza e Beltrão (1999). A primeira coleta foi realizada 20 dias após a emergência (30/01/06); a segunda coleta foi feita 56 dias após a emergência (07/03/06); a terceira coleta em 84 dias após a emergência (05/04/06) e por fim a quarta coleta foi realizada $\pm$ 300 dias após a emergência (21/11/06).

A amostragem dos vasos (três plantas/vaso) foi realizada com o auxílio de pás. Para tanto, a parte aérea das plantas foi cortada e descartada e o sistema radicular foi armazenado em embalagens plásticas individualizadas, devidamente identificadas. As amostras foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, onde foram processadas. Cada amostra consistiu da mistura de solo rizosférico de três plantas.

4.4 Isolamento e contagem de bactérias cultiváveis da rizosfera

O isolamento de bactérias cultiváveis da rizosfera de algodão Bt e algodão não-Bt foi realizado pelo método de diluição em placas. Assumiu-se que solo de rizosfera compunha-se das partículas de solo que se desprendiam das raízes quando agitadas vigorosamente (SIQUEIRA; FRANCO, 1988; SILVA, 2002).

Após a coleta, 2 g de solo rizosférico de cada amostra (3 plantas/vaso) foram colocados em erlenmeyers esterilizados contendo 18 mL de tampão PBS (tampão fosfato “phosphate buffered saline” - 1,44 g/L de Na_2HPO_4 ; 0,24 g/L de KH_2PO_4 ; 0,20 g/L de KCl; 8,00 g/L de NaCl; pH 7,4). Os erlenmeyers foram devidamente identificados e mantidos à 28°C sob agitação (100 rpm), durante 30 minutos. Decorrido este intervalo de tempo procedeu-se uma diluição seriada fator 10.

Para o isolamento de bactérias totais, alíquotas de 100 μL de cada diluição da suspensão de solo rizosférico foram semeadas em triplicata, em placas de petri contendo meio TSB 10% (Tryptic Soy Broth - caldo triptona de soja - Merck) suplementado com

ciclohexamida (100 µg/mL) para inibir o crescimento de fungos, sendo então incubadas a 28 °C por 8 dias.

Para o isolamento de *Pseudomonas*, alíquotas de 100 µL de cada diluição da suspensão de solo rizosférico foram semeadas em triplicata, em placas de petri contendo meio KB (KING et al., 1954) modificado para seleção de *Pseudomonas* fluorescentes (King B – Difco – 20 g/L de proteose peptona nº 03; 10 mL/L de glicerol; 1,5 g/L de KH₂PO₄; 1,5 g/L MgSO₄.7 H₂O; 18 g/L de ágar, suplementado com: 0,1 g/L de ciclohexamida; 0,05 g/L de ampicilina; 12,5 mg/L de cloranfenicol e 5 mg/L de PCNB - Kobutol), sendo então incubadas a 28 °C por 8 dias.

Após o crescimento bacteriano, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi utilizado para estimar o número de bactérias por grama de solo. As colônias bacterianas foram selecionadas ao acaso, purificadas e preservadas no mesmo meio de isolamento (TUIE, 1969).

4.5 Identificação de linhagens de *Pseudomonas* pela extração de ácidos graxos da membrana celular (FAME)

Para a análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular, bactérias isoladas da rizosfera de algodão Bt e não Bt em meio King' B (item 4.4) foram inoculadas em meio TSBA®BBL e incubadas a 28 °C, por 24 h. Decorrido este tempo, foram coletadas 4 a 6 alças do terceiro quadrante e transferidas para tubos Kimax.

As amostras foram então processadas em quatro etapas para extração dos ácidos graxos celulares, sendo elas: saponificação, metilação, extração e lavagem. Inicialmente, adicionou-se, 1 mL do reagente de saponificação, agitou-se durante 10 s. Os tubos foram colocados em banho-Maria 95-100 °C, por 5 minutos. Em seguida os tubos foram resfriados em água e novamente agitados por 10 s, retornando ao banho-Maria, por mais 25 minutos. Após resfriamento em água, adicionou-se 2 mL do reagente de metilação. Os tubos foram agitados 10 s e colocados em banho (80±1) °C, por 10 minutos; seguido por resfriamento em água. Adicionou-se 1,25 mL do reagente de extração e colocaram-se os tubos no rotator clínico (FISHER M346) por 10 minutos. Com o auxílio de pipetas Pasteur, foi descartada a fase inferior (aquosa) e adicionado ao tubo 3 mL do reagente de lavagem básica, retornando os tubos para o rotator clínico por mais 5 minutos. Ao fim deste tempo, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm (3 min), quando 2/3 da fase superior (0,5 mL) foi transferido para os *vials* (2 mL).

Na análise foi utilizado cromatógrafo gasoso com injetor automático e detector *Flame Ionization Detector* (FID), marca Agilent, modelos 6850 e 7683, respectivamente. A interface

foi obtida pelos programas *ChemStation* A0901[1206] e *Sherlock* 4.0. O método e a biblioteca selecionados foram o TSBA50.

Os isolados foram identificados por meio do “Software” de Identificação Microbiana (MIDI, Biblioteca *Sherlock*® TSBA versão 5.0, Microbial ID, Newark, DE, USA). Os perfis dos ácidos graxos obtidos foram comparados com os dados contidos na biblioteca TSBA50 (linhagens de referência armazenadas na biblioteca). Isolados com índices de similaridade (IS) de 0,4 ou maior foram considerados positivamente identificados. Esta análise foi realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente.

4.6 Avaliação “*in vitro*” do efeito do algodão geneticamente modificado sobre a colonização de raízes por *Pseudomonas fluorescens*

A bactéria *Pseudomonas fluorescens* biotipo A, conhecida pelo potencial como promotora de crescimento de plantas, foi selecionada para observação do potencial e padrão de colonização de raízes do algodão Bt. Ela foi selecionada, pois dentre as linhagens identificadas deste grupo (item 4.5), a espécie *P. fluorescens* foi isolada exclusivamente do algodão convencional. Portanto, este isolado (C2S1-1) foi utilizado neste ensaio para verificar se a transgênese produz algum efeito na colonização desta bactéria benéfica.

Para tanto, sementes de algodão transgênico e algodão convencional foram desinfestadas superficialmente e permaneceram em placa de Petri com papel de filtro umedecido com água destilada esterilizada, até o início da sua germinação (emissão da radícula) na presença de luz e sob temperatura de 25 °C. As sementes pré-germinadas foram então inoculadas com suspensões das bactérias (crescidas em meio líquido) na concentração de 10^6 UFC/mL, e em seguida transferidas para tubos de ensaio contendo phytigel. Foram semeadas duas sementes por tubo de ensaio, com seis repetições, por tratamento. Os tubos foram incubados à 25 °C sob fotoperíodo de 12 horas.

Amostras de segmentos de raiz, em diferentes períodos após a inoculação com a bactéria foram fixadas em solução de Karnovsky (“*overnight*”) e posteriormente lavadas em tampão cacodilato (0,05M). Em seguida, as espécimes foram fixadas em O_5O_4 1% por uma hora, seguidos por lavagens em água destilada, desidratação em série crescente de acetona, secas ao ponto crítico e, então, metalizadas com fina camada de ouro. Observações ultraestruturais foram feitas no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) de alta resolução (Modelo Leo 982 GEMINI DMS - Zeiss e Leica) da Embrapa Meio Ambiente e fotodocumentadas.

4.7 Determinação da atividade microbiana no solo por hidrólise de FDA (diacetato de fluoresceína)

Foram coletadas amostras de solo rizosférico de cada tratamento e acondicionadas em sacos plásticos codificados, para então ser executada a metodologia descrita para a determinação da hidrólise de FDA (GHINI, 1998).

Para o preparo de cada amostra, foram pesados 5g de solo em duplicata, com cinco repetições (vasos) por tratamento, em frascos de erlenmeyer de 250 mL, juntamente com 20 mL de tampão fosfato de potássio 60 mM (8,7g de K_2HPO_4 e 1,3g de KH_2PO_4 / L de água destilada; pH 7,6). Para iniciar a reação de hidrólise de FDA foi adicionado 0,2 mL (400 µg) da solução estoque de FDA (2 mg.mL⁻¹ acetona). As amostras foram incubadas por 20 minutos em agitador a 200 rpm sob temperatura de 25 °C. Em seguida, foram imediatamente adicionados 20 mL de acetona por frasco, com a finalidade de interromper a reação.

As amostras foram submetidas à filtração (Whatman nº1), e o filtrado foi recolhido em tubos de ensaio tampados com papel alumínio. Após a filtração das amostras, foram determinadas as absorbâncias dos filtrados em espectrofotômetro à 490 nm. As variações das leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para FDA e os resultados foram expressos em µg de FDA hidrolisado/g de solo seco/minuto.

4.8 Monitoramento da toxina Cry1Ac na rizosfera de algodão Bt

4.8.1 Teste qualitativo para detecção da proteína Cry1Ac na de rizosfera de algodão Bt

O teste qualitativo para detecção da proteína Cry1Ac em amostras de rizosfera de algodão Bt foi realizado por meio do Kit Seed Bt1Ac Trait™, destinado a sementes de algodão que expressem o gene *cry1Ac*. A metodologia foi adaptada para amostras de solo conforme Baumgarte et al. (2005) modificado.

Para o teste, um grama de solo rizosférico de cada tratamento foi imerso em 3 mL de tampão de extração (fornecido pelo fabricante), e agitado por 1 hora em shaker, a 160 rpm e 15°C . Após este período, as amostras foram centrifugadas a 16.000 g, 15°C, por 20 min. Apenas 0,5 mL do sobrenadante foram transferidos para eppendorf, onde foi colocada a tira de fluxo lateral Bt1Ac para verificação da presença da toxina. Após a primeira coleta, o teste foi otimizado por meio da concentração da amostra (evaporação) e ressuspensão em tampão de extração. O resultado do teste foi analisado após 15 minutos de exposição da tira a amostra. A amostra foi considerada positiva para a proteína Cry1Ac, quando a tira apresentava duas linhas vermelhas (linha controle e linha teste).

4.8.2 Quantificação da proteína Cry1Ac em amostras de rizosfera de algodão Bt

Para a quantificação da proteína Cry1Ac nas amostras de rizosfera de algodão Bt, foram adotados os mesmos procedimentos de extração da proteína Cry descritos no item 4.8.1. Após a extração, foi realizada a concentração de 1 mL de cada extrato (sobrenadante) por meio da ultrafiltração com filtro centrífugo Microcon YM-10 (Millipore) em centrífuga (14.000 g), a 15°C, por 30 min. Os extratos concentrados (50 µL) foram então destinados a leitura em placa ELISA.

A leitura em placa ELISA foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do kit "Quantitative Cry1Ac Microtiter Plate ELISA Test (Dow AgroSciences - SDI). Para tanto, foram adicionados a placa 50 µL da solução conjugado Cry1Ac em cada orifício da placa. Imediatamente foram adicionados 50 µL dos extratos de solo concentrados, sendo a placa levemente agitada e incubada por 1 hora. Após este período, foi adicionado 100 µL da solução substrato em cada orifício e então, a placa foi novamente incubada por 15 min. Após este período, foi adicionado 100 µL da reagente de cor e em seguida realizada a leitura das amostras em leitor de placa ELISA (SpectraMax plus Microplate Spectrophotometer), a 450 nm. A quantificação da proteína foi feita por meio do programa Softmax PRO 4.3 LS. Como controles negativo foram utilizados extratos de solo rizosférico de algodão convencional, dos diferentes estádios de desenvolvimento da planta. Como branco foi utilizado o tampão de extração da proteína. A leitura da placa foi realizada no Laboratório de Genética de Plantas da ESALQ/USP, com a colaboração do Dr. Daniel Scherer de Moura.

A sensibilidade do ELISA foi aumentada pelo uso de uma curva de calibração (Figura 2), que consistiu em soluções de 0,1; 0,3; 0,7; 0,9 e 1,3 ng de proteína Cry1Ac (purificada) em tampão de extração (50 µL).

Para estimar a quantidade de proteína recuperada pelo processo de extração utilizado, foram adicionadas aos solos argiloarenoso e franco-argiloarenoso de algodão convencional, 1,3 ng de proteína/g de solo à 50 % da capacidade de campo. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente e em seguida submetidas ao processo de extração e quantificação da proteína, descritos anteriormente.

Figura 2. Curva padrão para quantificação de proteína Cry1Ac em amostras de rizosfera de algodão Bt por ELISA.

4.9 Eletroforese em Gel por Gradiente de Desnaturação (DGGE)

4.9.1 Extração de DNA de solo

Para a extração de DNA total foram utilizados 0,5 gramas de solo rizosférico (provenientes de um pool de três plantas) com cinco repetições (vasos) por tratamento. A extração foi realizada por meio do kit de extração de DNA de solo MoBio (UltraClean™ Soil DNA Kit – MOBIO), seguindo instruções do fabricante.

