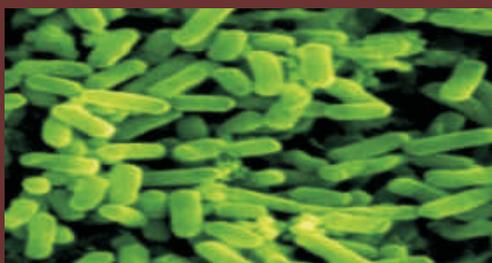
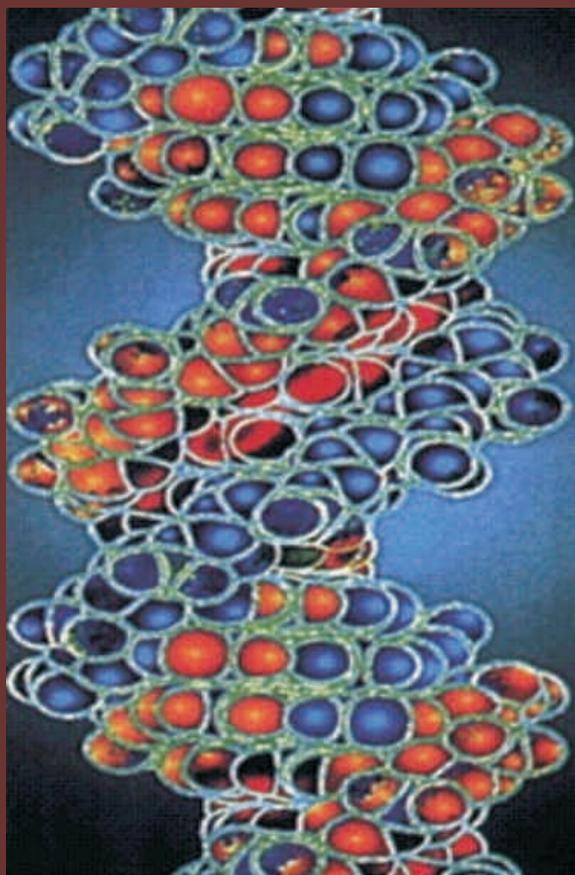


Plantas Transgênicas e a Microbiota do Solo





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1517-5111

Junho, 2005

Documentos 141

Plantas Transgênicas e a Microbiota do Solo

Fábio Bueno dos Reis Junior
Iêda de Carvalho Mendes
Mariângela Hungria

Planaltina, DF
2005

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina - DF

Fone: (61) 3388-9898

Fax: (61) 3388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *José de Ribamar N. dos Anjos*

Secretária-Executiva: *Maria Edilva Nogueira*

Supervisão editorial: *Maria Helena Gonçalves Teixeira*

Revisão de texto: *Maria Helena Gonçalves Teixeira*

Normalização bibliográfica: *Shirley da Luz Soares*

Capa: *Fábio Bueno dos Reis Junior*

Foto da capa: *Fábio Bueno dos Reis Junior*

Editoração eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*

Jaime Arbués Carneiro

1ª edição

1ª impressão (2005): tiragem 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação na publicação.

Embrapa Cerrados.

R377p Reis Junior, Fábio Bueno dos.

Plantas transgênicas e a microbiota do solo / Fábio Bueno dos Reis Junior, Iêda de Carvalho Mendes, Mariângela Hungria. – Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005.

36 p.— (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 141)

1. Microbiologia do solo. 2. Planta transgênica. I. Mendes, Iêda de Carvalho. II. Hungria, Mariângela. III. Título. IV. Série.

578.757 - CDD 21

© Embrapa 2005

Autores

Fábio Bueno dos Reis Junior

Eng. Agrôn., D.Sc., Embrapa Cerrados

fabio@cpac.embrapa.br

Iêda de Carvalho Mendes

Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Cerrados,

mendes@cpac.embrapa.br

Mariângela Hungria

Eng. Agrôn., Ph.D, Embrapa Soja,

Rodovia Carlos João Strass

Cx. Postal 231 CEP 86001-970, Londrina, PR

hungria@cnpso.embrapa.br

Apresentação

Os microrganismos do solo desempenham papel fundamental, com diversas funções-chave para o funcionamento dos ecossistemas. Por isso, a possibilidade de que o cultivo de plantas transgênicas possa causar algum impacto sobre a comunidade microbiana dos solos deve ser examinada com especial interesse. A prática da agricultura representa impacto inevitável sobre o ambiente, no entanto, é necessário buscar o melhor balanço entre a produção agrícola, a biodiversidade e as preocupações dos consumidores. Os avanços da biotecnologia não podem ser ignorados, porém, devemos procurar utilizá-los de maneira eficiente, responsável e segura. Neste contexto, este documento apresenta uma discussão sobre as possíveis interações entre os microrganismos do solo e as plantas transgênicas, mostrando resultados atuais de diferentes estudos, com foco nos parâmetros avaliados e nas metodologias utilizadas para a análise das comunidades microbianas. Espera-se que este documento sirva como fonte de consulta para o público ávido por informações científicas a respeito do cultivo de plantas transgênicas e dos aspectos de biossegurança que devem acompanhá-lo, com especial atenção aos microrganismos do solo.

Roberto Teixeira Alves
Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

Sumário

Introdução	9
Plantas transformadas para exsudação de novos compostos	13
Plantas transgênicas resistentes a doenças	14
Plantas transgênicas visando resistência a pragas	18
Plantas transgênicas resistentes a herbicidas (glifosato)	19
Efeito do glifosato sobre a comunidade microbiana do solo	19
Efeito da aplicação de glifosato sobre a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) na soja	21
Efeito da transformação de plantas resistentes a herbicidas sobre a comunidade microbiana do solo	26
Transferência horizontal de genes	27
Considerações Finais	28
Referências	29

Plantas Transgênicas e a Microbiota do Solo

Fábio Bueno dos Reis Júnior

Iêda de Carvalho Mendes

Mariângela Hungria

Introdução

Um grama de solo pode conter em torno de 10.000 espécies de bactérias ([TORSVIK; ØVREAS, 2002](#)), considerando essa estimativa, pode-se dizer que, sem dúvida, o maior celeiro de genes no planeta reside na fração microbiana da biodiversidade. Os microrganismos presentes no solo têm papel-chave na ciclagem de nutrientes e na manutenção de sua fertilidade, além de desempenhar funções como agente de controle biológico de doenças e pragas da agricultura, biorremediadores de poluentes, promotores de crescimento de plantas. Esses organismos também podem apresentar alto valor biotecnológico, sendo um manancial de fármacos, corantes, enzimas e ácidos orgânicos, entre muitos outros produtos ainda inexplorados.

As primeiras plantas transgênicas foram desenvolvidas ainda nos anos 80. Desde então, diferentes genes têm sido inseridos em grande número de culturas a fim de que elas expressem novas e desejáveis características. Esses genes e seus produtos, eventualmente, serão liberados nos solos, possibilitando oportunidades de ocorrer interação com a comunidade microbiana ([Figura 1](#)). [Donegan et al. \(1995\)](#) sugerem que alterações não esperadas nas características das plantas, resultantes de modificações genéticas, também possam causar impacto sobre a microbiota do solo. Sendo assim, as comunidades microbianas, associadas a plantas geneticamente modificadas, podem ser diferentes das plantas que não sofreram modificações.

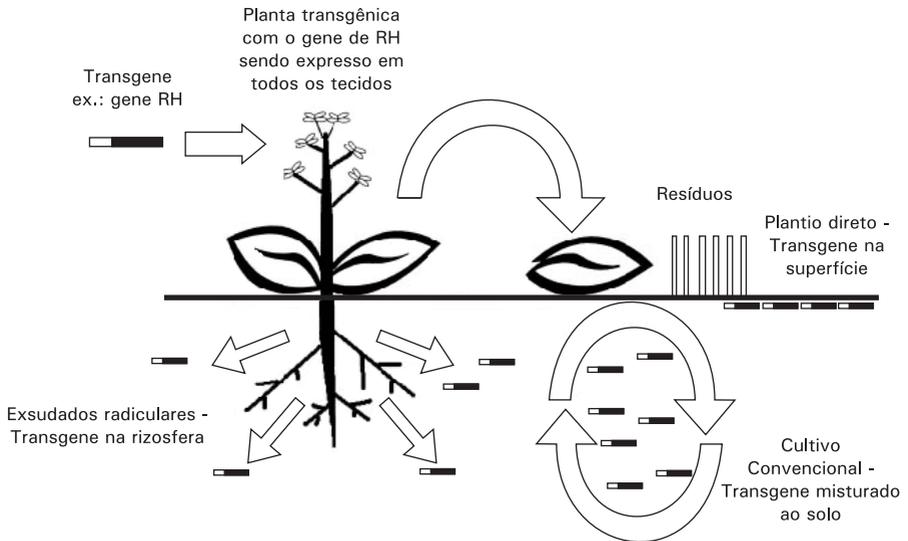


Figura 1. Possíveis locais de interação entre transgenes e a comunidade microbiana do solo. RH, gene que confere tolerância a herbicida.

