

Avaliação da possibilidade de ocorrência de transformação natural de *Azospirillum brasilense* com DNA de plantas contendo o gene de resistência à canamicina

Deise Cristine Friedrich e Luciane Maria Pereira Passaglia¹

Resumo: (Avaliação da possibilidade de ocorrência de transformação natural de *Azospirillum brasilense* com DNA de plantas contendo o gene de resistência à canamicina) – Existe uma grande preocupação sobre a possibilidade de transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos de plantas geneticamente transformadas para bactérias presentes nos solos. Um mecanismo de transferência gênica em bactérias, que permite a aquisição de material genético proveniente de espécies diferentes, é a transformação natural. Nesse trabalho, *Azospirillum brasilense*, uma bactéria fixadora de nitrogênio, foi utilizada como receptora para a transformação natural. Plantas de tabaco transgênicas, contendo o gene *nptII* (resistência à canamicina) foram utilizadas como doadoras de material genético. Um período de contato de 12 meses entre as plantas transgênicas e as bactérias foi avaliado, com coletas amostrais a cada dois meses, através de análises por PCR do DNA extraído de películas bacterianas formadas em meio seletivo NFbHP. As reações de PCR foram realizadas com oligonucleotídeos específicos para os genes *nptII* e *nifH*. Nenhuma banda de amplificação correspondente ao gene *nptII* foi observada até o final do experimento. Os fragmentos amplificados a partir da reação para o gene *nifH* foram clivados com *TaqI*, para confirmar a presença de *A. brasilense* nas culturas. As bactérias também foram espalhadas em placas contendo meio NFbHP e canamicina e não foram observadas colônias após um período de 72 h de incubação. Do contrário, nas placas contendo apenas ampicilina as colônias foram similares àquelas obtidas com as placas controle. Os resultados obtidos poderão ser úteis na elaboração de um protocolo de monitoramento de possíveis efeitos de plantas transgênicas nos microrganismos do solo.

Palavras-chave: *Azospirillum brasilense*, transferência gênica horizontal, resistência à canamicina, gene *nptII*, gene *nifH*.

Abstract: (Analysis of the occurrence of natural transformation of *Azospirillum brasilense* with DNA from plants containing a kanamycin resistance gene) – There is a considerable concern about the possibility of a horizontal transfer of antibiotic resistance genes from genetically modified crops to soil bacterial community. One mechanism of gene transfer in bacteria that allows uptake of genetic material from diverged species is the natural transformation. In this work, the recipient strain for natural transformation was *Azospirillum brasilense*, a nitrogen fixing bacteria. Tobacco transgenic plants containing the *nptII* gene (kanamycin resistance) were used as donor of the transgenic material. A 12 months period of contact between the transgenic plants and the bacteria was evaluated each two months by PCR analysis of the DNA extracted from the bacterial pellicle grown on selective NFbHP medium. The PCR reactions were performed with oligonucleotides for *nptII* and *nifH* genes. No amplification of *nptII* gene was observed until the end of the experiment. A restriction analysis with *TaqI* of the purified DNA fragments of *nifH* PCR was performed to confirm the presence of *A. brasilense* in the cultures. The bacteria were also spread on NFbHP plates containing kanamycin and no colonies were observed after 72 h of growth. On the contrary, on the plates containing only ampicilin the colonies were similar to those obtained with the control plates. The results obtained could be useful to develop a protocol to evaluate the effects of transgenic plants on the soil microorganisms.

Keywords: *Azospirillum brasilense*, horizontal gene transfer, kanamycin resistance, *nptII* gene, *nifH* gene.

¹ Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43312, sala 207b, Campus do Vale. C. Postal 15053, Porto Alegre, RS. CEP 91501-970. Caixa Postal 15053, Porto Alegre, 91501-970, RS, Brasil. E-mail: lpassaglia@terra.com.br

Introdução

Poucas tecnologias desenvolvidas no século vinte têm atraído tanta controvérsia como a engenharia genética. Esta tecnologia compreende um conjunto de ferramentas não-convencionais com vistas à transferência de informação genética de um organismo, seja ele um microrganismo, um vegetal ou um animal, para outro. O debate internacional concentra-se em duas opiniões extremas: um grupo considera este procedimento de transformação genética como a fonte para a solução da degradação ambiental, cura de inúmeras doenças e produção de comida em quantidade suficiente para abrandar a escassez de alimentos. O outro grupo vê essa tecnologia como uma ameaça à economia global, local e ao meio ambiente. Um dos argumentos mais utilizado contra plantas geneticamente modificadas, por exemplo, é o de que vários dos genes marcadores inseridos nessas plantas e que conferem resistência a antibióticos irão se espalhar no ambiente e, eventualmente, poderão transformar bactérias nocivas à saúde humana, resistentes a essas drogas (Gay 2001).