4.9.2 Amplificação do gene 16S rDNA para análise em DGGE

Para amplificação do gene 16S, o DNA total foi submetido à reação de PCR com volume de 25 µL, contendo 1 µL de DNA molde diluído 1:10; 2,5 µL de tampão para PCR 10x (Invitrogen); 1,25 mM de MgCl₂; 0,1 µM dos primers R1387 e P027F (Tabela 2); 0,1 mM de cada deoxinucleosídeo trifosfatado (dCTP, dGTP, dATP e dTTP) (Pharmacia); 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 0,5 µL de BSA 100x e 0,25 µL de formamida. A mistura foi colocada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc. USA), programado para gerar uma desnaturação inicial em 4 minutos a 94°C, e 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 62,5°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Após o término, 5 µL da reação foram utilizados para observação em gel de agarose (1,2%) de um fragmento de aproximadamente 1360 pb.

O produto de PCR obtido foi submetido a uma reamplificação com volume de 50 µL, contendo 1 µL de DNA molde; 5 µL de tampão para PCR 10x; 0,2 µM dos primers R1387 e U968-LGC (Tabela 2); 0,2 mM de cada dCTP, dGTP, dATP e dTTP (Pharmacia); 3,75 mM de MgCl₂; 5,0 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 1,0 µL de BSA 100x e 0,5 µL de

formamida. A mistura foi colocada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc. USA), programado para gerar uma desnaturação inicial em 5 minutos a 94 °C, e 30 ciclos de 94 °C, 1 minuto; 55 °C por 30 segundos; 72 °C por 2 minutos, seguidos de uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Após o término, 5 µL da reação foram utilizados para observação em gel de agarose (1,2%) de um fragmento de aproximadamente 450 pb.

A análise de DGGE foi realizada como descrito por Muyzer et al. (1993) e adaptado por Araújo et al. (2002) no sistema Ingeny (Uphor2, Ingeny, Goes, Holanda). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese gel vertical de poliacrilamida 6% com gradiente desnaturante de uréia/formamida de 45-65%, a 60 °C, numa eletroforese de 15 h a 100 V. Após este período, o gel foi corado com SYBR Gold (diluído 1:10000; Gold Nucleic Acid Gel Stain; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) e observado em transluminador UV.

4.9.3 Amplificação do gene 16S rDNA de *Pseudomonas* para DGGE

Para amplificação do gene 16S, o DNA total foi submetido à reação de PCR com volume de 50 µL, contendo 1 µL de DNA molde; 5 µL de tampão para PCR 10x; 0,2 µM dos primers F311 Ps e R1459 (Tabela 2); 0,2 mM de cada dCTP, dGTP, dATP e dTTP (Pharmacia); 3,76 mM de MgCl₂; 5,0 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). A mistura foi colocada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc. USA), programado para gerar uma desnaturação inicial em 7 minutos a 94 °C, e 30 ciclos de 94 °C, 1 minuto; 63 °C por 1 minuto; 72 °C por 2 minutos, seguidos de uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Após o término, 5 µL da reação foram utilizados para observação em gel de agarose (1,2%) de um fragmento de aproximadamente 1150 pb.

O produto de PCR obtido foi submetido a uma reamplificação com volume de 50 µL, contendo 1 µL de DNA molde; 5 µL de tampão para PCR 10x; 0,2 µM dos primers R1387 e U968-LGC; 0,2 mM de cada dCTP, dGTP, dATP e dTTP (Pharmacia); 3,75 mM de MgCl₂; 5,0 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 1,0 µL de BSA 100x e 0,5 µL de formamida. A mistura foi colocada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc. USA), programado para gerar uma desnaturação inicial em 5 minutos a 94 °C, e 30 ciclos de 94 °C, 1 minuto; 55 °C por 30 segundos; 72 °C por 2 minutos, seguidos de uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Após o término, 5 µL da reação foram utilizados para observação em gel de agarose (1,2%) de um fragmento de aproximadamente 450 pb.

A análise de DGGE foi realizada como descrito por Muyzer et al. (1993) e adaptado por Araújo et al. (2002) no sistema de Ingeny (Uphor2, Ingeny, Goes, Holanda). Os produtos de PCR foram colocados em gel vertical de poliacrilamida 6% com gradiente desnaturante de uréia/formamida de 45-65%, a 60 °C, numa eletroforese de 15 h a 100 V. Após este período, o gel foi corado com SYBR Gold (diluído 1:10000; Gold Nucleic Acid Gel Stain;

Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) e observado em luz ultravioleta. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Genética de Microrganismos do Depto. de Genética – Esalq/USP.

Tabela 2. Oligonucleotídeos

Primer	Sequência (5' - 3')	Alvo	Referência
P027F	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S Universal	HEUER & SMALLA, 1997
R1387	CGGTGTGTACAAGGCCGGAACG	16S Universal	HEUER & SMALLA, 1997
U968 GC	Grampo de GC-AA CGC GAA GAA CCT TAC	16S Universal	HEUER & SMALLA, 1999
F311Ps	CTGGTCTGAGAGAGGATGATCAGT	16S <i>Pseudomonas</i>	MILLING et al., 2004
R1459Ps	AATCACTCCGTGGTAACC	16S <i>Pseudomonas</i>	MILLING et al., 2004

4.9.4 Processamento das imagens de DGGE

O programa GelComparII foi utilizado para normalização e conversão das imagens em matrizes de presença/ausência de bandas. A normalização e seleção de bandas feita pelo programa foram cuidadosamente verificadas e correções foram feitas quando necessárias. Uma tabela, contendo a posição das bandas e as respectivas presenças e intensidades, foi exportada para análises posteriores (item 4.10).

O cálculo da matriz de similaridade foi baseado no coeficiente de correlação de Pearson.

4.9.5 Eluição e identificação de bandas do DGGE

As diferentes bandas obtidas de cada tratamento foram eluídas diretamente do gel, e utilizadas como DNA molde para uma reação de reamplificação utilizando-se os oligonucleotídeos sintéticos 968F e R1387. Num passo seguinte, o DNA amplificado foi checado em novo gel de DGGE para verificar a comigração com a banda de interesse. As bandas selecionadas foram purificadas com o kit GENE CLEAN® Turbo para PCR e submetidas ao seqüenciamento junto ao Instituto Biológico (IB), com a colaboração do Prof. Dr. Ricardo Harakava.

As sequências obtidas provenientes de cada uma das diferentes bandas foram utilizadas para identificação filogenética nos bancos de dados da Ribosomal Data Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>) e também por meio da análise de BlastN no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.10 Análises Estatísticas

Foi realizada análise de variância das variáveis contagens de bactérias (Log) e atividade microbiana (hidrólise de FDA). A comparação de médias entre o algodão transgênico e isogênico, em cada combinação de solo e data de coleta foi realizada utilizando o teste F para contrastes. A comparação das médias dos níveis de proteína Cry na rizosfera de algodão Bt foi realizada por meio do teste t para contrastes. Foi utilizado Proc GLM do SAS System (SAS Copyright (c) 2003; Versão 9.1 do SAS Institute, Cary, NC, USA) (MONTGOMERY, 1991).

Para correlacionar os fatores ambientais avaliados com os perfis de DGGE, os grupos de dados gerados com primers 16S-universais e com primers para *Pseudomonas* foram submetidos à análise multivariada com auxílio do programa Canoco 4.5 (Microcomputer Power, Itaca, NY, USA). Após a medida do gradiente dos dados, foi selecionada a análise de CCA (*Canonical Correspondence Analysis*), considerando os fatores ambientais tipo de planta e solo, dentro de cada uma das amostragens realizadas. A influência destes fatores ambientais na composição das comunidades bacterianas foi testada pelo teste de permutação de MonteCarlo, com 499 amostragens aleatórias dos dados.

5 RESULTADOS

5.1 Número de Bactérias Cultiváveis

5.1.1 Bactérias totais na rizosfera de algodão Bt e não Bt

O número de bactérias cultiváveis na rizosfera de algodão transgênico (Bt) e isogênico (não Bt) foi determinado em diferentes estádios fenológicos da cultura, sob condições controladas de casa-de-vegetação, em dois tipos de solos.

Em amostras de solo rizosférico argiloarenoso (ITA), de algodão Bt e não Bt foi observada diferença ($p < 0,10$) apenas na primeira coleta (estádio inicial de estabelecimento do algodão). Nesta coleta, o número de UFC/g de solo foi superior nas amostras de solo (ITA) de algodão convencional (7,22 Log UFC/g de solo) do que nas amostras de algodão transgênico (7,06 Log UFC/g de solo) (Figura 3).

Em solo rizosférico franco-argiloarenoso (SSE) foi observada maior evidência ($p < 0,05$) de diferença no número de UFC/ g de solo do algodão transgênico (6,91 Log UFC/g de solo) em relação ao algodão convencional (6,73 Log UFC/g de solo), durante a segunda coleta (fase de formação dos botões florais/flores). Nas demais coletas não houve diferença estatística nos valores de UFC/g de solo entre amostras de rizosfera de algodão transgênico e convencional (Figura 4).

Quando comparados os dois tipos de solos, para cada planta (convencional ou transgênica), foi verificado maior número de bactérias (UFC/ g de solo) em solo ITA do que em solo SSE, durante a primeira e segunda coletas (Anexo A 1 e A 2).

Com relação à idade da planta, para o cultivo do algodão convencional em solo ITA, foi observado uma baixa evidência ($p < 0,10$) de diferença no número de UFC/g de solo entre a fase de estabelecimento (coleta 1) e a fase de abertura da maçã (coleta 4), enquanto que no cultivo do algodão transgênico em solo ITA, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de UFC/g de solo na fase de florescimento (coleta 3), em relação aos demais estádios de desenvolvimento da planta (Anexo B). No cultivo do algodão convencional, em solo SSE, foi verificada diferença significativa ($p < 0,01$) no número de UFC/g de solo entre todas as fases do ciclo da cultura, exceto entre a primeira e segunda coletas e entre a terceira e quarta coletas (Anexo B). No cultivo do algodão transgênico em solo SSE, também foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) no número de UFC/g de solo entre todas as fases do ciclo da cultura, exceto entre a terceira e quarta coletas (Anexo B).

Figura 3. Número de bactérias totais (Log UFC/g de solo) em solo rizosférico argiloarenoso (ITA) de algodão transgênico e convencional nas quatro fases do ciclo da cultura (coletas). * $p < 0,10$

Figura 4. Número de bactérias totais (Log UFC/g de solo) em solo rizosférico franco-argiloarenoso (SSE) de algodão transgênico e convencional nas quatro fases do ciclo da cultura (coletas). ** $p < 0,05$

5.1.2 População de *Pseudomonas* na rizosfera de algodão Bt e não Bt

A contagem de *Pseudomonas* expressa em Log de unidades formadoras de colônia (Log UFC/g de solo) foi realizada em amostras de solo rizosférico coletadas em quatro estádios fenológicos da planta de algodão Bt e não Bt, em dois tipos de solos.

Em solo argiloarenoso (ITA) não foi encontrada diferença significativa no número de UFC/g de solo de *Pseudomonas* em amostras de solo de algodoeiro transgênico (Bt) e convencional (não Bt) (Figura 5).

Em solo franco-argiloarenoso (SSE), foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostras de rizosfera de algodão transgênico (Bollgard) (4,63 Log UFC/g de solo) e algodão convencional (4,12 Log UFC/g de solo), apenas na primeira coleta (estádio inicial de estabelecimento da planta) (Figura 6). Nas demais coletas não foram observadas diferenças.

Figura 5. Número de *Pseudomonas* (Log UFC/g de solo) em solo rizosférico argiloarenoso (ITA) de algodão transgênico e convencional nas quatro fases do ciclo da cultura (coletas).

Figura 6. Número de *Pseudomonas* (Log UFC/g de solo) em solo rizosférico franco-argiloarenoso (SSE) de algodão transgênico (Bollgard) e algodão convencional nas quatro fases do ciclo da cultura (coleta). ** $p < 0,05$

Quando comparados os dois tipos de solos, para cada planta (transgênica ou convencional), não foi observada diferença no número de *Pseudomonas* (UFC/g de solo) (Anexo A 3 e A 4).

Na comparação do número de *Pseudomonas* nos diferentes estádios fenológicos do algodão convencional cultivado em solo ITA, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre todas as fases do ciclo da cultura, exceto entre as fases de florescimento e abertura da maçã (coletas 3 e 4). Para o cultivo do algodão transgênico em solo ITA, foi observada evidência ($p < 0,05$) de diferença no número de UFC/g de solo entre todas as fases do ciclo da cultura, exceto entre as fases estabelecimento e abertura da maçã, e entre as fases de florescimento e abertura da maçã (Anexo C).