Fonte: [Adaptado de Dunfield e Germida \(2004\)](#).

O desenvolvimento e o uso de plantas transgênicas têm promovido acalorado debate público nos últimos anos. As plantas transgênicas representam uma promessa para incrementar o desenvolvimento do setor agrícola, no entanto, seu potencial para apresentar riscos indesejáveis não é completamente conhecido. Infelizmente, os organismos do solo e estudos que envolvem o uso de plantas transgênicas e seus riscos potenciais nem sempre são incluídos nos debates. O possível impacto, direto ou indireto, do uso dessas plantas sobre a comunidade microbiana do solo é uma das áreas mais carentes de informações quando o assunto é biossegurança. Na maioria dos casos, isso acontece devido às dificuldades inerentes a estudos que envolvem esses organismos.

Além de o sistema solo ser complexo e heterogêneo, os pesquisadores com a utilização de métodos microbiológicos clássicos, não têm condições de cultivar ou identificar a grande maioria dos microrganismos presentes nele. No entanto, com os avanços metodológicos, especialmente, a introdução de técnicas de biologia molecular, novas estratégias para o estudo das comunidades microbianas e o possível efeito do cultivo de plantas transgênicas sobre elas,

têm sido desenvolvidas e utilizadas. Com o auxílio dessas técnicas, nos últimos anos, têm-se visto um incremento no número de estudos dedicados a observar os possíveis efeitos de plantas transgênicas sobre os microrganismos do solo ([DUNFIELD; GERMIDA, 2004](#); [MOTAVALLI et al., 2004](#); [BRUINSMA et al., 2003](#)). No entanto, é preciso ressaltar que nenhuma técnica é infalível, e a aplicação de estudos polifásicos (estudos que englobam o uso de diferentes metodologias) dará uma visão mais apropriada dos efeitos das plantas geneticamente modificadas quando comparada ao uso de uma metodologia isolada. Aliados a isso, o uso de controles apropriados nos procedimentos de avaliação de impacto e a determinação de variações que possam ocorrer naturalmente são fatores-chave para uma boa interpretação dos resultados. É importante salientar que as plantas transgênicas e os sistemas agrícolas onde elas serão introduzidas demandam avaliações caso a caso. A complexidade dos ecossistemas dos solos e a multiplicidade de papéis desempenhados pelos microrganismos forçam os pesquisadores a fazer escolhas como quais as espécies ou grupos e quais as funções ou propriedades deverão ser mais bem examinados.

Além do efeito direto decorrente da expressão da proteína introduzida durante a transformação, existe a probabilidade de aparecimento de efeitos não esperados que resultam da inserção do transgene no genoma, como por exemplo, alterações na síntese de proteínas que podem se refletir nas vias metabólicas, produzindo modificações imprevisíveis. Nesse cenário, cada transgênico deve ser estudado, não só quanto à eficiência da característica introduzida, como, também, quanto à possibilidade de impacto ambiental e de segurança alimentar decorrentes das alterações inesperadas ([CELLINI et al., 2004](#)).

Para estudos de impacto do uso de plantas transgênicas sobre os microrganismos do solo, [Bruinsma et al. \(2003\)](#) apresentam as seguintes questões a serem consideradas:

- 1) Quais são as condições ambientais nas quais as plantas transgênicas serão introduzidas (tipo de solo, pH, vegetação nativa)?
- 2) O que já é conhecido sobre a comunidade microbiana presente e suas funções-chave no solo? Existe algum grupo ou processo particularmente importante, dominante ou vulnerável?
- 3) Qual é a natureza e a origem do gene (s) introduzido na planta? Quando e em qual órgão (s) esse gene será expresso?

- 4) O material genético inserido age sobre um organismo específico ou confere-lhe uma propriedade mais geral que pode afetar uma gama maior de organismos?
- 5) Como se dá a exposição dos microrganismos do solo ao produto da transformação genética? Quão longa é essa exposição?

As respostas a estas perguntas devem ajudar a determinar quais microrganismos do solo ou processos podem ser afetados pela introdução de uma planta transgênica específica. Todavia, mesmo com as respostas a essas perguntas, nosso conhecimento sobre os efeitos potenciais ainda será incompleto e efeitos inesperados não podem ser descartados.

[Bruinsma et al. \(2003\)](#) citam alguns grupos como potenciais indicadores por serem acessíveis experimentalmente e apresentarem características importantes e reconhecidas no sistema solo. São eles:

- 1) Fungos micorrízicos: as associações micorrízicas podem ser bastante sensíveis a diversos fatores incluindo, perturbações físicas, uso de fertilizantes e alterações nas espécies de plantas em uma determinada área.
- 2) Bactérias diazotróficas (fixadoras de N_2): também são sensíveis a alterações que ocorrem no sistema solo. Têm papel de destaque no ciclo do N e vários métodos estão disponíveis para que possam ser estudadas.
- 3) Bactérias nitrificadoras: o processo de nitrificação, importante na ciclagem do N do solo, parece ser limitado a um número restrito de bactérias autotróficas (HOOPER, 1990) e estresses ambientais podem afetar severamente sua atividade ([ATLAS; BARTHA, 1998](#)).
- 4) Fungos decompositores: a baixa redundância desse grupo de organismos, sua sensibilidade e a importância do processo de degradação da lignina são características de um bom indicador ([BODDY; WATKINSON, 1995](#)).
- 5) Antagonistas (*Pseudomonas* spp.; *Trichoderma*): alterações nas populações desses organismos podem ter implicações importantes na dinâmica de populações nos solos ([GYAMFI et al., 2002](#)).

Entre os potenciais efeitos do uso de plantas transgênicas sobre a microbiota do solo estão: alterações na atividade e diversidade de microrganismos, em resposta a mudanças na quantidade e na composição de exsudados radiculares; alterações provocadas por mudanças no manejo como aplicações de pesticidas e preparo

do solo; mudanças genéticas e funcionais resultantes da transferência horizontal de genes das plantas transgênicas para microrganismos do solo ([DUNFIELD, GERMIDA, 2004](#); [MOTAVALLI et al., 2004](#)).

No Brasil, alguns trabalhos envolvendo questões de biossegurança e plantas transgênicas estão sendo conduzidos a campo. Esses trabalhos são muito recentes, já que as normas que regem esse tipo de estudo foram definidas há poucos meses. Por essa razão, ainda não existem resultados disponíveis de estudos conduzidos em nosso país. Portanto, neste documento, serão apresentados os resultados de trabalhos conduzidos por diversos pesquisadores estrangeiros, focando os parâmetros avaliados e as técnicas utilizadas para analisar as comunidades microbianas.

Plantas transformadas para exsudação de novos compostos

[Oger et al. \(2000\)](#) estudaram essa possibilidade em plantas modificadas (*Lotus corniculatus* cv. Rodéo) para a produção de opinas. As opinas são geralmente compostos de baixo peso molecular, derivados de aminoácidos ou açúcares e podem ser utilizadas como fonte de nutrientes por algumas bactérias. O estudo de [Oger et al. \(2000\)](#) é baseado na possibilidade de a exsudação de opinas pelas plantas transgênicas favorecerem o crescimento de microrganismos que utilizam esses compostos, garantindo a eles vantagem seletiva sobre a porção da comunidade microbiana que não é capaz de utilizá-los. Esses autores trabalharam com plantas transformadas (produtoras de opinas) e não transformadas de *Lotus corniculatus* cv. Rodéo, em um experimento de casa de vegetação. Depois de 20 semanas, a contagem de bactérias totais em meio de cultura foi similar para todos os tratamentos. No entanto, o número de utilizadores de opinas foi maior (até 475 vezes) ao redor do sistema radicular das plantas transgênicas. A remoção das plantas não levou ao desaparecimento do padrão observado após a introdução das linhagens modificadas, pelo menos até o período em que o experimento foi avaliado (22 semanas após a remoção das plantas). Entretanto, quando as plantas transgênicas foram substituídas pelas plantas controle, o número de utilizadores de opinas tendeu a decrescer ao longo do tempo, mostrando que o efeito produzido por elas pode ser reversível. Os resultados apresentados neste trabalho mostram que, mesmo pequenas alterações como a produção de um simples composto adicional pela planta, podem levar a mudanças na microflora bacteriana associada. No caso desse tipo de

transformação, em que existe uma população microbiana que pode ser claramente definida como alvo, foi possível demonstrar o efeito do cultivo de transgênicos apenas avaliando-se essas populações, o que, no entanto, não elimina a possibilidade de efeitos sobre outros grupos microbianos, especialmente, quando se considera a cadeia trófica presente na comunidade do solo.