Entretanto, o que se observa, na prática, é que grandes áreas com plantas geneticamente modificadas, tais como soja, milho, algodão e canola, vêm sendo cultivadas com enorme sucesso no hemisfério ocidental. Até 2004, um total de 81 milhões de hectares, envolvendo 17 países e cerca de 8,25 milhões de agricultores, foram utilizados para o cultivo de plantas transgênicas, nas quais as principais características transferidas foram a tolerância a herbicidas (72%) e resistência a insetos (19%) (James, 2004). Existem, também, inúmeros exemplos de microrganismos geneticamente modificados para a produção de antibióticos de uso farmacêutico, enzimas, aminoácidos e vitaminas, muitos dos quais são amplamente utilizados pela indústria de alimentos (Azevedo & Araújo 2003).

A grande maioria dos trabalhos já realizados no sentido de investigar possíveis efeitos que poderiam resultar da utilização e liberação de plantas transgênicas no meio ambiente relaciona-se com os riscos ao ambiente e à saúde humana (Ammann *et al.* 2001; Conner *et al.* 2003). Sabe-se, também, que as plantas alteram a composição e a diversidade das comunidades

microbianas do solo de uma maneira seletiva, e a comunidade microbiana, resultante dessa pressão seletiva, varia entre espécies de plantas (Siciliano & Germida 1999). Comunidades bacterianas que vivem na rizosfera de plantas de trigo e canola, cultivadas na mesma área, diferem na sua composição taxonômica (Germida *et al.* 1998), e comunidades rizosféricas de trigo, centeio e forrageiras, como o trevo, diferem na sua capacidade para utilizar uma variedade de substratos de carbono (Grayston *et al.* 1998). Siciliano & Germida (1999) demonstraram, através de um trabalho utilizando três cultivares de canola, sendo uma delas geneticamente modificada para tolerância ao herbicida glifosato, que a composição da comunidade microbiana associada às raízes diferiu significativamente entre a cultivar de canola transgênica e as não transgênicas. Nesse trabalho, os autores mostraram que o efeito da cultivar foi mais pronunciado no interior das raízes, comparado ao efeito sobre a comunidade da rizosfera, e que a variedade geneticamente modificada apresentou uma menor diversidade na comunidade bacteriana associada à raiz que a variedade não modificada correspondente. Apesar desses resultados, a significância a longo prazo de quaisquer das modificações observadas sobre o efeito de culturas transgênicas nos ecossistemas ainda é incerta e carece de experimentação.

Em vista do acima exposto, esse trabalho teve como objetivo analisar a possibilidade da ocorrência de alterações significativas nos genomas dos microrganismos, em especial daqueles que desempenham funções importantes para a agricultura, decorrentes da convivência com culturas geneticamente modificadas. Investigou-se a possibilidade de transferência de DNA das plantas para as bactérias e a ocorrência de possíveis alterações em genes envolvidos em processos fisiológicos bacterianos importantes, como a fixação biológica do nitrogênio.

Material e métodos

Sementes de tabaco (*Nicotiana tabacum*, var. SR1) de tipo selvagem e resistentes à canamicina (devido à introdução do gene *nptII* do transposon Tn5, sob o controle do promotor e do terminador do gene *nos*; Kern 2003), foram germinadas em

placas de Petry esterilizadas, cobertas com algodão e água, no escuro a 25°C por 48 h. Quando as plântulas apresentavam tamanho de cerca de 0,5 cm essas foram transferidas para copos contendo mistura estéril de vermiculita e areia, na proporção de 3:1. Os DNAs das plantas foram extraídos de acordo com o método de CTAB/Fenol-clorofórmio (Sambrook & Russel 2001). A confirmação da presença do gene *nptII* no DNA das plantas foi realizada através de reação de polimerização em cadeia (ver abaixo). As plantas (sete transgênicas e três de tipo selvagem) foram transferidas para vasos de 2 L de capacidade contendo o mesmo substrato (vermiculita:areia) e mantidas em casa de vegetação, com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h, sendo regadas com solução nutritiva (Sarruge 1995).

A linhagem bacteriana *Azospirillum brasilense* Sp7 (ATCC 29145, Amp^R; Tarrand *et al.* 1978) foi utilizada como microrganismo-alvo para a transformação genética. As bactérias foram multiplicadas em meio Luria Bertani (LB; Sambrook & Russel 2001) durante 48 h a 30°C em mesa agitadora a 200 rpm. A inoculação de *A. brasilense*, com densidade celular de 10⁸ c.f.u. mL⁻¹, foi realizada em cada um dos dez vasos do experimento, no momento em que as plântulas foram colocadas nos copos.