No cultivo de algodão convencional em solo SSE, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre todas as fases do ciclo da cultura, exceto entre as fases de formação do botão floral e florescimento, e as fases de e florescimento e abertura da maçã (coletas 3 e 4). Para o cultivo do algodão transgênico em solo SSE, foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) no número de UFC/g de solo entre todas as fases do ciclo da cultura, exceto entre a primeira e a terceira coleta (Anexo C).

5.2 Diversidade de *Pseudomonas* sp. cultiváveis na rizosfera de algodão Bt e não- Bt

No isolamento em meio KB, foram isolados cerca de 15 linhagens por tratamento, em cada fase do ciclo da cultura. Alguns destes isolados foram identificados por meio do perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME), demonstrando conforme o esperado do isolamento seletivo, predominância do gênero *Pseudomonas*.

Dos isolados identificados, a espécie *Pseudomonas putida* foi a predominante, sendo obtida da rizosfera do algodão Bt e algodão não-Bt (convencional) em ambos os solos, exceto para o algodão convencional em solo ITA (CITA). Este tratamento (CITA), foi o único onde foi verificada maior ocorrência de outros gêneros em relação a *Pseudomonas* (Figura 7), entre os quais, a espécie *Rothia dentocariosa* foi predominante.

A espécie *Pseudomonas fluorescens* por sua vez, foi encontrada exclusivamente na rizosfera do algodão convencional, em ambos os solos. Em solo SSE (franco-argiloarenoso), as espécies *P. mendocina*, *P. stutzeri* e *P. syringae* também só foram observadas na rizosfera do algodão convencional. A espécie *P. aeruginosa* esteve mais presente nas amostras de rizosfera do solo ITA (argiloarenoso) (Figura 7).

Observa-se uma semelhança na diversidade de espécies dos tratamentos transgênicos nos diferentes solos (SSE e ITA), sendo comumente encontradas *P. aeruginosa* e *P. putida* (Figura 7), no entanto, em frequências diferentes.

Em solo SSE, foi observado maior riqueza de espécies de *Pseudomonas* na rizosfera do algodão convencional do que na rizosfera do algodão transgênico. Em relação ao tipo de solo, SSE apresentou maior diversidade de espécies do que o solo ITA.

Entre outros gêneros identificados, de isolados em meio KB temos: *Rothia* sp.,

Rhizobium radiobacter, *Paucimonas lemoigui*, *Ralstonia picketti* e *Vibrio* sp. observados em amostras de solo rizosférico de algodão convencional (CSSE); em amostras de solo rizosférico de algodão Bt (TSSE) foram identificados *Morganella morganii*, *Sphingobacterium* sp., *Burkholderia cepacia*, *Variovorax paradoxus*, *Flavobacterium johnsoniae* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Em solo ITA foram identificados: *Stenotrophomonas maltophilia* para amostras de algodão convencional (CITA) e *Sphingobacterium* sp. e *Rhizobium radiobacter* em amostras de algodão Bt (TITA).

Figura 7. Porcentagem de espécies de *Pseudomonas* isoladas em meio KB da rizosfera de algodão transgênico e algodão convencional em dois tipos de solo. Tratamentos: CSSE- algodão convencional em solo SSE; TSSE- algodão transgênico em solo SSE; CITA- algodão convencional em solo ITA; TITA- algodão transgênico em solo ITA.

5.3 Estudo “in vitro” do efeito do algodão Bt sobre a colonização de raízes por *Pseudomonas fluorescens*

A linhagem de *Pseudomonas fluorescens*, selecionada para a realização deste estudo por ter sido isolada apenas da rizosfera de algodão convencional (Figura 7), demonstrou capacidade para colonizar raízes de algodão transgênico (Figuras 8, 9 e 10) e algodão convencional (Figura 11).

A microscopia eletrônica de varredura permitiu a observação desta linhagem por toda a superfície da raiz, inclusive na coifa (Figuras 9 e 10), demonstrando efetividade desta linhagem na colonização radicular. Colônias de *Pseudomonas fluorescens* foram encontradas especialmente em zonas de crescimento radicular, nervuras e regiões lesionadas, caracterizadas por abundância de mucilagens e nutrientes.

Figura 8. Colonização da região superior da raiz de algodão Bt por *P. fluorescens*. A seta indica a região em alta magnificação.

Figura 9. *P. fluorescens* colonizando a superfície (A) e região lesionada (B) da coifa da raiz de algodão Bt.

Figura 10. Região da coifa da raiz de algodão Bt abundantemente colonizada por *P. fluorescens*. A seta indica a região em alta magnificação.

Figura 11. Colonização da raiz de algodão convencional por *Pseudomonas fluorescens*. A seta indica a região em alta magnificação.

5.4 Determinação da atividade microbiana no solo por hidrólise de FDA (diacetato de fluoresceína)

A atividade microbiana na rizosfera de algodão Bt e algodão convencional apresentou flutuações durante as fases de desenvolvimento da cultura (estabelecimento, formação dos botões florais, florescimento e abertura da maçã), sendo esta variação diferenciada para os tipos de solo avaliados (Anexo D). De modo geral, em solo SSE (franco-argiloarenoso) foi observada maior atividade microbiana do que em solo ITA (argiloarenoso), sendo esta diferença significativa ($p \leq 0,001$) em todas as fases do ciclo da cultura do algodão convencional, exceto na fase de florescimento. No cultivo do algodão transgênico, também foi observada esta diferença ($p \leq 0,001$) entre os solos, nos níveis de atividade microbiana, nas fases de formação do botão floral e abertura das maçãs (Anexo A5 e A6).

Diferenças na atividade microbiana entre amostras de rizosfera de algodão transgênico e de convencional foram observadas apenas no solo SSE (Figura 13).

No solo de Itapira (ITA) não foi observada diferença na atividade microbiana entre solo rizosférico de algodão transgênico e solo rizosférico de algodão isogênico convencional, havendo diminuição significativa ($p < 0,01$) durante a segunda coleta (fase de formação dos botões florais) da atividade microbiana para ambas as culturas (Figura 12 e Anexo D).

A atividade microbiana na primeira coleta (fase de estabelecimento da planta de algodão) da amostra do solo SSE de algodão convencional foi de $1,83 \mu\text{g}$ de FDA hidrolisado.g de solo $\text{seco}^{-1}.\text{min}$, sendo significativamente superior a observada para o cultivo de algodão transgênico ($1,31 \mu\text{g}$ de FDA hidrolisado.g de solo $^{-1}.\text{min}$). No entanto, durante a segunda e quarta coletas, foram observadas quantidades de FDA hidrolisado. g de solo seco. min^{-1} significativamente superiores para as amostras de solo do algodão transgênico (2,48 e 2,43) em relação ao algodão isogênico convencional (1,91 e 1,87) (Figura 13).

Apenas na terceira coleta, em solo SSE, a atividade microbiana detectada pela hidrólise de FDA não diferiu para amostras de solo de algodão transgênico e convencional (Figura 13), sendo ainda observada uma diminuição significativa ($p < 0,01$) na atividade microbiana, nesta fase do ciclo da cultura, para ambas as plantas, exceto em relação à fase de estabelecimento do algodão transgênico (Anexo D).

Figura 12. Atividade microbiana (FDA) em solo rizosférico argiloarenoso (ITA) de algodão transgênico e convencional nas quatro fases do ciclo da cultura (coleta).

Figura 13. Atividade microbiana (FDA) de solo rizosférico franco-argiloarenoso (SSE) de algodão transgênico e convencional nas quatro fases do ciclo da cultura (coleta). ** $p < 0,05$

5.5 Monitoramento da toxina Cry1Ac na rizosfera de algodão Bollgard® (algodão Bt)

5.5.1 Detecção da toxina Cry1Ac na rizosfera de algodão Bt

No teste qualitativo, a proteína Cry1Ac não foi detectada na primeira coleta (estabelecimento do algodão) em amostras de rizosfera de algodão Bt. No entanto, na segunda (Figura 14), terceira e quarta coletas, com a otimização do método, foi possível constatar a presença da proteína Cry1Ac em amostras de solo rizosférico (ITA e SSE) cultivado com a planta de algodão Bt. Na rizosfera de algodão convencional (não Bt) não foi detectada a presença da toxina Cry1Ac, conforme o esperado.

Figura 14. Resultado do teste de detecção da toxina Cry1Ac em amostras de solo rizosférico de algodão em fase de formação de botão floral (2ª coleta): A) C2SSE: amostra de solo SSE de algodão não-Bt (controle); B e C) T2SSE: amostras de solo SSE de algodão Bt; D e E) T2ITA: amostras de solo ITA de algodão Bt; F) C2ITA: amostra de solo ITA de algodão não-Bt (controle). A seta preta indica a linha controle e a seta vermelha indica a linha teste (avermelhada para amostras positivas: B,C, D e E).

5.5.2 Quantificação da toxina Cry1Ac na rizosfera do algodão Bt

Os procedimentos de extração e a quantificação da proteína Cry1Ac por ELISA permitiram a recuperação parcial da proteína nas amostras de rizosfera. De acordo com o ensaio realizado, foi verificado que em solo franco-argiloarenoso (SSE), a recuperação foi de apenas 19,23% da proteína adicionada (1,3 ng/g de solo). Para o solo argiloarenoso (ITA), a recuperação foi de 12,58% da proteína adicionada.

Os resultados da quantificação da proteína exsudada e/ou liberada pelo algodão Bt, nos diferentes estádios de desenvolvimento da planta, e em dois tipos de solo, demonstram níveis significativamente maiores de proteína recuperada em solo SSE, em relação ao solo ITA, em todos os estádios de desenvolvimento da planta (Figura 15). No entanto, apesar da diferença de quantidade, a proteína Cry1Ac apresenta comportamento similar nos solos utilizados, até a fase de florescimento da planta (coleta 3). Após este estágio, verifica-se um aumento significativo ($p < 0,01$) nos níveis de proteína em solo rizosférico SSE (Tabela 3) e um declínio não significativo da mesma (Tabela 4) em solo rizosférico ITA (Figura 15).

Figura 15. Comparação dos níveis de proteína Cry1Ac detectados em solo rizosférico SSE (círculo preenchido) e em solo rizosférico ITA (círculo vazio), em diferentes estádios de desenvolvimento (coleta) do algodão Bt. ● $p < 0,01$ e ● $p < 0,0001$.

Em relação ao estágio de desenvolvimento da planta, em solo SSE, foi verificado um aumento significativo ($p < 0,01$) nos níveis de proteína Cry1Ac na rizosfera de algodão Bt em fase de abertura da maçã (coleta 4), quando comparado aos níveis de proteína detectada nos demais estágios fenológicos (Tabela 3). Neste solo, a média dos valores de proteína detectada nos diferentes estádios fenológicos, variaram de 0,21 a 0,42 ng/g de solo (concentração total estimada de 1,1 a 2,2 ng/g de solo). Em solo ITA, não foi observada evidência de diferença nos níveis de proteína entre os estádios de desenvolvimento da planta, no entanto, o maior nível de proteína detectada neste solo (0,1 ng/g de solo, sendo estimado 0,76 ng/g de solo no total) foi na fase de florescimento (coleta 3) do algodão Bt (Tabela 4). Em solo rizosférico cultivado com algodão convencional, não foi detectada a presença da proteína.

Tabela 3. Concentração de proteína Cry1Ac na rizosfera de algodão Bt, em diferentes estádios de desenvolvimento da planta, em solo SSE.

Coleta	Proteína Cry1Ac (ng/g de solo) *	Concentração Total Estimada de Proteína Cry1Ac (ng/g de solo) **
1- Estabelecimento	0,24609 a	1,27973
2- Formação do botão floral	0,20893 a	1,08650
3- Florescimento	0,24889 a	1,29427
4- Abertura da maçã	0,42292 b	2,19929

Médias seguidas por letras diferentes diferem ao nível de 0,01 ($p < 0,01$) e médias seguidas pela mesma letra não diferem ao nível de 0,3 ($p > 0,3$) pelo teste T para contrastes. *Resultado da quantidade de proteína Cry recuperada em amostras de rizosfera de algodão Bt. ** Estimativa da concentração total de proteína Cry na rizosfera de algodão Bt, baseado no resultado do teste de recuperação (19,23%).

Tabela 4. Concentração de proteína Cry1Ac na rizosfera de algodão Bt, em diferentes estádios de desenvolvimento da planta, em solo ITA.

Coleta	Proteína Cry1Ac (ng/g de solo) *	Concentração Total Estimada de Proteína Cry1Ac (ng/g de solo) **
1- Estabelecimento	0,04181 a	0,33235
2- Formação do botão floral	0,03987 a	0,31693
3- Florescimento	0,09601 a	0,76320
4- Abertura da maçã	0,05383 a	0,42790

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 0,3 ($p>0,3$) pelo teste T. Concentração de proteína Cry detectada em amostras de rizosfera de algodão Bt. ** Estimativa da concentração total de proteína Cry na rizosfera de algodão Bt, baseado no teste de recuperação (12,58%).