Plantas transgênicas resistentes a doenças

As primeiras plantas transgênicas, modificadas com a intenção de melhorar a resistência contra bactérias fitopatogênicas nativas do solo foram as batatas transformadas para produzir a Lisozima-T4, uma enzima bacteriolítica detectada em diversas espécies de plantas, buscando resistência contra *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica ([DÜRING et al., 1993](#)). A princípio descobriu-se que várias outras bactérias ou fungos também são sensíveis a lisozima T4 *in vitro* ([DE VRIES et al., 1999](#)). Dessa maneira, a expressão da lisozima T4 apresenta potencial para promover alterações na estrutura das comunidades microbianas do solo.

[Lottman et al. \(1999\)](#) avaliaram populações de bactérias do solo num experimento onde foram utilizadas duas linhagens transgênicas de plantas de batata produtoras da T4-lisozima (DL4 e DL5) uma linhagem carregando a mesma construção gênica, mas sem o gene responsável pela produção da lisozima (DC1) e a variedade parental não transgênica como controle não transformado (DES). De acordo com os resultados obtidos, o número de bactérias aeróbias, associadas à rizosfera de plantas transgênicas produtoras de lisozima, não foi significativamente diferente daqueles obtidos de plantas-controle. O mesmo foi observado para populações de bactérias com propriedades antifúngicas e produtoras de AIA (ácido-indol-3-acético). Sete espécies de bactérias benéficas antagonistas a *E. carotovora* e a *Verticillium dahliae*, que representavam 9,7% de todas as 124 antagonistas identificadas, foram isoladas apenas das plantas-controle.

Em outro trabalho, [Lottman et al. \(2000\)](#) avaliaram o comportamento de duas estirpes de bactérias antagonistas e produtoras de AIA que ocorrem em rizosfera de batata. *Serratia grimesii* L16-3-3 é uma bactéria sensível a lisozima-T4 *in vitro* e foi encontrada apenas na rizosfera de plantas-controle ([LOTTMAN et al., 1999](#)) e *Pseudomonas putida* QC14-3-8 é tolerante a lisozima-T4 *in vitro* e foi

isolada da rizosfera de batata transgênica ([LOTTMAN et al., 1999](#)). Essas bactérias, com marcadores de resistência à rifampicina, foram inoculadas em plantas de batata transgênicas produtoras de lisozima-T4 (Linhagem DL5), em controle transgênico sem o gene da lisozima (Linhagem DC1) e na linhagem controle não transformada (DES). A presença das estirpes inoculadas na rizosfera das plantas foi avaliada pela contagem em placas e pela diversidade total de bactérias, utilizando a técnica de eletroforese em gel com gradiente denaturante (DGGE). Os autores concluíram que não houve efeito negativo da lisozima-T4 sobre as bactérias da rizosfera, incluindo aquelas que foram inoculadas. Na verdade, durante o período de florescimento, foram encontradas mais colônias de *Pseudomonas putida*, que são tolerantes à lisozima, associadas a linhagem transgênica DL5. Nesse caso, os autores citam que a produção de lisozima pode incrementar o estabelecimento de bactérias tolerantes e, se essas bactérias tiverem propriedades antagonistas, promover efeitos sinérgicos.

[Heuer et al. \(2002\)](#) conduziram outro estudo de campo, em duas áreas distantes, por três anos, mostrando que a estrutura da comunidade microbiana da rizosfera de plantas transgênicas de batata T4-lisozima, linhagem DL4, diferenciava-se de uma segunda linhagem transgênica (DL5), do controle transgênico sem o gene da lisozima (DC1) e da linhagem controle não transformada (DES). Nesse trabalho, as comunidades bacterianas foram analisadas sob três abordagens diferentes, com o intuito de encontrar complementaridade entre elas. Na primeira, a abundância relativa das espécies bacterianas na rizosfera foi determinada com base no cultivo e na caracterização de isolados por análises do perfil de ácidos graxos. Na segunda, permitiu analisar o perfil catabólico das comunidades utilizando microplacas Biolog GN ([GARLAND; MILLS, 1991](#)). Por fim, fragmentos amplificados do gene da região 16S rRNA, provenientes do DNA total extraído da rizosfera das plantas, foi analisado pela técnica de DGGE ou por clonagem e seqüenciamento. A média do tamanho das populações bacterianas na rizosfera das plantas, ao longo de 10 coletas, não foi estatisticamente diferente entre as linhagens produtoras de lisozima e as plantas controle. O perfil catabólico potencial da comunidade microbiana, associado à rizosfera da linhagem DL4, foi significativamente diferente das demais linhagens. Bandas de DGGE, específicas para linhagens produtoras de lisozima ou para plantas controle, não foram observadas, indicando que linhagens diferentes ou a produção de lisozima não afetaram a abundância de espécies bacterianas na rizosfera. Diferenças na composição de espécies ou de gêneros, acessadas com o seqüenciamento, não foram

consistentes, porém, comparadas a outras linhagens, notou-se grande abundância do gênero *Pseudomonas* na rizosfera de DL4 ([HEUER et al., 2002](#)). Os autores desse trabalho destacaram que fatores ambientais tiveram maior influência sobre a estrutura da comunidade microbiana do que a natureza transgênica das plantas. As diferenças apresentadas pela linhagem DL4 parecem estar mais ligadas a outras características dessas plantas que apresentaram biomassa radicular significativamente reduzida, colmos mais curtos e folhas menores em plantas jovens, além de um progresso mais rápido de senescência em plantas mais velhas.

Nesta série de estudos, em que foram aplicados métodos dependentes do cultivo dos microrganismos e métodos independentes de cultivo (métodos de biologia molecular), foram detectadas diferenças no número e na diversidade das bactérias, no entanto, esses efeitos não pareceram ser resultado direto da produção da lisozima ([LOTTMANN; BERG, 2001](#); [HEUER et al., 2002](#)). Os autores concluíram que o efeito da lisozima foi apenas um fator menor comparado às mudanças naturais que ocorreram nas comunidades microbianas dos solos ([HEUER et al., 2002](#)). Essa conclusão foi baseada em resultados de vários projetos relacionados, oferecendo uma quantidade robusta de dados, em razão da natureza polifásica das metodologias aplicadas, da utilização de controles (testemunhas) necessários e de análises ao longo de várias épocas e anos.

[Cowgill et al. \(2002\)](#) estudaram o efeito, sobre microrganismos do solo, do cultivo de plantas de batata transgênica com expressão de cistatinas (inibidores cisteína proteinase) que conferem resistência parcial ao nematóide-de-cisto. No primeiro ano de estudo, foram avaliadas duas linhagens transgênicas (D6/7 e D5/13) que continham seqüências que codificavam para uma cistatina presente em ovos de galinha (CEWc) ([URWIN et al., 2001](#)). Já no segundo ano, a linhagem transgênica (D9/31) continha uma versão modificada da cistatina encontrada em arroz (Oc-IDD86) ([URWIN et al., 2001](#)). Também, no segundo ano, foram feitas comparações entre o cultivo da linhagem transgênica e a utilização de nematicidas à base de carbamato. Durante os dois anos, a cultivar Désirée, não transformada, foi utilizada como controle. As plantas foram cultivadas em solo infestado com nematóides-de-cisto das espécies *Globodera pallida* e *G. rostochiensis*. A atividade (medida por meio da respiração basal) e estrutura da comunidade microbiana (análise do perfil de ácidos graxos) foram avaliadas em três diferentes coletas durante o crescimento da cultura.