Para o monitoramento das bactérias, coletas foram realizadas a cada dois meses durante o período de 14 de abril de 2003 a 12 de abril de 2004, quando as plantas já estavam no final de seu ciclo de vida. Em cada coleta foi retirada uma amostra de aproximadamente 5 g da mistura de vermiculita e areia da rizosfera das plantas. As bactérias presentes nessa amostra foram suspensas em 5,0 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%). A suspensão (100 µL) foi inoculada em frascos contendo 5,0 mL de meio NFbHP semi-sólido sem nitrogênio (Machado *et al.* 1991). Da película bacteriana, formada após 16 horas de multiplicação à temperatura de 30°C, foi extraído o DNA, conforme o protocolo descrito por Schrank *et al.* (1987). Antes das células serem rompidas para a extração de DNA, uma alíquota foi espalhada em placas de meio NFbHP sólido (ágar 1,5%), suplementado com 20 mM de NH₄Cl, ampicilina (50 mg mL⁻¹) e canamicina (30 mg mL⁻¹). As placas foram incubadas a 30°C durante 72 h.

Os DNAs extraídos das plantas e das películas bacterianas foram utilizados em reações de amplificação em cadeia (PCR), usando como iniciadores oligonucleotídeos correspondentes aos genes *nptII* e *nifH* (um dos genes mais conservados do sistema de fixação biológica do nitrogênio; Passaglia *et al.* 1991). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram: *nptII*FOR (ACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATT) e *nptII*REV (GATACCGTAAAGCACGAGGAA-GCGGTCAG), que amplificam um fragmento de DNA de 481 pares de bases do gene *nptII* do transposon Tn5 e *nifH*FOR (ACCCGCCTGATC-CTGCACGCCAAGG) e *nifH*REV (ACGATGT-AGATTTCCTGGGCCTTGTT), que amplificam um fragmento de 314 pares de bases do gene *nifH* de *A. brasilense*. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 50 µL, contendo 100 ng de DNA molde, 2,5 U de *Taq*-DNA polimerase (Biotools do Brasil Ltda.), tampão de reação da enzima, com 2,5 mM de MgCl₂, cada um dos quatro dNTPs (Amersham Biosciences) na concentração final de 200 mM e os oligonucleotídeos, na concentração final de 100 nM cada. Após uma etapa de desnaturação inicial de 5 min a 94°C, as reações foram realizadas em 30 ciclos com as seguintes etapas: desnaturação por 45 s a 94°C, anelamento por 45 s a 55°C e extensão por 45 s a 72°C. Uma etapa de extensão final de 5 min a 72°C foi realizada e as amostras foram, posteriormente, mantidas a 4°C. A qualidade e a concentração dos produtos amplificados foram analisadas em géis de agarose 1,5% (Invitrogen Life Technologies) corados com brometo de etídeo (Sambrook & Russel 2001).

A especificidade dos fragmentos amplificados foi confirmada por hibridização dos produtos das PCRs por Southern blot, utilizando-se o kit *ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System* (Amersham Biosciences). Como sondas para as hibridizações foram utilizados um fragmento de 1,9 kb contendo parte do gene *nptII* do transposon Tn5 e um fragmento de 2,8 kb contendo o gene *nifH* de *Azospirillum brasilense*, previamente clonados e seqüenciados (Nunes *et al.* 2000; Passaglia *et al.* 1991).

Os fragmentos amplificados nas reações correspondentes ao gene *nifH*, depois de purificados em gel de agarose, foram clivados com a enzima

TaqI. Os padrões de clivagem obtidos foram comparados com o padrão originado pela clivagem do fragmento correspondente ao gene *nifH* de *A. brasilense* previamente determinado, a fim de ser comprovada a identidade das bactérias nas amostras testadas. Os produtos das clivagens foram analisados em géis de acrilamida 10% e corados com nitrato de prata (Sambrook & Russel 2001).

Resultados

A bactéria fixadora de nitrogênio de vida livre *A. brasilense* Sp7 foi submetida ao convívio, durante o período de um ano, com plantas de tabaco geneticamente transformadas com o gene marcador *nptII*, o qual confere resistência ao antibiótico canamicina (Kern 2003). A confirmação do estado transgênico das plantas foi realizada através de experimentos de PCR e Southern blot. A Figura 1 mostra o resultado da PCR, com a amplificação de um fragmento de 481 pares de bases, correspondente a uma porção do gene *nptII*, no genoma de sete plantas. Três plantas não transformadas (Figura 1, n^{os} 2, 3 e 10), foram utilizadas como controle do experimento. A especificidade da amplificação foi confirmada pela hibridização com um fragmento de 1,9 kb contendo parte do gene *nptII*, previamente clonado e sequenciado (dado não apresentado).