5.6 Eletroforese em Gel por Gradiente de Desnaturação (DGGE)

Os procedimentos de extração de DNA e a amplificação dos fragmentos desejados permitiram a recuperação de amplicons com diferentes quantidades de GC, a partir do DNA extraído do solo rizosférico de algodão transgênico e convencional. Os padrões de DGGE dos fragmentos do gene bacteriano 16S rDNA das cinco replicatas por tratamento foram similares tanto para amostras de rizosfera de algodão transgênico quanto para as amostras de algodão convencional, em ambos os solos (SSE e ITA), nos diferentes estádios do ciclo da cultura. Além disso, verifica-se semelhança entre o perfil de bandas entre amostras de algodão transgênico e convencional. Algumas diferenças puderam ser verificadas entre os tratamentos (Figuras 16 a 21).

A análise de agrupamento hierárquico dos amplicons de rDNA 16S Universal a partir de DGGE mostra que as repetições de cada tratamento das amostras analisadas do solo SSE são similares. As amostras de planta transgênica e convencional são mais similares para as coletas 1 e 2. A estrutura da comunidade bacteriana na fase de estabelecimento do algodão (coleta 1) difere das outras fases do ciclo da cultura (coletas), no solo SSE, conforme observado pelo perfil de bandas e analisado por correlação de Pearson (Figura 16).

O mesmo padrão é verificado para o solo ITA, onde o agrupamento dos perfis de DGGE também demonstra que as repetições de cada tratamento das amostras analisadas são similares. Neste solo é evidente a separação das amostras por estágio de desenvolvimento da planta. Ainda pode ser observada a presença de três bandas mais intensas nas amostras de algodão convencional quando comparadas as bandas presentes nas amostras de algodão Bt, na segunda coleta. Como para o solo SSE, a coleta 1 (fase de estabelecimento do algodão) difere das demais coletas, apresentando menos de 10% de similaridade (Figura 17).

Figura 16. Agrupamento hierárquico com base na separação dos amplicons do 16S Universal por DGGE. As amostras de rizosfera de algodão transgênico e convencional foram coletadas em quatro fases do ciclo da cultura, em solo SSE. As amostras transgênicas são indicadas pela letra T e as convencionais pela letra C, o número seguinte se refere à coleta, seguidas pelo tipo de solo (SSE) e número da repetição.

Figura 17. Dendrograma com base na separação dos amplicons do 16S Universal por DGGE. As amostras de rizosfera de algodão transgênico e convencional foram coletadas em quatro fases do ciclo da cultura, em solo ITA. As amostras transgênicas são indicadas pela letra T e as convencionais pela letra C, o número seguinte se refere à coleta, seguidas pelo tipo de solo (ITA) e número da repetição. As setas indicam a presença de bandas mais intensas em amostras de rizosfera do algodão convencional do que do algodão Bt.

A análise de agrupamento hierárquico dos amplicons de rDNA 16S - *Pseudomonas* a partir de DGGE demonstra pequena variabilidade entre as repetições de cada tratamento das amostras analisadas do solo SSE, exceto para a coleta 2 que apresentou maior uniformidade entre as repetições. As amostras de planta transgênica e convencional se assemelham especialmente para as coletas 3 e 4 (Figura 18).

Figura 18. Agrupamento hierárquico com base na separação dos amplicons do 16S de *Pseudomonas* por DGGE. As amostras de rizosfera de algodão transgênico e convencional foram coletadas em quatro fases do ciclo da cultura, em solo SSE. As amostras transgênicas são indicadas pela letra T e as convencionais pela letra C, o número seguinte se refere à coleta, seguidas pelo tipo de solo (SSE) e número da repetição.

Em solo ITA, os perfis do DGGE dos fragmentos do 16S de *Pseudomonas* se dividiram em quatro grupos principais, que correspondem às quatro fases do ciclo da cultura do algodão analisadas. Foi observada pequena variabilidade entre as repetições de cada tratamento, exceto para a coleta 2 e 4 que apresentaram maior semelhança entre as repetições (Figura 19). A similaridade entre amostras de planta transgênica e convencional em cada coleta pode ser mais bem observada pela análise multivariada (Figura 21).

Figura 19. Agrupamento hierárquico com base na separação dos amplicons do 16S de *Pseudomonas* por DGGE. As amostras de rizosfera de algodão transgênico e convencional foram coletadas em quatro fases do ciclo da cultura, em solo ITA. As amostras transgênicas são indicadas pela letra T e as convencionais pela letra C, o número seguinte se refere à coleta, seguidas pelo tipo de solo (ITA) e número da repetição.

De acordo com a Análise de Correspondência Canônica (CCA), as correlações entre os fatores ambientais e os perfis de DGGE – 16S Universal obtidos indicam maior efeito do estágio de desenvolvimento da planta na estrutura da comunidade bacteriana (Anexo E). Numa segunda análise, as amostras foram separadas por coleta, permitindo melhor observação da distribuição da comunidade bacteriana em cada estágio de desenvolvimento da planta (Figuras 20 e 21).

Na CCA (DGGE – 16S Universal) da primeira coleta observou-se uma tendência para efeito de planta transgênica na estrutura da comunidade bacteriana, não significativo (Figura 20 A). Ainda pode ser observado que a comunidade bacteriana de amostras de planta convencional em solo SSE se distingue dos demais tratamentos.

Na segunda coleta, a CCA (DGGE – 16S Universal) demonstra efeito significativo ($p < 0,05$) da transgenese na estrutura da comunidade bacteriana, em ITA, como pode ser observado no eixo y. Também pode ser observada a separação das amostras no eixo x, indicando diferença significativa para a diversidade de espécies entre os solos (Figura 20 B). Na fase de florescimento do algodão (coleta 3), observa-se um pequeno efeito (não significativo) do algodão transgênico (Bt) na estrutura da comunidade bacteriana, em solo ITA. Nesta coleta, também ocorre a separação das amostras apenas por tipo de solo ($p < 0,05$), no eixo x (Figura 20 C). Na quarta coleta, a estratificação das amostras é semelhante à segunda coleta, no entanto, não há efeito significativo do tipo de planta (transgênica e convencional) na estrutura da comunidade bacteriana (Figura 20 D).

Na CCA das bandas dos perfis de PCR-DGGE específico para o grupo *Pseudomonas* com os fatores ambientais, foi verificado efeito significativo ($p < 0,05$) do algodão Bt no grupo *Pseudomonas* na primeira coleta, em solo SSE (Figura 21 A). Nas demais fases de desenvolvimento da cultura não foram observadas diferenças significativas para populações de *Pseudomonas* de algodão Bt e algodão não-Bt, ocorrendo separação das amostras por tipo de solo na segunda e terceira coletas (Figura 21 B à D).

Figura 20. Análises de correspondência canônica (CCA) da estrutura de comunidades de bactérias associadas à rizosfera de algodão Bt (TR) e algodão não-Bt (NT) em dois tipos de solos (SSE e ITA). (A) 1ª Coleta: fase de estabelecimento do algodão; (B) 2ª Coleta: formação do botão floral e flores; (C) 3ª Coleta: florescimento e formação da maçã; (D) 4ª Coleta: abertura do capulho. Os gráficos foram gerados a partir da análise de correlação canônica dos perfis de DGGE-16S Universal, comparando os diferentes fatores que determinam a composição da comunidade bacteriana. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos. As variáveis ambientais indicadas com * foram significantes ($p < 0,05$) utilizando o teste de permutação de MonteCarlo.

Figura 21. Análises de correspondência canônica (CCA) da estrutura das populações de *Pseudomonas* associadas à rizosfera de algodão Bt (TR) e algodão não-Bt (NT) em dois tipos de solos (SSE e ITA). (A) 1ª Coleta: fase de estabelecimento do algodão; (B) 2ª Coleta: formação do botão floral e flores; (C) 3ª Coleta: florescimento e formação da maçã; (D) 4ª Coleta: abertura do capulho. Os gráficos foram gerados a partir da CCA dos perfis de DGGE-*Pseudomonas*, comparando os diferentes fatores que determinam a composição dessas populações. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos. As variáveis ambientais indicadas com * foram significantes ($p < 0,05$) utilizando o teste de permutação de MonteCarlo.

Conforme apontado pela análise de CCA a partir do perfil do DGGE-*Pseudomonas*, na primeira coleta (fase de estabelecimento do algodão) existem diferenças nos padrões de bandas obtidos de amostras de rizosfera do algodão Bt e do algodão convencional (Figura 22).

Figura 22. DGGE 16S-*Pseudomonas* de DNA extraído de amostras de rizosfera de algodão transgênico (Bt) e algodão convencional (não-Bt) na fase de estabelecimento do algodão (coleta1), em dois tipos de solo (SSE e ITA). Tratamentos: C1SSE (algodão convencional em solo SSE); T1SSE (algodão transgênico em solo SSE); C1ITA (algodão convencional em solo ITA); T1ITA (algodão transgênico em solo ITA). As setas indicam as bandas eluídas selecionadas para seqüenciamento, sendo que as setas vermelhas correspondem às diferenças observadas entre amostras de plantas transgênica e convencional. M=marcador, MPS=marcador com espécies de *Pseudomonas*.

As bandas PSC2 e PSC3, exclusivas das amostras de algodão convencional em solo SSE, na primeira coleta, foram identificadas pelo seqüenciamento como *Xanthomonaceae* não cultivável e *Legionella anisa*, com valores de 93% e 96% de similaridade, respectivamente. Apesar da baixa similaridade na identificação, esse resultado permite inferir que o primer utilizado, especificamente para *Pseudomonas* spp., também seleciona outros grupos de γ - Proteobacteria. O mesmo foi observado para a banda PST2, exclusiva das amostras de algodão transgênico em solo SSE, na primeira coleta, identificada pelo seqüenciamento como *Pseudoxanthomonas daejeonensis* (96%). Em solo ITA, outra banda (PTI4) correspondente a esta bactéria, ocorreu em maior freqüência nas amostras de algodão transgênico do que nas amostras de algodão convencional (Tabela 4). Com isso, as

diferenças observadas para amostras de algodão Bt e não-Bt, na primeira coleta, pelo DGGE, podem estar relacionadas a outros grupos (gêneros) de γ - Proteobacteria (Figuras 22 e 23).

O perfil do DGGE-*Pseudomonas* (Figura 20), na primeira coleta, demonstra predominância de uma banda nas amostras, correspondente aos códigos PSC1, PST1, MPR1 e PCI3.2 sendo estas identificadas pelo sequenciamento como *Pseudomonas stutzeri*, *P. nitroreducens*; *P. nitroreducens* e *P. nitroreducens* (92,68%, 95%, 98% e 99% respectivamente) (Tabela 4). A filogenia destas bandas (Figura 23) demonstra que PSC1 e PST1 pertencem a espécies diferentes, apesar de estarem alinhadas no gel (Figura 22). No entanto, apesar da similaridade das bandas PST1 e MPR1 (Figura 23 e Tabela 4), a identificação não corresponde à realizada para o marcador MPR1 por FAME, que identifica a bactéria como *Pseudomonas aeruginosa*. Este resultado pode estar relacionado à baixa similaridade das sequências obtidas com o banco de dados, ou ainda, a semelhança no padrão de migração de bandas no DGGE.

Em solo ITA, a banda correspondente ao código PTI2.3 está presente em praticamente todas as repetições do algodão transgênico, sendo portanto, predominante nesta cultura, em relação ao algodão *convencional*. Esta banda foi identificada pelo sequenciamento como *Cellvibrio japonicus* (92,56%) (Tabela 4).

Tabela 5. Resultado da análise das sequências de bandas eluídas do DGGE-*Pseudomonas*

Código da Banda do DGGE	Tratamento*	Correspondência máxima a sequência da bactéria
PSC1	C1SSE-2	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (AJ544240, 92,68%)
PSC2	C1SSE-1	Uncultured Xanthomonadaceae (EF020306.1, 93%)
PSC3	C1SSE-5	<i>Legionella anisa</i> (AY744776, 96%)
PST1	T1SSE-3	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> (EF107515, 95%)
PST2	T1SSE-4	<i>Pseudoxanthomonas daejeonensis</i> (AY550264, 96%)
PCI3.2	C1ITA-1	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> (EF107515, 99%)
PTI3.1	T1ITA-2	<i>Cellvibrio fibrivorans</i> (91,26%)
PTI4	T1ITA-1	<i>Pseudoxanthomonas daejeonensis</i> (AY550264, 97%)
PTI2.3	T1ITA-3	<i>Cellvibrio japonicus</i> (92,56%)
MPR1	Marcador	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> (EF107515, 98%)
MPR2	Marcador	<i>Pseudomonas putida</i> (99,5%)
MPR3	Marcador	<i>Pseudomonas putida</i> (98,98%)

* Amostras: C1SSE (algodão convencional em solo SSE); T1SSE (algodão transgênico em solo SSE); C1ITA (algodão convencional em solo ITA); T1ITA (algodão transgênico em solo ITA). Os números indicam a repetição de cada tratamento.