Os resultados do trabalho descrito anteriormente revelaram que, no primeiro ano de estudo, não houve diferenças quanto ao total de ácidos graxos ou atividade microbiana entre solos coletados sob cultivo de plantas transgênicas ou o controle não transformado. No entanto, foi observada alteração na estrutura da comunidade microbiana em algumas situações. Na última coleta, a quantidade de ácidos graxos relativos a fungos foi incrementada na rizosfera da linhagem D6/7, porém, não foram encontrados ácidos graxos de fungos em solo da rizosfera da linhagem D5/13, sugerindo que o crescimento de fungos foi significativamente inibido pelo cultivo dessa linhagem ([COWGILL et al., 2002](#)). No segundo ano de estudo, a quantidade total de ácidos graxos foi reduzida nos tratamentos com plantas transgênicas ou onde o carbamato foi aplicado. Os ácidos graxos relacionados aos fungos foram reduzidos apenas nos tratamentos com plantas transgênicas, enquanto aqueles relacionados a bactérias foram reduzidos em ambos os tratamentos: plantas transgênicas ou carbamato. No entanto, a maior parte das variações foi atribuída aos períodos de coleta. Os autores não souberam explicar como as cistatinas produzidas pelas plantas transgênicas apresentaram efeitos adversos sobre os microrganismos. Eles sugerem, no entanto, que as alterações observadas, provavelmente, sejam resultado de alterações na composição de exsudados radiculares das plantas transgênicas e não da inibição da atividade de proteinases microbianas.

[Vierheilig et al. \(1993\)](#) estudaram os efeitos de plantas transgênicas da espécie *Nicotiana sylvestris* sobre organismos específicos, importantes para a cultura. Essas plantas foram transformadas para a expressão de quitinase, visando melhorar suas defesas contra fungos fitopatogênicos que contenham quitina. No entanto, fungos benéficos, como os fungos micorrízicos, também poderiam ser afetados. Para testar essa hipótese, plantas transgênicas de *Nicotiana sylvestris* foram inoculadas com fungos micorrízicos (*Glomus mosseae*), fungos fitopatogênicos (*Rhizoctonia solani*) ou os dois microrganismos. Os níveis de infecção foram estimados com a utilização de um estereomicroscópio de acordo com o método das interseções. As plantas modificadas tiveram redução na susceptibilidade à colonização pelo patógeno de raízes, *R. solani*, mas foram normalmente colonizadas pelo fungo micorrízico. Esses efeitos distintos, provavelmente, derivam das diferenças de susceptibilidade da quitina das paredes celulares desses fungos.

[Turrini et al. \(2004\)](#) avaliaram os efeitos de plantas de berinjela (*Solanum melongena*) transformadas para a expressão de uma proteína antifúngica (Dm-AMP1), conhecida como defensina. As plantas transformadas foram resistentes

ao fungo patogênico *Botrytis cinerea* cujo desenvolvimento nas folhas foi reduzido de 36% a 100%, em comparação com as plantas-controle não transformadas. Em bioensaios feitos no laboratório, mostrou-se que a defensina foi liberada por exsudados radiculares das plantas transgênicas, o que não interferiu no estabelecimento da simbiose com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus mosseae*, por sua vez, o crescimento do fungo patogênico *Verticillium albo-atrum* foi reduzido (49% -71%). Os autores afirmam que as razões de o fungo micorrízico não ter sido afetado pela defensina ainda devem ser estudadas. No entanto, como as defensinas estão entre vários compostos de defesa produzidos por diferentes plantas, há hipóteses de que os fungos micorrízicos arbusculares tenham desenvolvido tolerância a esse tipo de proteína.

Plantas transgênicas visando resistência a pragas

Muitas espécies de plantas importantes para a agricultura têm sido transformadas para produção de endotoxinas originárias de diferentes subespécies da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Apesar de a maioria dessas toxinas apresentar alta especificidade, seus efeitos em organismos não-alvo ainda não foram completamente avaliados. A toxina do milho *Bt*, por exemplo, é introduzida no solo através da exsudação radicular e incorporação dos resíduos da cultura após a colheita. Uma vez no solo, essa toxina pode apresentar efeitos diretos sobre a comunidade microbiana, o que ainda não foi comprovado ou efeitos indiretos, pois a ação inseticida da toxina pode interferir em populações específicas da fauna do solo que estão associadas a populações de microrganismos.

Alguns estudos foram conduzidos visando observar os possíveis efeitos do cultivo de plantas de milho transgênico contendo o gene *Cry1Ab* de *B. thuringiensis* que codifica para a produção de uma proteína inseticida que mata pragas da ordem lepdoptera. Um dos resultados apresentados nesses estudos destaca que a toxina inseticida originária dos exsudados de raízes, assim como do pólen e resíduos das culturas, podem ligar-se rapidamente a minerais de argila, ácidos húmicos e complexos organo-minerálicos que protegem a toxina da degradação microbiana (SAXENA et al., 2002). A toxina ligada retém sua atividade inseticida e sua persistência no solo e pode ser observada até 234 dias (SAXENA et al., 1999). Como resultado de sua ligação a superfícies de partículas do solo, as toxinas podem ser acumuladas no ambiente em concentrações que poderiam constituir malefícios para organismos não-alvo,

entre eles os microrganismos. Todavia, a presença da toxina inseticida de culturas *Bt*, geralmente, não tem mostrado ter efeitos significativos sobre as populações de organismos do solo. [Saxena e Stotzky \(2001a\)](#) não observaram nenhum efeito aparente da toxina de milho *Bt* aderida aos solos em minhocas, nematóides, protozoários, bactérias (incluindo actinomicetos) e fungos.

[Flores et al. \(2005\)](#) conduziram um estudo para comparar a decomposição, no solo, da biomassa de plantas transgênicas *Bt* comparada com plantas não transgênicas. Os resultados obtidos apontam para uma menor decomposição das plantas *Bt*. Os autores destacam que, aparentemente, isso não foi resultado de inibição da atividade dos microrganismos do solo, já que as populações de bactérias e fungos, assim como a atividade de enzimas representativas daquelas que estão envolvidas no processo de decomposição, não foram consistentes ou significativamente diferentes entre as plantas transgênicas e não transgênicas. As razões para a menor biodegradação da biomassa de plantas *Bt* ainda não é conhecida, no entanto, no caso do milho, [Saxena e Stotzky \(2001b\)](#) mostraram que plantas *Bt* apresentaram maiores teores de lignina quando comparadas com suas isólinhas não transgênicas e, logicamente, isto pode ter influência as taxas de decomposição da biomassa dessas plantas. Essas diferenças podem ser resultado de um efeito inesperado da transgenia, uma vez que a introdução do DNA que codifica a toxina *Bt* não deveria estar interferindo na síntese de lignina ([RUMJANEK; FONSECA, 2003](#)). A relevância ambiental e ecológica dessas observações também não é clara. A menor decomposição da biomassa de plantas *Bt* poderia trazer benefícios, já que a matéria orgânica derivada dessas plantas poderia persistir por mais tempo e acumular em altos níveis no solo, podendo melhorar sua estrutura e reduzir a erosão. Em contraste, a persistência da biomassa dessas plantas poderia estender o tempo em que as toxinas estariam presentes no solo, aumentando a possibilidade de prejuízos a organismos não-alvo e a seleção de insetos-praga resistentes à toxina ([FLORES et al., 2005](#); [FERRÉ et al., 1995](#)).

Plantas transgênicas resistentes a herbicidas (glifosato)

Efeito do glifosato sobre a comunidade microbiana do solo

O glifosato é o herbicida mais utilizado no mundo, existindo aproximadamente 90 marcas comerciais com esse ingrediente ativo. Um efeito em potencial da aplicação de herbicidas com glifosato como princípio ativo é o estímulo ou a inibição da

comunidade microbiana e dos processos por ela mediados. De modo geral, herbicidas aplicados nos solos afetam potencialmente a microbiota do solo, como acontece com qualquer composto químico introduzido em um ambiente natural.

Na planta, o glifosato inibe a síntese dos aminoácidos aromáticos (fenil-alanina, tirosina e triptofano) pelo bloqueio da enzima 5-enol-piruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) que cataliza a condensação do ácido chiquímico com fosfo-enol-piruvato ([STEINRUCKEN; AMRHEIN, 1980](#)). A base de resistência das plantas de soja transgênicas ao glifosato é a inserção do gene de resistência EPSPS da *Agrobacterium* estirpe CP4 que permite a expressão funcional da via do ácido chiquímico ([PADGETTE et al., 1995](#)).

O efeito tóxico do glifosato sobre as comunidades microbianas do solo pode ocorrer em virtude da paralisação da síntese dos aminoácidos aromáticos nos microrganismos que possuem a mesma enzima sensível que as plantas. Todavia, ao contrário dos resultados obtidos em laboratório, a aplicação de glifosato na maioria dos experimentos de campo não mostra efeito ou apresenta pequeno estímulo aos microrganismos do solo ([BUSSE et al., 2001](#)). Essa discrepância entre os resultados de estudos pode ser explicada parcialmente pelas altas concentrações de herbicidas utilizadas em grande parte dos trabalhos em laboratório. As diferenças na toxicidade do glifosato entre os meios de cultura artificiais e o solo aparentemente refletem sua natureza química, sua toxicidade e característica de um composto polar que pode ser rapidamente inativado nos solos pela adsorção físico-química ([BUSSE et al., 2001](#)).

[Busse et al. \(2001\)](#) utilizaram diferentes estratégias para avaliar os possíveis efeitos tóxicos do glifosato sobre a comunidade microbiana do solo, utilizando áreas de plantio de pinheiros que incluíam tratamentos com histórico de 13 anos com aplicações anuais de glifosato. Os efeitos diretos do glifosato sobre a comunidade microbiana dos solos estudados foram avaliados com a utilização de meios de cultura com diferentes concentrações de glifosato (0, 25, 50 e 500 mM). Essa adição do glifosato ao meio de cultura resultou na redução do número de bactérias cultiváveis e fungos obtidos das amostras de solo dos plantios de pinheiros. Nesse mesmo trabalho, a respiração dos solos foi medida em bioensaios no laboratório 10 dias após a aplicação de glifosato como ingrediente ativo (0, 5, 50, 500 mg kg⁻¹) ou formulação comercial (0, 5, 50, 500, 5000 mg ia kg⁻¹). Diferentemente do que ocorreu nos estudos com meio de cultura, o glifosato, quando aplicado em concentrações equivalentes àquelas recomendadas

no campo, não apresentou efeitos sobre a respiração do solo, que foi estimulada quando concentrações mais elevadas foram utilizadas. Esse estímulo pode ter sido a expressão de populações de organismos capazes de degradar o glifosato quando saturado.

Nos trabalhos de campo, as características microbiológicas do solo na profundidade de 0 a 10 cm, geralmente, foram inalteradas após nove ou treze anos de uso contínuo do glifosato ([BUSSE et al., 2001](#)). Os efeitos do glifosato foram mínimos quando comparados aos efeitos das áreas (diferenças entre solos) e datas de coletas que mostraram maior influência sobre o tamanho das populações e sua atividade. Esses experimentos de campo incluíram comparações entre solos com diferentes quantidades de argila, óxidos e matéria orgânica, em plantações de pinheiros que variavam de pouco a muito produtivas, no norte do Estado da Califórnia (EUA). Em geral, os resultados foram consistentes para todos os índices, solos e datas de coleta e mostraram que, aplicações simples ou repetidas de glifosato, nas concentrações recomendadas, tiveram pouco efeito sobre as comunidades microbianas.

Efeito da aplicação de glifosato sobre a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) na soja

O cultivo comercial da soja tolerante ao herbicida glifosato (também denominada Round up Ready ou soja RR) teve início em 1996 nos EUA, abrindo novas oportunidades para o controle de ervas daninhas na cultura. Em 2003, o cultivo da soja RR ocupou 81% da área cultivada com essa cultura nos EUA e, na safra 2004/2005, estima-se que cerca 9,4 milhões de hectares foram semeados com soja transgênica resistente ao herbicida glifosato no Brasil ([JAMES, 2005](#)).

Com a introdução das cultivares transgênicas no Brasil, o glifosato é aplicado diretamente na cultura da soja, potencializando sua interferência no funcionamento da simbiose com o bradirizóbio, uma vez que, a enzima-alvo desse herbicida, também está presente nas células bacterianas. O glifosato que chega às folhas pode ser rapidamente translocado para as raízes, podendo também ser acumulado nos nódulos ([REDDY; ZABLOTOWICZ, 2003](#)), o que pode facilitar o contato do herbicida com as células das bactérias fixadoras de nitrogênio.

A possibilidade de inibição da fixação biológica de nitrogênio (FBN), principalmente no caso da soja, gera preocupação quando se trata da aplicação de glifosato sobre as culturas e o solo. Das leguminosas produtoras de grãos, a

soja é a de maior importância econômica e a que recebe maior contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Anualmente, no Brasil, a economia pela não-aplicação de fertilizantes nitrogenados nessa cultura pode chegar até 10 bilhões de dólares. A FBN também traz benefícios ao meio ambiente, reduzindo o uso de combustíveis fósseis e a contaminação dos recursos hídricos, proporcionada pela diminuição do uso de fertilizantes nitrogenados. Portanto, estudos que avaliem os riscos sobre a FBN, associados à utilização de plantas transgênicas de soja resistentes ao glifosato, são muito importantes. A seguir serão apresentados alguns exemplos de trabalhos nesse sentido.

[Jaworski \(1972\)](#), conduzindo estudos em meio de cultura (*in vitro*) verificou que o crescimento de *B. japonicum* era inibido na presença de baixas concentrações de glifosato (da ordem de 0,01 e 1,0 mM). [Morman et al. \(1992\)](#) verificaram, também, em estudos *in vitro*, que a inibição do crescimento por glifosato era diferenciada entre três estirpes de *B. japonicum* (USDA 110, USDA 123 e USDA 138). Na concentração de 0,5 mM, o crescimento das estirpes USDA 123 e USDA 138 foi moderadamente inibido pelo glifosato (12% e 19% respectivamente), enquanto a estirpe USDA 110 teve seu crescimento inibido em 47%. A concentração de 5 mM de glifosato resultou na morte das estirpes.

[Jacques et al. \(2003\)](#) avaliaram, em um estudo conduzido no Brasil, o efeito do princípio ativo e de sete formulações comerciais de glifosato no crescimento das estirpes de *B. elkanii* SEMIA 587 e 29W e da estirpe de *B. japonicum* CPAC 15. O crescimento das três estirpes *in vitro* foi reduzido tanto na presença do princípio ativo quanto na das formulações de glifosato, sendo que a magnitude dessa redução variou conforme a estirpe e a formulação. Na verdade, todas as formulações comerciais aumentaram a toxicidade do herbicida. Foi sugerido que os efeitos inibitórios das formulações comerciais de glifosato no crescimento das estirpes fossem potencializados devido à presença de diferentes substâncias químicas nessas formulações, tais como solventes, surfactantes e agentes molhantes que podem modificar o efeito do ingrediente ativo sobre os microrganismos ([MALKOMES, 2000](#); [KISHINEVSKY, 1988](#)). Contudo, conforme vem sendo enfatizado, estudos *in vitro* podem apresentar pouca relação com a resposta a campo.

Vários microrganismos do solo ([JACOB et al., 1988](#); [PIPKE et al., 1987](#)), inclusive, membros da ordem Rhizobiales são capazes de metabolizar o glifosato, por exemplo, *Rhizobium meliloti* (agora reclassificado como *Sinorhizobium*

meliloti), *R. trifolii* (agora *R. leguminosarum* bv. *trifolii*), *R. leguminosarum* (estirpe 300 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*), *R. galega* (agora *R. galegae*), *Agrobacterium rhizogenes* e *A. tumefaciens* (LIU et al., 1991). Além disso, herbicidas à base de glifosato são, em geral, considerados de vida relativamente curta no solo, onde dificilmente apresentarão a mesma toxidez observada em estudos de laboratório. Sendo assim, experimentos em casa de vegetação e no campo são necessários para validar os resultados obtidos em laboratório.

[Reddy et al. \(2000\)](#) apresentaram resultados de dois estudos feitos em casa de vegetação. Em um deles, a aplicação de uma dose de glifosato equivalente a 0,84 kg ia ha⁻¹ reduziu significativamente o número de nódulos (28%), a massa de nódulos (47%) e o conteúdo de leg-hemoglobina (13%), no entanto, a aplicação de 1,68 kg ia ha⁻¹ não provocou efeitos negativos sobre a nodulação. No outro estudo, a aplicação de glifosato logo após o plantio (14 dias) não representou efeitos sobre a nodulação independente da dose utilizada. Todavia, a aplicação tardia de uma dose de 1,68 kg ia ha⁻¹, três semanas depois do plantio, promoveu redução no número de nódulos (30%), na massa de nódulos (39%), no conteúdo de leg-hemoglobina e no conteúdo total de N na parte aérea (14%).

Os efeitos de uma aplicação (no estágio V2 das plantas de soja) ou duas aplicações (V2 e V4) de quatro diferentes formulações de sais de glifosato sobre a nodulação de plantas de soja transgênicas resistentes foram avaliados no campo por [Reddy e Zablotowicz \(2003\)](#). Nesse estudo, com dois anos de duração, o número de nódulos não foi afetado, porém, a massa de nódulos foi reduzida significativamente (21% a 28%) em todos os tratamentos onde houve aplicação de glifosato. Nos tratamentos com duas aplicações dos herbicidas, o conteúdo de leg-hemoglobina também foi reduzido (8% a 10%). Os autores sugerem que redução na massa dos nódulos e nos conteúdos de leg-hemoglobina sem a diminuição no número de nódulos indica que o glifosato poderia estar inibindo o desenvolvimento dos nódulos, mas não a sua formação. No entanto, esses pesquisadores mostraram que, mesmo que a aplicação do glifosato pudesse reduzir o desenvolvimento dos nódulos, os efeitos seriam mínimos, e as variedades de soja avaliadas teriam potencial para superar os curtos períodos de estresse que poderiam ocorrer após a aplicação do herbicida.