Figura 23. Dendograma com base em sequências de 16S rDNA, mostrando a relação entre bandas eluídas do DGGE para *Pseudomonas* e sequências presentes no GenBank. A barra indica a distância em nucleotídeos substituídos.

6 DISCUSSÃO

O solo rizosférico representa uma região de intensa atividade microbiana devido à liberação de exsudados pelas raízes das plantas (BOWEN; ROVIRA, 1999; BATTISTA-LEBOUEF et al., 2003). Estudos mostram que diferentes espécies de plantas apresentam variações quantitativas e qualitativas na exsudação (SCHILLING et al., 1998; MORSE et al., 2000; WHIPPIS, 1987). A composição dos exsudados da raiz da planta exerce grande influência na diversidade dos microrganismos que estão associados à planta (JAEGER et al., 1999).

Desta maneira, a transgenese, e particularmente a liberação da proteína Cry nos exsudados de plantas Bt, devem ser considerados como um potencial fator determinante da comunidade bacteriana associada à planta. A interação microrganismo-planta em diferentes estádios fenológicos e tipos de solos também deve ser amplamente considerada, dadas diferenças no comportamento dos produtos da transgenese sobre estes fatores.

Dentre os dois tipos de solos (argiloarenoso - ITA e franco-argiloarenoso - SSE), utilizados neste estudo, apenas no SSE, foi observada diferença significativa na densidade bacteriana e na atividade microbiana entre amostras de algodão Bt e algodão convencional. Este fato pode estar relacionado à maior adsorção da proteína Cry às partículas do solo argiloarenoso, tornando-se de difícil acesso à degradação microbiana. Segundo Palm (1996), a biodegradação de toxinas Bt é reduzida em solos ácidos e com alto teor de argila, onde a mesma permanece detectável durante meses.

Os estudos realizados demonstraram diferenças no número de bactérias associadas às raízes da planta de algodão Bt e do algodão não-Bt apenas nos estádios iniciais de desenvolvimento da cultura (Figuras 4 e 6). Na rizosfera do algodão Bt foram observadas maiores densidades de *Pseudomonas* spp. e bactérias totais nas fases de estabelecimento e formação do botão floral, respectivamente, em relação ao algodão convencional. Dessa forma, a planta transgênica estaria estimulando o crescimento de alguns grupos bacterianos da rizosfera, nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta. Podemos supor que, se bactérias proteolíticas específicas degradarem a proteína Cry1Ac, o aumento dessa proteína no solo poderia, conseqüentemente, estimular o crescimento destas, alterando o equilíbrio da comunidade bacteriana na rizosfera. Em estudo com a proteína Cry1Ac purificada, bactérias isoladas do solo e da rizosfera de algodoeiro demonstraram potencial para degradação da proteína Cry1Ac, em meio mínimo JE (AVILA et al., 2007). No entanto, no presente estudo não foi observada correlação entre os níveis de proteína exsudada pela planta e o número de bactérias. Pois, apesar de detectada a presença da proteína na rizosfera de algodão Bt em todo o ciclo da cultura, só foi verificado um aumento significativo nos níveis de proteína Cry1Ac no estágio final de desenvolvimento da planta (Tabela 3).

Sendo assim, a toxina Bt pode não ser o principal fator a influenciar a microbiota da rizosfera. Donegan et al. (1995), verificaram que a adição da toxina B.t.k purificada (HD-1 ou HD-73) no solo, não causou nenhum efeito sobre bactérias aeróbicas do solo, fungos e protozoários. Em contraste, a adição de tecidos das variedades 247 e 249 de plantas de algodão transgênico que produzem a toxina B.t.k, freqüentemente causou estimulação de bactérias aeróbias e populações fúngicas. Estes autores sugerem que a manipulação genética e a cultura de tecidos de plantas transgênicas podem produzir mudanças nas características das plantas, que excede a produção da toxina Cry, de forma a influenciar o crescimento e a composição de espécies microbianas do solo. Saxena e Stotzki (2001) verificaram que a biomassa de milho Bt tem um alto conteúdo de lignina em relação à variedade convencional.

O aumento do número de *Pseudomonas* spp. na rizosfera do algodão Bt (Bollgard®), observado logo no primeiro estágio de desenvolvimento da planta (Figura 6), pode estar relacionado à versatilidade nutricional deste grupo e a sua capacidade em degradar compostos orgânicos simples e complexos, conforme descrito na literatura (LATOURET; LEMANCEAU, 1997). Dessa forma, as *Pseudomonas* estariam sendo favorecidas na rizosfera do algodão Bt, possivelmente por sua capacidade hipotética em degradar a proteína Cry e/ou outros metabólitos exsudados exclusivamente pelo algodão Bt. Isso também explica o efeito do algodão Bt no número de bactérias totais (heterotróficas) ser observado apenas no estágio seguinte de desenvolvimento da planta (Figura 4), onde outros grupos bacterianos estariam se adaptando, mais lentamente, ao nicho da rizosfera da planta transgênica e utilizando os produtos diretos e indiretos da transgenese como fonte de carbono e nitrogênio.

Outros estudos também relatam o aumento na densidade microbiana em solo cultivado com planta transgênica em relação à planta convencional (DONEGAN et al., 1995; WEI et al., 2006). No entanto, em estudos realizados com milho Bt, não foram encontradas mudanças no número de bactérias aeróbias cultiváveis ou fungos, apesar da presença da proteína Cry nos exsudados radiculares e tecidos da planta (SAXENA; STOTZKY, 2001; VILLANY et al. 2004). Já em um estudo com a variedade NuCOTN99^B de algodão Bt, foi encontrado maior número de bactérias na rizosfera do algodão não-Bt (convencional) do que na rizosfera de algodão Bt (RUI et al., 2005), assim como observado neste estudo, em solo ITA, na fase de estabelecimento do algodão (Figura 3). Os autores também não verificaram correlação entre os níveis de toxina e o número de bactérias funcionais, confirmando os resultados obtidos neste estudo. Estes estudos demonstram a heterogeneidade de respostas da microbiota do solo ao cultivo de plantas transgênicas e enfatizam a importância de se investigar cada evento de transformação. Contudo, essa variedade de resultados também pode estar relacionada à influência de outros fatores na

interação do microrganismo com a planta, pois conforme observado neste estudo, o efeito da transgenese varia de acordo com o tipo de solo e da idade da planta, destacando a necessidade de monitoramento em diferentes fases do ciclo da cultura e em diferentes solos.

No presente estudo, algumas diferenças puderam ser observadas na diversidade de *Pseudomonas* cultivadas, da rizosfera do algodão Bt e do algodão convencional (Figura 6). A espécie *P. fluorescens*, conhecida pelo potencial de promoção de crescimento de plantas e supressão de doenças (KLOEPPER et al., 1986; RAAIJMAKERS et al., 1996), foi observada apenas em amostras de algodão convencional (Figura 7). No entanto, em estudo “in vitro” um isolado de *P. fluorescens* biotipo A (C2S1-1) demonstrou capacidade em colonizar a rizosfera do algodão Bt, sendo observado por toda a raiz da planta (Figuras 8 a 10). Sendo assim, a ausência desta espécie entre os isolados da rizosfera de algodão Bt (Figura 7) pode estar relacionada à menor capacidade competitiva em relação a outras espécies deste nicho. As espécies *P. mendocina*, *P. stutzeri* e *P. syringae* também foram observadas somente na rizosfera de algodão convencional, em solo SSE (Figura 7).

Milling et al., (2004) observaram que plantas de batata geneticamente modificadas, expressando o gene *gbss* (*granule bound starch synthase gene*), responsável por um dos passos da síntese de amido, também apresentam uma diferente população de *Pseudomonas* na rizosfera.

A atividade microbiana também foi maior ($p < 0,05$) no solo de rizosfera de algodão Bt do que no solo de rizosfera do algodão convencional, nas fases de formação do botão floral e abertura dos capulhos, em solo SSE (Figura 12 e 13). Villany et al. (2004) também encontraram maior atividade microbiana por hidrólise de FDA, na rizosfera de milho Bt em relação à variedade parental.

Wei et al., (2006) em seus estudos, observaram em solos cultivados com mamão transgênico (resistente a vírus) aumentos significativos de atividades enzimáticas de arilsulfatases, fosfatases alcalinas, invertases, fosfodiesterases, do que no solo cultivado com mamão convencional. No entanto, para as enzimas proteases, polifenoloxidasas e ureases, foram verificados maiores níveis em solo cultivado com mamão convencional.

Os resultados da análise de atividade microbiana por hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) apontam para uma provável correlação da dinâmica da comunidade microbiana com a presença da proteína Cry, pois o aumento ou diminuição da atividade microbiana, na maioria das vezes, acompanha os níveis de proteína Cry, em ambos os solos (Figuras 12, 13 e 15). Em solo ITA, não foi observada evidência de diferença na atividade microbiana na rizosfera de algodão Bt e algodão convencional, provavelmente pelas características físico-químicas deste solo, que podem estar mascarando os possíveis efeitos da proteína Cry na atividade da comunidade microbiana, já que neste tipo de solo a

proteína Cry, encontra-se menos disponível à degradação microbiana (PALM et al., 1996). Davere et al. (2004), não observaram alterações significativas na atividade da comunidade bacteriana associada ao milho Bt (gene *cry3Bb*), em relação a variedade isogênica (não-Bt), conforme os resultados obtidos em solo ITA.

A quantificação da proteína Cry1Ac na rizosfera do algodão Bt (ELISA), demonstrou um aumento significativo ($p < 0,01$) e/ou acúmulo desta proteína na fase de abertura da maçã, em solo SSE (Tabela 3). Acredita-se que no estágio de senescência da planta, a expressão da proteína Cry seja menor, ocorrendo portanto, menor exsudação da mesma. Sendo assim, a maior quantidade de proteína observada ao final do ciclo da cultura, não está relacionada à expressão do gene *cry*. Alguns estudos mostraram que a expressão da toxina Cry1Ac foi variável entre partes da planta de algodão Bt e que a expressão da toxina Cry e níveis de mortalidade de lagartas (*Heliothis armigera*) diminuíram consistentemente com a idade da planta (ADAMCZYK e SUMERFORD, 2001; GORE et al., 2001). Dessa forma, este aumento dos níveis de proteína Cry na rizosfera ao final do ciclo da cultura, provavelmente deve-se a um acúmulo de proteína exsudada e não degradada pela microbiota, e principalmente à incorporação de tecidos vegetais ao solo devido ao estado de senescência da planta. Com isso, a maior quantidade de proteína disponível pode ter aumentado a atividade microbiana no estágio de abertura da maçã, em que há pouca exsudação e disponibilização de nutrientes pela planta. Um estudo com solo esterilizado e a proteína Cry1Ac indicou que a proteína Cry pode ser degradada por atividade microbiana (PALM et al., 1996).

Quando comparado os níveis de proteína detectada nos dois solos (SSE e ITA), foram observados maiores níveis de proteína Cry em solo SSE, em todos os estágios de desenvolvimento da planta. Este fato também pode ser explicado pelas características físico-químicas dos solos, ou seja, a proteína Cry estaria mais adsorvida às partículas do solo ITA, dificultando assim sua recuperação. No entanto, apesar da diferença nos níveis de proteína detectada nos solos utilizados, pode-se observar que a proteína apresenta comportamento similar em ambos os solos, até a fase de florescimento da planta, a partir de então, verifica-se um aumento significativo na concentração de proteína em solo SSE, não observado em solo ITA (Figura 15).

Ainda que detectada na rizosfera até o final do ciclo da cultura do algodão Bt em condições controladas, segundo alguns autores, a proteína Cry pode ser rapidamente degradada ou inativada após a colheita em condições de campo, tendo sua persistência no solo diminuída em campo arado (SIMS; REAM, 1997; YUNHE et al., 2007).

Em relação aos métodos utilizados para detecção e quantificação da proteína Cry1Ac na rizosfera, ambos permitiram a detecção da proteína. No entanto, no método qualitativo, a proteína só foi detectada a partir da segunda coleta, em função da otimização

do método a partir desta etapa. No método quantitativo, apesar de baixas, as porcentagens de proteína recuperada dos dois tipos de solos utilizados neste estudo (12,58% em ITA e 19,29% em SSE) estão próximas àquela descrita na literatura (~37%) (BAUMGRATE; TEBBE, 2005). Estudos em laboratório com algodão Bt (proteína Cry1Ab e Cry1Ac) e com a proteína purificada mostraram que a porcentagem de recuperação da proteína do solo, depende do tipo de solo e da concentração da toxina no solo (PALM et al., 1994, 1996; TAPP; STOTZKY, 1998).