[King et al. \(2001\)](#) publicaram um trabalho contendo vários estudos envolvendo experimentos em câmaras de crescimento, casa de vegetação e campo. Em um dos estudos feitos em casa de vegetação, a aplicação de glifosato (1,26 kg ia ha⁻¹)

aos 5 e aos 12 dias após a emergência (DAE) das plantas, reduziu significativamente a massa de nódulos (34%) das plantas de soja transgênica TV5866RR coletadas aos 19 DAE. Entretanto, quando esse mesmo experimento foi repetido, a massa de nódulos não foi afetada. O conteúdo de nitrogênio total das raízes e parte aérea foi reduzido (35%) em ambos os estudos. No entanto, quando as plantas foram colhidas aos 40 DAE, os efeitos evidentes das aplicações de glifosato desapareceram, mostrando que as plantas tiveram capacidade de se recuperar daquele efeito inicial.

Ainda no trabalho de [King et al. \(2001\)](#), com quatro estudos em câmara de crescimento, foram avaliados os efeitos de múltiplas aplicações foliares de glifosato sobre a atividade da nitrogenase (enzima responsável pela FBN) nessas plantas. Foram feitas três aplicações de glifosato aos 5, 12 e 19 DAE, e a atividade de redução do acetileno (ARA) foi determinada aos 14, 21 e 28 DAE. Reduções significativas na ARA (12% a 20%) foram observadas em três dos quatro estudos aos 21 DAE, mas, somente em um deles, nas avaliações aos 14 e 28 DAE. Os efeitos do *deficit* hídrico sob a ARA em plantas na qual o glifosato foi aplicado também foram avaliados. Plantas com aplicação de glifosato, quando comparadas ao controle sem aplicação, mostraram uma ARA mais sensível ao estresse hídrico.

[King et al. \(2001\)](#) também avaliaram os efeitos de vários regimes de herbicida sobre o acúmulo de biomassa e a produção de grãos em duas variedades de soja transgênica plantadas em duas áreas diferentes. Na área onde houve maiores quantidades de chuva e irrigação, nenhum efeito da aplicação de glifosato foi observado. Todavia, na área onde ocorreu estresse hídrico, reduções significativas na biomassa da parte aérea (92 DAE) foram observados nos três tratamentos com glifosato e no tratamento com os herbicidas convencionais (acifluorfen e benzon) na cultivar AR5901RR. Redução significativa na produtividade (24,6%) foi observada apenas nos tratamentos que receberam glifosato aos 7 e 21 DAE. Nessa mesma área, a variedade DK5961RR também sofreu redução significativa na produtividade (23,6%), quando os tratamentos receberam glifosato aos 7 e 49 DAE, porém, não foram observados efeitos sobre a biomassa da parte aérea.

Em um trabalho mais recente, [Zablotowicz e Reddy \(2004b\)](#) estudaram novamente, durante dois anos (2002 e 2003), os efeitos do glifosato na FBN, na assimilação de nitrogênio e na produtividade da soja transgênica. Cinco

tratamentos (doses) com glifosato (0,84; 1,68; 2,52; 0,84 + 0,84; 2,52 + 2,52 kg ia ha⁻¹) aplicados quatro e seis semanas depois do plantio foram comparados com um controle livre de ervas daninhas. Plantas de soja foram coletadas na quarta e na oitava semanas após o plantio. As raízes foram separadas para análise da atividade da nitrogenase pela metodologia da atividade de redução do acetileno (ARA). Também, nas raízes foram, avaliadas a respiração e a nodulação, enquanto as folhas tiveram seu conteúdo de nitrogênio analisado. Nenhum efeito consistente da aplicação de glifosato foi observado nas análises de ARA ou respiração. No entanto, nas análises feitas em 2002, em que os autores relatam a existência de estresse hídrico, todos os tratamentos com glifosato tiveram o conteúdo de N foliar reduzido entre 26% e 42%. Em 2003, três dos tratamentos com glifosato também diminuíram o conteúdo de N nas folhas (9% – 14%) e, como em 2002, as maiores reduções ocorreram quando foram aplicadas as maiores doses de glifosato. A produtividade de soja, comparada com o controle não tratado com glifosato, foi reduzida em 11% pela aplicação de duas doses de 2,52 kg ia ha⁻¹ no ano de 2002, mas, em 2003 a produtividade não foi afetada. O N total dos grãos de soja tratados com 2,52 kg ia ha⁻¹ foi reduzido em 32% e 17% nos anos de 2002 e 2003 respectivamente. Os autores concluíram que a assimilação de nitrogênio nas plantas de soja transgênica diminuiu, principalmente, sob as doses mais elevadas de glifosato. Essa redução foi ainda maior em situação de estresse hídrico.

Apesar de os trabalhos mostrarem indícios de que as aplicações de glifosato podem interferir na FBN em plantas de soja transgênica, a verdadeira magnitude dessa interferência ainda não é conhecida. Os próprios autores desses trabalhos afirmam que tais efeitos são inconsistentes em estudos de campo ([ZABLOTOWICZ; REDDY, 2004a](#)). Dada a importância da soja no agronegócio e a representatividade da FBN na cultura, os estudos devem ser criteriosos, envolvendo diferentes situações edafoclimáticas, genótipos do macro e microsimbiontes e tomando-se cuidado na escolha dos controles e dos delineamentos experimentais. A quantificação da FBN por técnicas como a análise de ureídeos ou abundância natural de ¹⁵N em estudos de campo, também podem trazer mais informações que ajudariam a verificar com maior precisão os possíveis efeitos de aplicações de glifosato sobre a FBN em plantas de soja geneticamente modificadas resistentes a herbicidas.

Efeito da transformação de plantas resistentes a herbicidas sobre a comunidade microbiana do solo

Para avaliar se a introdução do gene EPSPS resistente da *Agrobacterium* promoveria alterações nas plantas que poderiam influenciar a microbiota do solo rizosférico, [Dunfield e Germida \(2001\)](#) compararam quatro variedades de canola transgênica resistentes a herbicida com quatro variedades convencionais que foram cultivadas em quatro diferentes localidades no Canadá. A comunidade microbiana da rizosfera dessas plantas foi caracterizada durante três anos com a utilização das metodologias de análise do perfil de ácidos graxos (FAME) e padrões catabólicos das comunidades microbianas (Biolog - PCCM). Nenhuma das variedades de canola afetou significativamente o número total de unidades formadoras de colônia da rizosfera e do interior das raízes. Entretanto, os resultados apresentados indicaram que a variedade transgênica Quest mostrou uma comunidade microbiana, associada a sua rizosfera, diferente das demais variedades estudadas (transgênicas e não transgênicas). É importante ressaltar que a variedade Quest é a única resistente a glifosato, sendo as outras três resistentes ao glufosinato de amônio.

Em 2003, Dunfield e Germida publicaram outro trabalho semelhante, avaliando a comunidade microbiana do solo sob uma variedade geneticamente modificada (Quest), uma variedade convencional (Excel) e o solo não cultivado. Em dois anos de estudo, em duas áreas diferentes, foram feitas, a cada ano, seis coletas ao longo do desenvolvimento da cultura. Desta vez, além do PCCM e do FAME, foi incluída a técnica de análise de restrição dos fragmentos terminais do DNA ribossomal (T-ARDRA) que permite acessar informações sobre a porção não-cultivável da comunidade microbiana. Os resultados apresentados sugerem que as diferentes variedades tiveram influência significativa sobre as análises de PCCM, FAME e T-ARDRA. Todavia, as alterações na estrutura das comunidades microbianas em solos sob plantas de canola transgênicas não foram permanentes. As diferenças observadas foram dependentes da época de amostragem, por isso, as comunidades não foram diferentes ao longo de todo o desenvolvimento da planta.

Nesses estudos, a variedade (Quest) não foi comparada com sua parental não transgênica, portanto, não fica claro se essas diferenças foram causadas pela modificação genética ([LYNCH et al., 2004](#)). Essas diferenças provavelmente sejam decorrentes de alterações não esperadas e indicam que, nesse caso, não existe apenas o efeito do gene inserido, mas de outras alterações no genoma da planta

que precisam ser objeto de investigação. A caracterização de exsudados radiculares e estudos adicionais com mais variedades glifosato-tolerantes poderiam ser interessantes para confirmação do que foi observado nesses trabalhos.