A análise de agrupamento hierárquico e a análise de correspondência canônica (CCA) dos padrões do DGGE (primers para 16S Universal e primers específicos para *Pseudomonas*) foram utilizadas para detectar diferenças na estrutura da comunidade bacteriana de algodão Bt e não-Bt, em diferentes fases de desenvolvimento e diferentes tipos de solo. Estas análises permitiram inferir que a estrutura da comunidade bacteriana foi mais influenciada pela idade da planta (Figuras 16 à 19). Em outros estudos com técnicas independentes de cultivo, para avaliar efeito de outros transgênicos, foram encontrados resultados similares em relação ao efeito da idade da planta na composição da comunidade bacteriana (SMALLA et al., 2001; SCHMALENBERGER; TEBBE, 2002; BRUSETTI et al., 2004; BAUMGARTE; TEBBE, 2005; GRIFFITHS et al., 2007, ANDREOTE, 2007).

Baumgarte e Tebbe (2005) sugerem que o efeito da proteína Cry na estrutura da comunidade bacteriana esteja sendo mascarado por outros fatores mais seletivos, como a idade da planta e heterogeneidade de campo. No presente estudo foi aplicada a CCA para cada estágio de desenvolvimento da planta, permitindo focar o possível efeito da planta transgênica em cada fase.

De acordo com a análise de correspondência canônica (CCA) dos perfis do DGGE - 16S Universal com os fatores ambientais é observado um pequeno efeito do algodão Bt na estrutura da comunidade bacteriana, em solo ITA, em todas as fases do ciclo da cultura. Porém, este efeito da planta transgênica é significativo apenas na fase de formação do botão floral e flores (Figura 20). Utilizando a técnica de DGGE, Castaldini et al. (2005) também detectaram diferenças na diversidade da comunidade bacteriana da rizosfera de plantas Bt e não-Bt, em estudo com a variedade 176 de milho transgênico. Da mesma forma, Andreote (2007), observou efeito do tabaco transgênico na estrutura da comunidade bacteriana do rizoplane e da rizosfera, sendo este efeito temporário, assim como no presente estudo (Figura 20).

Para o grupo *Pseudomonas*, a CCA também demonstra um efeito da planta Bt na estrutura da comunidade da rizosfera na fase de estabelecimento (Figura 21), em solo SSE, correspondendo aos resultados obtidos para a avaliação de densidade bacteriana (Figura 4 e 6). No entanto, de acordo com os resultados do seqüenciamento das bandas do DGGE-*Pseudomonas* (Tabela 4 e Figura 23), outros grupos de gamaproteobacteria também podem

ter sido influenciados pelo algodão transgênico, entre os quais a bactéria *Legionella anisa* e uma *Xanthomonaceae* não cultivável, que ocorreram exclusivamente na rizosfera de algodão convencional. Já as espécies *Cellvibrio japonicus* e *Pseudoxanthomonas daejeonensis* tiveram seu crescimento favorecido na rizosfera do algodão transgênico, sendo que *P. daejeonensis* ocorreu exclusivamente na planta Bt cultivada em solo SSE (Figuras 22, 23 e Tabela 4). Assim como no presente estudo, Heuer e Smalla (1999), também observaram o efeito da transgenese sobre composição da comunidade bacteriana. Os autores observaram que a batata GM para resistência a bactérias (gene da lisozima) produzia um aumento na colonização da filosfera das plantas por bactérias do grupo *Erwinia* e redução na colonização de *Agrobacterium* e de bactérias gram-positivas.

O efeito do algodão Bt na comunidade bacteriana total foi maior em solo ITA (Figura 20 B), enquanto a diversidade estrutural de *Pseudomonas* foi mais influenciada pelo algodão transgênico no solo SSE (Figura 21 A).

Os dois solos utilizados neste estudo possuem comunidades bacterianas diferentes, conforme a CCA (Figura 20 e 21). O efeito do tipo de solo na estrutura da comunidade bacteriana surge após o primeiro estágio de desenvolvimento da planta. Após este período, a influência do tipo de solo na composição da comunidade bacteriana é permanente (Figuras 20 e 21). Foi verificado que a transgenese apresenta um efeito na estrutura da comunidade bacteriana nos estádios de crescimento vegetativo, sendo assim, o solo foi um fator determinante para o restabelecimento dessa comunidade após este impacto.

Ridder-Duine et al. (2005) mostram em seus estudos que plantas que apresentam diferentes comunidades microbianas na rizosfera em condições de campo, desenvolveram comunidades similares quando crescidas no mesmo solo em casa-de-vegetação. No entanto, não verificaram nenhuma similaridade na rizosfera de plantas vindas do mesmo local, quando plantadas em solos diferentes. Esses autores sugerem que o solo contribui determinantemente para a diferença na composição da comunidade microbiana da rizosfera.

De acordo com os resultados apresentados, o tipo de solo e a idade da planta, também exercem influência na estrutura e na atividade da comunidade bacteriana da rizosfera, sendo muitas vezes observada maior amplitude de respostas das bactérias a estes fatores, do que à transgenese (Anexo A ao E). Estudos com batata transgênica que expressa o gene da T4 lisozima, têm mostrado que os parâmetros ambientais como cultivar, tipo de solo, mudanças climáticas sazonais e a idade da planta, podem ser mais determinantes na microbiota da rizosfera do que a transgenese (HEUER et al., 2002; BLACKWOOD; BUYER, 2004; LOTTMANN et al., 1999).

De modo geral, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que os efeitos da transgenese são influenciados pela idade da planta e pelo tipo de solo. Conforme descrito na literatura, a composição e a quantidade dos exsudados da planta varia entre

espécies e estágio de desenvolvimento da planta (JAEGER et al., 1999). Os exsudados radiculares têm um profundo efeito sobre a microbiota da rizosfera (SCHENCK, 1976). Dessa forma, os efeitos do algodão Bt na densidade e diversidade da comunidade bacteriana, observados nos estádios de crescimento vegetativo, podem estar relacionados à maior atividade radicular da planta durante estes estádios e, conseqüentemente, maior liberação de exsudados. Este efeito pode ter sido minimizado nos estádios seguintes de desenvolvimento da planta, em função da menor exsudação nestes estádios, e ainda pela maior influência do solo próximo à rizosfera na composição da comunidade bacteriana. Brusetti et al. (2004) demonstraram diferenças na estrutura das comunidades bacterianas do solo expostas a soluções radiculares provenientes de culturas hidropônicas de milho Bt (176) e milho não Bt, por meio da análise de componentes principais da ARISA.

Contudo, estes efeitos podem não estar relacionados somente à proteína Cry exsudada pela planta, pois os estádios fenológicos onde foram observadas alterações na comunidade bacteriana, não correspondem ao estágio onde foi observado maior nível de proteína. Dessa forma, provavelmente o efeito pleiotrópico da transgenese, seja o principal fator na determinação da estrutura da comunidade bacteriana. Entretanto, o maior nível de proteína Cry no final do ciclo da cultura pode ter estimulado a atividade microbiana neste estágio.

O presente estudo traz contribuições para a área de estudo de impactos de plantas geneticamente modificadas à microbiota do solo, por meio de informações sobre os efeitos do algodão Bollgard na comunidade bacteriana em diferentes estádios de crescimento da planta e o restabelecimento do ambiente da rizosfera a partir dos estádios de crescimento vegetativo. Neste trabalho, as alterações observadas na comunidade bacteriana da rizosfera podem ser atribuídas a efeitos diretos (toxina Cry) ou indiretos da transgenese (pleiotropia), ao contrário de outros trabalhos que, quando observados os efeitos da transgenese, os atribuem às condições de campo. Esta hipótese é excluída neste estudo, pois este foi realizado em condições controladas.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- O algodão Bt estimulou o crescimento de bactérias da rizosfera nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta, em solo SSE;
- O algodão Bollgard alterou a estrutura da comunidade bacteriana total em solo rizosférico ITA, na fase de formação do botão floral e flores;
- A análise de correspondência canônica dos perfis de DGGE permitiu detectar influência da idade da planta, do tipo de solo e da transgenese na estrutura da comunidade bacteriana;
- O grupo *Pseudomonas* sofre efeito indireto e temporário da transgenese na diversidade e densidade populacional, no estágio inicial de desenvolvimento do algodão;
- A atividade microbiana sofre flutuações ao longo do ciclo da cultura, tendo aumento dos níveis por efeito do algodão Bollgard nas fases de formação do botão floral/flores e abertura da maçã;
- A proteína Cry1Ac é exsudada pelo algodão Bollgard evento 531 em todos os estádios de desenvolvimento da cultura, podendo influenciar a comunidade bacteriana da rizosfera.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMCZYK, J. J.; SUMERFORD, D. V. Potencial factors impacting season-long expression of Cry1Ac in 13 commercial varieties of Bollgard ® cotton. **Journal of Insect Science**, v. 1, p. 13, 2001.
- ALENCAR, F. C. N.; COSTA, J. L. S. Impacto da fumigação na biomassa e atividade microbiológica dos solos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 359, 2000. Suplemento. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 33., 2000, Belém.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 143-169, 1995.
- ANDREOTE, F. D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 211 p. 2007. Tese (Doutorado) - Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na agricultura e agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. p. 269-293.
- ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W. L.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4906-4914, 2002.
- ASAO, H.; ARAI, S.; NISHIZAWA, Y. Environmental risk evaluation of transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene. **Seibutsu-Kogaku Kaishi**, v. 81, p. 57-63, 2003.
- ATKINSON, D.; WATSON, C. A. The Beneficial Rhizosphere: a dynamic entity. **Applied Soil Ecology**, v. 15, n. 2, p. 99-104, 2000.
- AVILA, L. A.; TOZZI, J. P. L.; MIQUELETO, P., ARANTES, O.M. N.; CAPALBO, D. M. F.; MELO, I. S. Isolamento de bactérias de solo e rizosfera de algodoeiro com potencial de biodegradação da proteína Cry. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA MEIO AMBIENTE, 3., 2006, Jaguariúna. **Anais... Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, 2007, p. 29-33. Disponível em: < http://www.cnpma.embrapa.br/download/documentos_62.pdf >
- AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. Cap. 18, p. 445-461.
- BARTON, K.; WHITELY, H.; YANG, N. S. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant Physiology**, v. 85, p. 1103-1109, 1987.
- BAUMGARTE, S.; TEBBE, C. C. Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2539-2551, 2005.

BETZ, F. S.; HAMMOND, B. G.; FUCHS, R. L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* – Protected plants to control insect pests. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 156-173, 2000.

BLACKWOOD, C., BUYER, J. Soil microbial communities associated with Bt and non-Bt corn in three soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 33, p. 832–836, 2004.

BOEHM, M. J.; HOITINK, H. A. J. Sustenance of microbiol activity in potting mixes and its impact on severity of Pythium root rot of Poinsettia. **Phytopathology**, v. 82, p. 259-264, 1992.

BOLTON, H.; FREDRICKSON, J. K.; ELLIOTT, L. F. Microbial Ecology of the Rhizosphere. In: METTING, F. B. (Ed.). **Soil microbial ecology**: applications in agriculture and environmental management. New York: M. Dekker, 1992. p. 27-63.

BORÉM, A. **Biotecnologia e Meio Ambiente**. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 2004, 425 p.

BOWEN, G. D.; ROVIRA, A. D. The rhizosphere and its management to improve plant growth. **Advances in Agronomy**, v. 66, p. 1-102, 1999.

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

BRUSETTI, L.; FRANCIA, P.; BERTOLINI, C.; PAGLIUCA, A.; BORIN, S.; SORLINI, C.; ABRUZZESE, A.; SACCHI, G.; VITTI, C.; GIOVANNETTI, L.; GIUNTINI, E.; BAZZICALUPO, M.; DAFFONCHIO, D. Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (*Zea mays*) and its non transgenic counterpart. **Plant and Soil**, v. 266, p. 11-21, 2004.

BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Disease and Protection**, v. 105, p. 329-348, 1998.

CARPENTER, J. A.; FELSOT, T.; GOODE, M.; HAMMIG, D.; ONSTAD, S. **Comparative environmental impacts of biotechnology**: derived and tradicional soybean, corn and cotton crops. Ames: Council for Agricultural Science and Technology, 2002. p.168.

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

CLARK, B.; PHILLIPS, T.; COATS, J. Environmental fate and effects of *Bacillus thuringiensis* (Bt) proteins from transgenic crops: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4643–4653, 2005.

COLYER, P. D.; MOUNT, M. S. Bacterization of potatoes with *Pseudomonas putida* and its influence on postharvest soft rot diseases. **Plant Disease**, v. 68, n. 8, p. 703-706, 1984.

C'ORDOVA-KREYLOS, A.L.; CAO, Y.; GREEN, P.G.; HWANG, H.M.; KUIVILA, K.M.; LAMONTAGNE, M.G.; VAN DE WERFHORST, L.C.; HOLDEN, P.A. & SCOW, K.M. Diversity, composition, and geographical distribution of microbial communities in California salt marsh sediments. **Appl Environ Microbiol**, v.72, p. 3357–3366, 2006.