Transferência horizontal de genes

A transferência horizontal é a transferência do material genético entre células ou genomas pertencentes a espécies diferentes. Dependendo da natureza do transgene a ser introduzido no ambiente, pode ser importante o monitoramento da transferência horizontal de genes, especialmente, em populações microbianas com estreita relação com as plantas. Alguns estudos, em laboratório, já demonstraram a possibilidade da transferência horizontal de genes de organismos geneticamente modificados (OGMs) para microrganismos nativos do solo ([NIELSEN et al., 2000](#)). No entanto, esse fenômeno ainda não foi relatado em experimentos de campo ([DUNFIELD; GERMIDA, 2004](#)).

Para que ocorra transferência horizontal de genes de plantas transgênicas para as bactérias do solo, o DNA liberado dos tecidos e as células da planta devem estar disponíveis no solo e bastante próximos de bactérias competentes. Isso se traduz em fator bastante limitante para a ocorrência dessa transferência de genes. Somando-se ao fato da rápida degradação inicial que o DNA das plantas sofre no ambiente, a frequência da possível transferência de algum de seus genes para os microrganismos provavelmente é bastante baixa, sendo restrita a micro-habitats que contêm resíduos de tecidos dessas plantas e DNA complexado em partículas do solo ([GEBHARD; SMALLA, 1999](#); [DUNFIELD; GERMIDA, 2004](#)). A persistência do DNA da planta no solo está relacionada a vários fatores abióticos e bióticos, como conteúdo e tipos de minerais de argila e presença de DNase ([GENHARD; SMALLA, 1999](#)).

Os métodos para monitorar a transferência horizontal de genes em amostras ambientais são considerados pouco sensíveis. Segundo estimativas, para ser relevante, a análise de risco dessa transferência de genes nos solos deveria permitir a detecção de transformações a frequências menores que 10^{-17} . Obviamente, nenhum trabalho publicado até hoje mostrou esse poder ([HEINEMANN; TRAAVIK, 2004](#)). [Heinemann e Traavik \(2004\)](#) acreditam que a possibilidade da transferência horizontal de genes e suas conseqüências têm sido minimizadas em discussões sobre o risco do uso de plantas transgênicas. Ao

contrário de outros pesquisadores, eles afirmam que novas metodologias, mais sensíveis e representativas para o monitoramento da transferência horizontal de genes no ambiente, devem ser desenvolvidas urgentemente.

Quando a transferência horizontal de genes é considerada em análises de risco, deve-se levar em conta não apenas a possibilidade da transferência em si, como também uma análise crítica de suas conseqüências para a saúde e o ambiente. Em se tratando de segurança ambiental, deve ser considerado o tipo de impacto em um contexto ecológico e geográfico. No caso de plantas transgênicas que expressam as toxinas Bt, por exemplo, a presença natural de *Bacillus thuringiensis* nos solos foi considerada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA) como fator que reduz o impacto da utilização dessas plantas, mesmo se ocorresse transferência horizontal de genes para os microrganismos do solo ([MENDELSON et al., 2003](#)).

Considerações Finais

[Bruinsma et al. \(2003\)](#) destacam que, para que se possa melhorar o entendimento acerca desses resultados, é preciso avançar no conhecimento das comunidades microbianas do solo, pois, ainda não se conhecem completamente todos os aspectos funcionais dessas comunidades e temos um conhecimento limitado das variações naturais que ocorrem em repostas a fatores como clima, rotação de culturas, uso de fertilizantes. [Motavalli et al. \(2004\)](#) afirmam que até o momento, nenhuma evidência conclusiva foi apresentada mostrando que o cultivo de plantas transgênicas esteja causando efeitos significativos sobre os processos que ocorrem nos solos.

[Dunfield e Germida \(2004\)](#) concluíram, após revisão de vários trabalhos, que os resultados encontrados parecem indicar que a diversidade microbiana pode ser alterada quando associada com plantas transgênicas. No entanto, esses efeitos são menores em comparação com os efeitos proporcionados por fatores como o solo e o clima. Trabalhos futuros, sobre os efeitos do cultivo de plantas transgênicas sobre os microrganismos do solo, devem envolver experimentos de longa duração e comparações não apenas com o cultivo de plantas não transgênicas, mas também com outras alterações aceitáveis nos agroecossistemas, como o cultivo de nova cultura não transgênica ou a utilização de uma prática de manejo diferente.

Todos concordam que existem perigos em potencial e que há necessidade de regulamentação para que tais perigos sejam medidos de forma comparativa e adequada, visando decidir sobre o seu risco. Entretanto, não se pode esquecer que as decisões sobre biossegurança terão de ser tomadas na ausência de um conhecimento completo sobre todos os efeitos benéficos e adversos que envolvem os organismos geneticamente modificados (OGM). Se houver algum risco, as medidas regulatórias devem permitir a decisão de como manejá-lo ou contê-lo.

Buscando atender a demanda por conhecimentos relacionados à biossegurança de plantas transgênicas, a Embrapa iniciou em 2002 uma rede de pesquisa dedicada a avaliar tanto a segurança alimentar como o impacto ambiental advindos do uso dessa tecnologia. Essa rede multidisciplinar de pesquisa (Rede de Biossegurança de OGM da Embrapa - BioSeg) tem entre seus objetivos: desenvolver e implementar protocolos de biossegurança, envolvendo capacidades já instaladas no País; promover a comunicação científica entre áreas de conhecimento complementares; favorecer uma revisão rápida e freqüente das metodologias e análises propostas para avaliação de OGMs. Os trabalhos que têm englobado aspectos de segurança ambiental avaliam a possibilidade de impacto de cada OGM sobre organismos alvo e não-alvo, além da biodiversidade associada à cultura. São considerados os efeitos no ambiente, acima e abaixo do solo, levando-se em consideração aspectos como os sistemas de produção e o agroecossistema específico de cada cultura.

A prática da agricultura representa impacto inevitável sobre o ambiente, portanto, é necessário buscar o melhor balanço entre a produção agrícola, a biodiversidade e as preocupações dos consumidores. Neste contexto, não se pode ignorar os avanços da biotecnologia, procurando utilizá-los de maneira eficiente, responsável e segura.

Referências

- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4. ed. San Francisco: Benjamin/Cummings Science, 1998. p. 99-140 e 332-459.
- BODDY, L.; WATKINSON, S. C. Wood decomposition, higher fungi, and their role in nutrient redistribution. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. S1377-S1383, 1995.

- 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**, Berlin, v. 37, p. 329-337, 2003.
- BUSSE, M. D.; RATCLIFF, A. W.; SHESTAK, C. J.; POWERS, R. F. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1777-1789, 2001.
- CELLINI, F.; CHESSON, A.; COLQUHOUN, I.; CONSTABLE, A.; DAVIES, H. V.; ENGEL, K. H.; GATEHOUSE, A. M. R.; KARENLAMPI, S.; KOK, E. J.; LEGUAY, T. J.; LEHESRANTA, S.; NOTEBORN, H. P. J. M.; PEDERSEN, J.; SMITH, M. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 42, p. 1089-1125, 2004.
- COWGILL, S. E.; BARDGETT, R. D.; KIEZEBRINK, D. T.; ATKINSON, H. The effect of transgenic nematode resistance on non-target organisms in the potato rhizosphere. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 39, p. 915-923, 2002.
- DE VRIES, J.; HARMS, K.; BROER, I.; KRIETE, G.; MAHN, A.; DURING, K.; WACKERNAGEL, W. The bacteriolytic activity in transgenic potatoes expressing the T4 lysozyme gene and the effect of T4- and hen egg-white lysozyme on soil and phytopatogenic bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 22, p. 280-286, 1999.
- DONEGAN, K. K.; PALM, C. J.; FIELAND, V. J.; PORTEUS, L. A.; GANIO, L. M.; SCHALLER, D. L.; BUCAO, L. Q.; SEIDLER, R. J. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki endotoxin. **Applied Soil Ecology**, Columbus, v. 2, p. 111-124, 1995.
- DUNFIELD, K. E.; GERMIDA, J. J. Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 38, p. 806-815, 2004.
- DUNFIELD, K. E.; GERMIDA, J. J. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, p. 7310-7318, 2003.
- 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**, Aberdeen, v. 82, p. 1-9, 2001.

DÜRING, K.; PORSCHE, P.; FLADUNG, M.; LORZ, H. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. **Plant Journal**, Oxford, v. 3, p. 587-598, 1993.

FERRÉ, J.; ESCRICHE, B.; BEL, Y.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal protein. **FEMS Microbiology Letters**, Birmingham, v. 132, p. 1-7, 1995.