COSTA, R.; GOTZ, M.; MROTZEK, N.; LOTTMANN, J.; BERG, G. & SMALLA, K. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 56, p. 236–249, 2006.

COSTA, J. L. da S.; MENGE, J. A.; CASALE, W. L. Biological control of Phytophthora root of avocado with microorganism grown in organic mulches. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 239-246, 2000.

COSTA, J. L. da S.; MENGE, J. A.; CASALE, W. L. Investigation on some of the mechanisms by which bioenhanced mulches can suppress Phytophthora root rot of avocado. **Microbiological Research**, v. 151, p. 183-192, 1996.

COWGILL, S.E., BARDGETT, R.D., KIEZEBRINK, D.T., ATKINSON, H.J. The effect of transgenic nematode resistance on non-target organisms in the potato rhizosphere. **Journal of Applied Ecology**, v. 39, p. 915–923, 2002.

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

CRICKMORE, N.; ZIEGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 807-813, 1998.

DALE, P. J.; CLARKE, B.; FONTES, E. M. G. Potencial for the environmental impact of transgenic crops. **Nature Biotechnology**, v. 20, p. 567- 574, 2002.

DALE, P. J. Spread of engineered genes to wild relatives. **Plant Physiology**, v. 100, p. 13-15, 1992.

DEAN, D. H. Biochemical genetics of the bacterial insect control agent *Bacillus thuringiensis*: basic principles and prospect for genetic engineering. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 2, p. 341-363, 1984.

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

DI GIOVANNI, G., WATRUD, L.S., SEIDLER, R.J., WIDMER, F. Comparison of parental and transgenic alfalfa rhizosphere bacterial communities using Biolog GN metabolic fingerprinting and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR). **Microbial Ecology**, v. 37, 129–139, 1999.

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

DONEGAN, K. K.; SCHALLER, D. L.; STONE, J. K.; GANIO, L. M.; REED, G.; HAMM, P. B.; SEIDLER, R. J. Microbial populations, fungal species diversity and plant pathogen levels in

field plots of potato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* endotoxin. **Transgenic Research**, v. 5, p. 25-35, 1996.

DONEGAN, K.K.; SEIDLER, R.J.; DOYLE, J.D.; PORTEOUS, L.A.; DI GIOVANNI, G.; WIDMER, F.; WATRUD, L.S. A field study with genetically engineered alfalfa inoculated with recombinant *Sinorhizobium meliloti*: effects on the soil ecosystem. **Journal of Applied Ecology**, v. 36, p. 920–936, 1999.

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

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

FALK-ZEPEDA, J. B.; TRAXLER, G.; NELSON, R. G. **Rent creation and distribution from the first three years of planting Bt cotton**. Ithaca, NY: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, 1999. (ISAAA Briefs, n. 14).

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

FERREIRA, L. H. P. L.; SUZUKI, M. T.; ITANO, E. N.; ONO, M. A.; ARANTES, M. N. O. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 1, p. 19-22, 2003.

FERREIRA, N. S.; ECHER, C. R. Algodão em Goiás: a guerra ao bicudo. **Cultivar**, n. 50, 2003.

FISCHHOFF, D. A.; BOWDISH, K. S.; PERLAK, F. J.; MARRONE, P. G.; McCORMICK, S. M.; NIEDERMEYER, J. G.; DEAN, D. A.; KUSANO-KRETZMER, K.; MAYER, E. J.; ROCHESTER, D. E.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Bio/Technology**, v. 5, p. 807-812, 1987.

FNP. Agrianual: Anuário da Agricultura Brasileira. **AGRIANUAL 2006. Mercado e perspectivas – Algodão**. Instituto FNP, SP, 2005, p. 149-169.

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

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.. **Manual de entomologia agrícola**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1988. 649 p.

GHINI, R.; MENDES, M. D. L.; BETTIOL, W. Método de hidrólise de diacetato de fluoreceína (FDA) como indicador de atividade microbiana no solo e supressividade a *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, v. 24, n. 3/4, p. 239-242, 1998.

GONDIN, D. M. C.; BELOT, J.-L.; SILVIE, P.; PETIT, N. **Manual de Identificação das pragas, doenças, deficiências minerais e injúrias do algodoeiro no Brasil**. 3. ed. Cascavel: COODETEC, 2001. 120 p. (Boletim Técnico, n. 3).

GORE, J.; LEONARD, B. R.; ADAMCZYK, J. J. Bollworm (Lepidoptera:Noctuidae) survival and 'Bollgard II' cotton flower bud and flower components. **Journal of Economic Entomology**, v. 94, p. 1445–1451, 2001.

GREENPLATE, J. Response to reports of early damage in 1996 commercial Bt transgenic cotton (Bollgard) plantings. **Society for Invertebrate Pathology Newsletter**, v. 29, n. 2, p. 15-18, 1997.

GRIFFITHS, B. S.; HECKMANN, L.; CAUL, S.; THOMPSON, J.; SCRIMGEOUR, C.; KROGH, P. H. Varietal effects of eight paired lines of transgenic *Bt* maize and near-isogenic non-*Bt* maize on soil microbial and nematode community structure. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, p. 60-68, 2007.

GRIFFITHS, B.S.; GEOGHEGAN, I.E.; ROBERTSON, W.M. Testing genetically engineered potato, producing the lectins GNA and Con A, on non-target soil organisms and processes. **Journal of Applied Ecology**, v. 37, p. 159-170, 2000.

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

HALCOMB, J. L.; BENEDICT, J. H.; COOK, B. ; RING, D. R. Survival and growth of bollworm and tobacco budworm on nontransgenic and transgenic cotton expressing a CryIA insecticidal protein (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, v. 25, n. 2, p. 250-255, 1996.

HANNAY, C. L.; FITZ-JAMES, P. C. The protein-crystals of *Bacillus thuringiensis* berliner. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 1, p. 694-710, 1955.

HAWES, M. C.; BRIGHAM, L. A. Impact of root border cells of microbial populations in the rhizosphere. **Advances in Plant Pathology**, v. 8, p. 119-148, 1992.

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

HEUER, H.; SMALLA, K. Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme-producing transgenic variants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 28, p. 357-371, 1999.

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

HILBECK, A.; ANDOW, D. A.; FONTES, E. M. G. (Ed.). **Environmental risk assessment of genetically modified organisms: methodologies for assessment Bt cotton in Brazil**. Wallingford: CABI, 2006. v. 2. 373 p.

HILDER, V. A.; BOULTER, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance: a critical review. **Crop Protection**, v. 18, p. 177-191, 1999.

HILTNER, L. Über neuer Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brache. **Arbeiten der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft**, v. 98, p. 59-78, 1904.

JAEGER, C. H.; LINDOW, S. E.; MILLER, W.; CLARK, E.; FIRESTONE, M. K. Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2685-2690, 1999.

JAMES, C. **Preview**: global status of commercialized transgenic crops: 2003. Ithaca, NY: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, 2004. 8 p. (ISAAA Briefs, n.30).

KIMURA, O; RIBEIRO, R. L. Taxonomia do gênero *Pseudomonas*. In: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p. 209-228, 1994.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, p. 301-307, 1954.

KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 169-188, 2004.

KLOEPPER, J. W. Host specificity in microbe-microbe interactions. **BioScience**, v. 46, p. 406-409, 1996.

KLOEPPER, J. W.; SHER, F. M.; LALIBERTE, M.; TIPPING, B. Emergence promoting rhizobacteria: description and implications for agriculture. In: SWINBURN, T. R. (Ed.). **Iron, siderophores and plant disease**. New York: Plenum Press, 1986. p. 155-164.

KLOEPPER, J. W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M. N. Enhanced plant growth by siderophore produced by plant growth-promotion rhizobacteria. **Nature**, v. 286, p. 885-886, 1980.

KOSKELLA, J.; STOTZKY, G. Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3561-3568, 1997.

KRANTHI, K. R.; NAIDU, S.; DHAWAD, C. S.; TATWAWADI, A.; MATE, K.; PATIL, E.; BHAROSE, A. A.; BEHERE, G. T.; WADASKAR, R. M.; KRANTHI, S. Temporal and intra-plant variability of Cry1Ac expression in *Bt*-cotton and its influence on the survival of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Noctuidae: Lepidoptera). **Current Science**, v. 89, p. 291-298, 2005.

LATOUR, X.; LEMANCEAU, P. Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. **Agronomie**, v. 17, p. 427-443, 1997.

LEGENDRE, P.; ANDERSON, M. J. Distance-based redundancy analysis: Testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. **Ecological Monographs**, v. 69, p. 1-24, 1999.

LIU, S.; BAKER, R. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v. 70, p. 404-412, 1980.

LOTTMANN, J.; HEUER, H.; SMALLA, K.; BERG, G. Influence of transgenic T4-lysozyme-producing potato plants on potentially beneficial plant-associated bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 29, p. 365-377, 1999.

LOSEY, J. E.; RAYOR, L. S.; CARTER, M. E. Transgenic pollen harms monarch larvae. **Nature**, v. 399, p. 214, 1999.

LUKOW, T., DUNFIELD, P.F., LIESACK, W. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 32, p. 241-247, 2000.

LYNCH, J. M. Introduction: some consequences on microbial rhizosphere competence for plant and soil. In: LYNCH, J. M. **The rhizosphere**. Chichester: J. Wiley, 1990. p. 1-10.

MAIDAK, B. L.; COLE, J. R.; PARKER JUNIOR, C. T.; GARRITY, G. M.; LARSEN, N.; LI, B.; LILBURN, T. G.; MCCAUGHEY, M. J.; OLSEN, G. J.; OVERBEEK, R.; PRAMANIK, S.; SCHMIDT, T. M.; TIEDJE, J. M.; WOESE, C. R.. A new version of the RDP (Ribosomal database Project). **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 171-171, 1999.

MARSCHNER, P.; BAUMANN, K. Changes in bacterial community structure induced by mycorrhizal colonisation in split-root maize. **Plant and Soil**, v. 251, p. 279-289, 2003.

MCCAIG, A. E.; GRAYSTON, S. J.; PROSSER, J. I.; GLOVER, L. A. Impact of cultivation on characterisation of species composition of soil bacterial communities. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, p. 37-48, 2001.

MEADOWS, M. P. *Bacillus thuringiensis* in the environment - ecology and risk assessment. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). **Bacillus thuringiensis**: an environmental biopesticide; theory and practice. Chichester: J. Wiley, 1993. p. 193-220.

MELO, I. S de. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa CNPMA, 1998. v.1, p. 87-116.

METZ, P. L. J.; NAP, J. P. A transgene-centred approach to the biosafety of transgenic plants: overview of selection and reporter genes. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 46, p. 25-50, 1997.

MILLER, H. J.; HENKEN, G.; VAN VEEN, J. A. Variation and composition of bacterial populations in the rhizospheres the maize, wheat, and grass cultivars. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 656-660, 1989.

MILLING, A.; SMALLA, K.; MAIDL, F. X.; SCHLOTER, M.; MUNCH, J. C. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. **Plant and Soil**, v. 226, p. 23-39, 2004.

MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, v. 80, p. 808-811, 1990.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. New York: J. Wiley, 1991. 649 p.

MOURA, A. B.; ROMEIRO, R. S. Actinomicetos pré-selecionados para controle de *Ralstonia solanacearum* como promotores de crescimento do tomateiro. **Revista Ceres**, v. 47, p. 613-626, 2000.

MUYLAERT, K.; VAN DER GUCHT, K.; VLOEMANS, N.; MEESTER, L. D.; GILLIS, M.; VYVERMAN, W. Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4740-4750, 2002.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes form natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 317-322, 1999.

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

O'DONNELL, A. G.; GOODFELLOW, M. Theoretical and pratical aspects of the quantification of biodiversity among microrganisms. **Philosophical Transactions: Biological Sciences**, v. 345, p. 65-73, 1994.

OVREAS, L.; TORSVIK, V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. **Microbial Ecology**, v. 36, p. 303-315, 1998.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, p. 734-740, 1997.

PALLERONI, N. J.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R.; DOUDOROFF, M. Nucleic and homologies in the genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 23, p. 333-339, 1973.

PALM, C. J.; SEIDLER, R. J.; SCHALLER, D. L.; DONEGAN, K. K. Persistense en soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* δ -endotoxin. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1258-1262, 1996.

PALM, C. J.; DONEGAN, K.; HARRIS, D.; SEIDLER, R. J. Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* δ -endotoxin from transgenic plants. **Molecular Ecology**, v. 3, p. 145-151, 1994.

PEFERÖEN, M. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 173-177, 1997.

RAAIJMAKERS, J. M.; WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Frequency of antibioticproducing *Pseudomonas* spp. in natural environments. **Appied and Environmental Microbiology**, v. 6, p. 881-887, 1997.

RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 62, p. 142-160, 2007.

RASCHE, F.; HODL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M.H.; VAN ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, p. 219-235, 2006.

RIDDER-DUINE, A. S.; KOWALCHUK, G. A.; GUNNEWIEK, P. J. A. K.; SMANT, W.; VAN VEEN, J. A.; BOER, W. Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 349–357, 2005.

ROVIRA, A. D. Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect II. A study of the properties of root exudates and its effect on the growth of micro-organisms isolated from the rhizosphere and control soil. **Plant and Soil**, v. 7, p. 195-208, 1956.

RUI, Y. K.; YI, G. X.; ZHAO, J.; WANG, B. M.; LI, Z. H.; ZHAI, Z. X.; HE, Z. P.; LI, Q. X. Changes of Bt toxin in the rhizosphere of transgenic Bt cotton and its influence on soil functional bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 2, p. 1279-1284, 2005.

SALLES, J. F.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: effect of crop and land use history. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 4012-4020, 2004.

SAPP, M.; WICHELS, A.; WILTSHIRE, K.H. & GERDTS, G. Bacterial community dynamics during the winter-spring transition in the North Sea. **FEMS Microbiol Ecol**, 59: 622–637, 2007.

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

SAXENA, D.; STOTZKY, G. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ. **Fems Microbiology Ecology**, v. 33, p. 35-39, 2000.

SAXENA, D.; STOTZKY, G. Fate and effects of the insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* in soil. **ISB News Report**, p. 5-7, 2001.

SCHILLING, G.; GRANSEE, A.; DEUBEL, A.; LEZOVIC, G.; RUPPEL, S. Phosphorus availability, root exudates, and microbial activity in the rhizosphere. **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, v. 161, p. 465-478, 1998.

SCHMALENBERGER, A.; TEBBE, C. C. 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**, v. 40, p. 29-37, 2002.

SCHNEPF, E. *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775-780, 1998.

SCHNEPF, H. E.; WHITELEY, H. R. Cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 78, p. 2893-2897, 1981.

SCHULER, T. H.; POPPY, G. M.; KERRY, B. R.; DENHOLM, I. Insect-resistant transgenic plants. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 168-174, 1998.

SCHUNER, J.; ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 1256-1261, 1982.

SHAN, G.; EMBREY, S. K.; HERMAN, R. A.; WOLT, J. D.; WESTON, D.; MAYER, L. M. Biomimetic extraction of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins from soil based on invertebrate gut fluid chemistry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6630-6634, 2005.

SILVA, M; SIQUEIRA, E. R.; COSTA, J. L. da S. Hidrólise de diacetato de fluoresceína como bioindicador da atividade microbiológica de um solo submetido a reflorestamento. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1493-1496, 2004.

SILVA, H. S. A. **Rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica a patógenos foliares e como promotoras de crescimento em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. 2002, 78 p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

SIMS, S. R.; REAM, J. E. Soil inactivation of the *Bacillus thuringiensis* Subsp. kurstaki CryIIA insecticidal protein within transgenic cotton tissue: laboratory microcosm and field studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1502–1505. 1997.

SIQUEIRA, J. O; MOREIRA, F. M. de J.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 7-81.

SIQUEIRA, J. W.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília, DF: MEC, ESAL, FAEPE, ABEAS, 1988. 236 p.

SMALLA, K.; WIELAND, G.; BUCHNER, A.; ZOCK, A.; PARZY, J.; KAISER, J.; ROSKOT, N.; HEUER, H.; BERG, G. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturant gradient gel electrophoresis plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4742-4751, 2001.

SOUZA, J. G.; BELTRÃO, N. E. M. Fisiologia. In: BELTRÃO, N. E. M. (Ed.). **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. v. 1, p. 87-109.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. Toronto: McGraw-Hill, 1980. 633 p.

STEENWERTH, K. L.; JACKSON, L. E.; CALDERON, F.J.; STROMBERG, M. R.; SCOW, K. M. Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 34, p. 1599-1611, 2002.

TAPP, H.; STOTZKY, G. Persistence of the insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 30, p. 471-476, 1998.

TATE III, R. L. The rhizosphere/mycorrhizosphere. In: TATE III, R. L. **Soil Microbiology**. New York: J. Wiley, 1995. p. 171-185.

TER BRAAK, C. J. F. Ordination. In: JONGMAN, R. H. G.; TER BRAAK, C. J. F.; TONGEREN, O. F. R. V. (Ed.). **Data analysis in community and landscape ecology**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p. 91-173.

TORSVIK, V.; DAAE, F. L.; SANDAA, R. A.; OVREAS, L. Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, v. 64, p. 53-62, 1998.

TUITE, J. **Plant pathological methods**. Minneapolis: Burgess, 1969. 239 p.

VAECK, M.; REYNAETERS, A.; HOFTE, H.; JANSSENS, S.; DE BEUCKELEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v. 327, p. 33-37, 1987.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SHILER, W.; DE-SOUZA, M. T. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. v. 1, p. 201-230.

VALARINI, P. J.; MELO, I. S. de; MORSOLETO, R. V. Controle alternativo da podridão radicular do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Summa Phytopathologica**, v. 29, n. 4, p. 334-339, 2003.

VILLÁNYI, I.; FÜZY, A.; NAÁR, Z.; BAKONYI, G.; BIRÓ, B. Rhizobiological characterization and environmental risk of transgenic *Bt* corn. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF RHIZOSPHERE, 2004, Munich. **Perspectives and Challenges...** Munich: [S. n.], 2004. p. 75.

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

WILLIAMSON, M. Environmental risks from released of genetically modified organisms (GMOs) – the need for molecular ecology. **Molecular Ecology**, v. 1, p. 3-8, 1992.

WOESE, C. R.; KANDLER, R. A.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms proposal for the domains *Archae*, *Bacteria*, and *Eukarya*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1987.

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

YANNARELL, A.C.; TRIPLETT, E. W. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, p. 227–239, 2005.

YUNHE, L.; KONGMING, W.; YONGJUN, Z.; GUOHU, Y. Degradation of Cry1Ac protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* rice tissues under field and laboratory conditions. **Environmental Entomology**, v. 36, p. 1275-1282, 2007.

ZAMBRYSKI, P. Chronicles from the Agrobacterium-plant cell DNA transfer story. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 43, p. 465-490, 1992.

ANEXOS

ANEXO A – Efeito do tipo de solo (ITA - argiloarenoso ou SSE – franco-argiloarenoso) no número (Log UFC/g de solo) de bactérias totais (1 e 2), de *Pseudomonas* (3 e 4) e na atividade (FDA/g de solo/min) de bactérias (5 e 6) da rizosfera do algodão convencional e transgênico (Bt), nas quatro fases do ciclo da cultura (coletas).

* $p < 0,01$ e ** $p \leq 0,0001$.

Anexo B - Tabela com estimativas das diferenças das médias de Log UFC/g de solo de bactérias totais entre coletas, em cada combinação solo (SSE e ITA) versus tipo de algodão (convencional ou transgênico) e respectivos valores p dos testes t para contrastes utilizados para quantificar a evidência de variabilidade temporal em cada uma das variáveis objeto de estudo.

Solo	Algodão	Contraste entre coletas	Estimativa	Valor p
ITA	CONV	col2 x col1	0.13	0.1256
ITA	CONV	col3 x col1	-0.01	0.8640
ITA	CONV	col4 x col1	0.15	0.0973
ITA	CONV	col3 x col2	0.15	0.0895
ITA	CONV	col4 x col2	-0.02	0.8271
ITA	CONV	col4 x col3	-0.17	0.0697
ITA	TRANS	col2 x col1	-0.10	0.2569
ITA	TRANS	col3 x col1	-0.29	0.0013
ITA	TRANS	col4 x col1	-0.05	0.5651
ITA	TRANS	col3 x col2	0.19	0.0296
ITA	TRANS	col4 x col2	-0.05	0.5735
ITA	TRANS	col4 x col3	-0.24	0.0069
SSE	CONV	col2 x col1	0.07	0.4046
SSE	CONV	col3 x col1	-0.36	<.0001
SSE	CONV	col4 x col1	-0.23	0.0088
SSE	CONV	col3 x col2	0.43	<.0001
SSE	CONV	col4 x col2	0.31	0.0008
SSE	CONV	col4 x col3	-0.13	0.1474
SSE	TRANS	col2 x col1	-0.22	0.0130
SSE	TRANS	col3 x col1	-0.48	<.0001
SSE	TRANS	col4 x col1	-0.46	<.0001
SSE	TRANS	col3 x col2	0.25	0.0044
SSE	TRANS	col4 x col2	0.24	0.0077
SSE	TRANS	col4 x col3	-0.02	0.8436

Anexo C - Tabela com estimativas das diferenças das médias de LogUFC/g de solo de *Pseudomonas* entre coletas, em cada combinação solo (SSE ou ITA) versus tipo de algodão (convencional ou transgênico) e respectivos valores p dos testes t para contrastes utilizados para quantificar a evidência de variabilidade temporal em cada uma das variáveis objeto de estudo.

Solo	Algodão	Contraste entre coletas	Estimativa	Valor p
ITA	CONV	col2 x col1	-1.10	<.0001
ITA	CONV	col3 x col1	-0.56	0.0220
ITA	CONV	col4 x col1	-0.53	0.0393
ITA	CONV	col3 x col2	-0.54	0.0261
ITA	CONV	col4 x col2	-0.57	0.0274
ITA	CONV	col4 x col3	-0.03	0.9134
ITA	TRANS	col2 x col1	-1.16	<.0001
ITA	TRANS	col3 x col1	-0.59	0.0152
ITA	TRANS	col4 x col1	-0.37	0.1243
ITA	TRANS	col3 x col2	-0.57	0.0204
ITA	TRANS	col4 x col2	-0.79	0.0015
ITA	TRANS	col4 x col3	-0.22	0.3517
SSE	CONV	col2 x col1	-1.33	<.0001
SSE	CONV	col3 x col1	-1.02	<.0001
SSE	CONV	col4 x col1	-0.81	0.0012
SSE	CONV	col3 x col2	-0.31	0.1913
SSE	CONV	col4 x col2	-0.52	0.0320
SSE	CONV	col4 x col3	-0.21	0.3864
SSE	TRANS	col2 x col1	-1.11	<.0001
SSE	TRANS	col3 x col1	-0.20	0.4115
SSE	TRANS	col4 x col1	-1.10	<.0001
SSE	TRANS	col3 x col2	-0.56	0.0220
SSE	TRANS	col4 x col2	-0.53	0.0393
SSE	TRANS	col4 x col3	-0.54	0.0261

Anexo D - Tabela com estimativas das diferenças das médias de FDA entre coletas, em cada combinação solo (SSE ou ITA) versus tipo de algodão (convencional ou transgênico) e respectivos valores p dos testes t para contrastes utilizados para quantificar a evidência de variabilidade temporal em cada uma das variáveis objeto de estudo.

Solo	Algodão	Contraste entre coletas	Estimativa	Valor p
ITA	CONV	col2 x col1	0.47	0.0095
ITA	CONV	col3 x col1	-0.31	0.0853
ITA	CONV	col4 x col1	-0.32	0.0931
ITA	CONV	col3 x col2	0.77	<.0001
ITA	CONV	col4 x col2	0.78	<.0001
ITA	CONV	col4 x col3	0.01	0.9550
ITA	TRANS	col2 x col1	0.45	0.0123
ITA	TRANS	col3 x col1	-0.23	0.1958
ITA	TRANS	col4 x col1	-0.09	0.5952
ITA	TRANS	col3 x col2	0.68	0.0002
ITA	TRANS	col4 x col2	0.54	0.0028
ITA	TRANS	col4 x col3	-0.14	0.4422
SSE	CONV	col2 x col1	0.08	0.6635
SSE	CONV	col3 x col1	0.50	0.0059
SSE	CONV	col4 x col1	-0.04	0.8129
SSE	CONV	col3 x col2	-0.57	0.0017
SSE	CONV	col4 x col2	-0.03	0.8426
SSE	CONV	col4 x col3	0.54	0.0030
SSE	TRANS	col2 x col1	-1.17	<.0001
SSE	TRANS	col3 x col1	-0.07	0.6848
SSE	TRANS	col4 x col1	-1.11	<.0001
SSE	TRANS	col3 x col2	-1.10	<.0001
SSE	TRANS	col4 x col2	-0.06	0.7353
SSE	TRANS	col4 x col3	1.04	<.0001

Anexo E - Análises de correspondência canônica (CCA) da estrutura de comunidades de bactérias associadas à rizosfera de algodão Bt (TR) e algodão não-Bt (NT) em dois tipos de solos (SSE e ITA) e quatro estádios de desenvolvimento da planta (coletas).
Os gráficos foram gerados a partir da análise de correlação canônica dos perfis de DGGE-16S Universal (Gráfico1) e do DGGE para *Pseudomonas* (Gráfico 2), com os fatores ambientais. * $p < 0,05$