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

GARLAND, J. L.; MILLS, A. L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole-carbon-source-utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 57, p. 2351-2359, 1991.

GEBHARD, F.; SMALLA, K. Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. **FEMS Microbiology Ecology**, Aberdeen, v. 28, p. 261-271, 1999.

GYAMFI, S.; PFEIFER, U.; STIERSCHNEIDER, M.; SESSITSCH, A. Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Aberdeen, v. 41, p. 181-190, 2002.

HEINEMANN, J. A.; TRAAVIK, T. Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 22, p. 1105-1109, 2004.

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

HOOPER, A. B. Biochemistry of the nitrifying litho-autotrophic bacteria. In: SCHLEGEL, H. G.; BOWIEN, B. (Ed.). **Autotrophic bacteria**. Berlin: Springer, 1990. p. 239-265.

JACOB, G. S.; GARBOW, J. R.; HALLAS, L. E.; KIMACK, N. M.; KINSHORE, G. M.; SCHAEFER, J. Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* strain LBr. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 54, p. 2953-2958, 1988.

JACQUES, R. J. S.; SANTOS, J. B.; PROCÓPIO, S. O.; KASUYA, M. C. M.; SILVA, A. A.; SANTOS, E. A. Efeito das diferentes formulações do herbicida glifosato no crescimento do rizóbio da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto: UNESP: SBCS, 2003. 1 CD-ROM.

JAMES, C. Situação global da comercialização das lavouras GM. In: **ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications)**, Sumário executivo, Brief 34-2005. Ithaca: ISAAA, 2005. 12 p. Disponível em: <[www.isaaa.org/kc/CBTNews/press_release/briefs34/ESummary/Executive%20Summary%20\(Portuguese\).pdf](http://www.isaaa.org/kc/CBTNews/press_release/briefs34/ESummary/Executive%20Summary%20(Portuguese).pdf)> Acesso em: 1 abr. 2006.

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

KING, C. A.; PURCELL, L. C.; VORIES, E. D. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to foliar glyphosate applications. **Agronomy Journal**, Madison, v. 93, p. 179-186, 2001.

KISHINEVSKY, B.; LOBEL, R.; LIFSHITZ, N.; GURFEL, D. Effects of some commercial herbicides on rhizobia and their symbiosis with peanuts. **Weed Science**, Champaign, v. 28, p. 291-296, 1988.

LIU, C. M.; MC LEAN, P. A.; SOOKDEO, C. C.; CANNON, F. C. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 57, p. 1799-1804, 1991.

LOTTMANN, J.; BERG, G. Phenotypic and genotypic characterisation of antagonistic bacteria associated with roots of transgenic and non-transgenic potato plants. **Microbiological Research**, Jena, v.156, p. 75-82, 2001.

LOTTMANN, J.; HEUER, H.; DE VRIES, J.; MAHN, A.; DURING, K.; WACKERNAGEL, W.; SMALLA, K.; BERG, G. Establishment of introduced antagonistic bacteria in the rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community. **FEMS Microbiology Ecology**, Aberdeen, v. 33, p. 41-49, 2000.

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**, Aberdeen, v. 29, p. 365-377, 1999.

LYNCH, J. M.; BENEDETTI, A.; INSAM, H.; NUTI, M.P.; SMALLA, K.; TORSVIK, V.; NANNIPIERE, P. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 40, p. 363-385, 2004.

MALKOMES, H. P. Comparison of the effects of differently formulated herbicides on soil microbial activities - a review. **Journal of Plant Disease Protection**, Kiel, v. 8, p. 781-789, 2000.

MENDELSON, M.; KOUGH, J.; VAITUZIS, Z.; MATTHEWS, K. Are Bt crops safe? **Nature Biotechnology**, New York, v. 21, p. 1003-1009, 2003.

MORMAN, T. B.; BECERRIL, J. M.; LYDON, J.; DUKE, S. O. Production of hydroxybenzoic acids by Bradyrhizobium japonicum strains after treatment with glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 40, p. 289-293, 1992.

MOTAVALLI, P. P.; KREMER, R. J.; FANG, M.; MEANS, N. E. Impact of genetically modified crops and their management on soil microbially mediated plant nutrient transformations. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 38, p. 816-824, 2004.

NIELSEN, K. M.; VAN ELSAS, J. D.; SMALLA, K. Transformation of *Acinetobacter* sp. Strain BD413 (pFG4nptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, p. 1237-1242, 2000.

OGER, P.; MANSOURI, H.; DESSAUX, Y. Effect of crop rotation and soil cover on alteration of the soil microflora generated by the culture of transgenic plants producing opines. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 881-890, 2000.

PADGETTE, S. R.; KOLACZ, K. H.; DELANNAY, X.; RE, D. B.; LA VALLEE, B. J.; TINIUS, C. N.; RHOADES, W. K.; OTERO, Y. I.; BARRY, G. F.; EICHOLTZ, D. A.; PESCHKE, V. M.; NIDA, D. L.; TAYLOR, N. B.; KISHORE, G. M. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 1451-1461, 1995.

PIPKE, R. N.; AMERHEIN, N.; JACOB, G. S.; SCHAFFER, J.; MARVEL, J. T. Metabolism of glyphosate in an *Arthrobacter* sp. GLP-1. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 165, p. 267-273, 1987.

REDDY, K. N.; HOAGLAND, R. E.; ZABLOTOWICZ, R. M. Effect of glyphosate on growth, chlorophyll, and nodulation in glyphosate-resistant and susceptible soybean (*Glycine max*) varieties. **Journal New Seeds**, Harworth, v. 2, p. 37-52, 2000.

REDDY, K. N.; ZABLOTOWICZ, R. M. Glyphosate-resistant soybean response to various salts of glyphosate and glyphosate accumulation in soybean nodules. **Weed Science**, Champaing, v. 51, p. 496-502, 2003.

RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M. C. Possíveis efeitos do cultivo de algodoeiro *Bt* sobre a comunidade de microrganismos do solo. In: PIRES, C. S. S.; FONTES, E. M. G. E.; SUJII, E. R. (Ed.). **Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. p. 117-133.

SAXENA, D.; FLORES, S.; STOTZKY, G. Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 133-137, 2002.

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

SAXENA, D.; STOTZKY, G. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1225-1230, 2001a.

SAXENA, D.; STOTZKY, G. Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 88, p. 1704-1706, 2001b.

STEINRUCKEN, H. C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl shikimic acid-2-phosphate synthetase. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, Floor Oakland, v. 94, p. 1207-1212, 1980.

TORSVIK, V.; ØVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 240-245, 2002.

TURRINI, A.; SBRANA, C.; PITTO, L.; CASTIGLIONE, M. R.; GIORGETTI, L.; BRIGANTI, R.; BRACCI, T.; EVANGELISTA, M.; NUTI, M. P.; GIOVANNETTINI, M. The antifungal Dm-AMP1 protein from *Dahlia merckii* expressed in *Solanum melongena* is released in root exudates and differentially affects pathogenic fungi and mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, Cambridge, v. 163, p. 393-403, 2004.

URWIN, P. E.; TROTH, K. M.; ZUBKO, E. I.; ATKINSON, H. J. Effective transgenic resistance to *Globodera pallida* in potato field trials. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 8, p. 95-101, 2001.

VIERHEILIG, H.; ALT, M.; NEHAUS, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Colonization of transgenic *Nicotiana sylvestris* plants, expressing different forms of *Nicotiana tabacum* chitinase by the root pathogen *Rhizoctonia solani* and by the mycorrhizal symbiont *Glomus mosseae*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v. 6, p. 261-264, 1993.

ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Effects of glyphosate on symbiotic nitrogen fixation, assimilation and soybean yield in glyphosate resistance soybean. In: INTERNATIONAL WEED CONTROL CONGRESS, 2004, Stoneville. **Abstracts...** Stonivelle: Agricultural Research Service, 2004b.

ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: A minireview. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, p. 825-831, 2004a.

Transgenic Plants and the Soil Microbiota

Abstract - *Soil micro-organisms represent a key hole in the nutrient cycle and in the maintenance of the fertility, besides execute another variety of important functions for the plants and the environment. With the possibility of the transgenic crops to cause negative impacts on the soil microbial communities, emerge the necessity to deep evaluate the real extensions of these impacts. In such case, this document presents some discussions about the interactions between transgenic plants and soil micro-organisms, showing results from different studies conducted by many researchers in the world and focusing in the evaluated parameters and the methodologies utilised to analyse the microbial communities.*

Index terms: microbial ecology, microbial diversity, microbial activity.

Embrapa

Cerrados

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