Para o monitoramento das bactérias foram realizadas seis amostragens durante o período de abril de 2003 a abril de 2004, sendo que na última amostragem, as plantas já se encontravam na fase

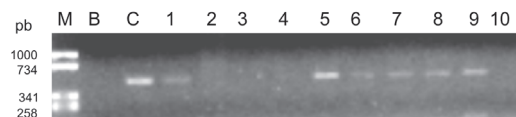


Figura 1

Gel de agarose 1,5% com o resultado da amplificação, onde foi utilizado como molde DNA das plantas. Os fragmentos amplificados correspondem a uma porção do gene *nptII* (fragmento de 412 pb). M: DNA do plasmídeo *Blue ScriptSK+* clivado com *Sau3AI*. B: reação sem DNA; C: controle positivo, onde o DNA-molde utilizado foi DNA de uma linhagem de *A. brasilense* com o transposon *Tn.5* inserido no genoma. Os números de 1 a 10 correspondem à numeração das plantas no experimento. A amplificação do gene *nptII* pode ser visualizada nas canaletas correspondentes às plantas de números 1, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, que são transgênicas. Os números 2, 3 e 10 correspondem a plantas de tipo selvagem.

final de seu ciclo de vida, com sinais visíveis de decomposição. A Figura 2 mostra os resultados das amplificações obtidas a partir dos DNAs bacterianos isolados após o período de seleção em meio específico para microrganismos fixadores de nitrogênio, correspondentes ao material coletado em 15 de dezembro de 2003 (quinta coleta). Como mostra a Figura 2a nenhum produto de amplificação foi observado quando foram utilizados os oligonucleotídeos correspondentes ao gene *nptII* e o DNA extraído das películas bacterianas, indicando a ausência de transferência desse gene para o genoma das bactérias presentes na película. Ao contrário, como mostra a Figura 2b, fragmentos de 314 pares de bases, correspondentes ao gene *nifH*, foram observados em todos os DNAs analisados, confirmando a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio nos dez vasos e a manutenção dessas bactérias na mistura de vermiculita e areia durante todo o período do experimento. Novamente, a especificidade das amplificações foram confirmadas por Southern blot (dados não apresentados). Resultados idênticos aos apresentados na Figura 2 foram obtidos nas outras cinco amostragens realizadas.

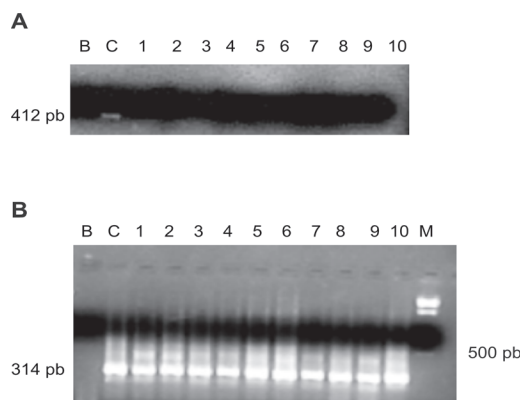


Figura 2

Géis de agarose 1,5% com o resultado das amplificações correspondentes aos genes *nptII* (A) e *nifH* (B), onde os moldes foram os DNAs extraídos das películas bacterianas. As canaletas marcadas com (B) correspondem às reações sem DNA. Os números de 1 a 10 correspondem a numeração das plantas em cada vaso do experimento. Em (A) verificou-se amplificação apenas no controle positivo (canaleta C), onde o molde utilizado foi DNA de uma linhagem de *A. brasilense* com o transposon *Tn.5* inserido no genoma (fragmento de 412 pb). Em (B) o controle positivo foi DNA do plasmídeo *Blue ScriptSK+* contendo o gene *nifH* de *A. brasilense* clonado (fragmento de 314 pb). M: DNA de fago λ clivado com a enzima *HindIII*.

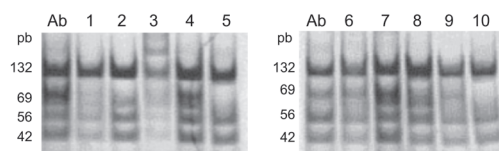


Figura 3

Géis de acrilamida 10% com o resultado da clivagem dos fragmentos amplificados na PCR da Figura 2B com a enzima de restrição *TaqI*. Ab: padrão de clivagem do gene *nifH* de *Azospirillum brasilense* (linhagem controle). Numeração de 1 a 10 corresponde às amostras testadas.

A fim de confirmar a presença de *A. brasilense* nas amostras analisadas, os fragmentos de 314 pares de bases, amplificados com os oligonucleotídeos correspondentes ao gene *nifH*, foram clivados com a enzima *TaqI*. Os padrões de restrição obtidos foram comparados ao padrão gerado pela clivagem do fragmento de 314 pb, correspondente ao gene *nifH*, amplificado do genoma de *A. brasilense*, previamente isolado e sequenciado. A Figura 3 mostra que os padrões de clivagem de *TaqI* gerados pelos fragmentos amplificados são idênticos ao padrão de clivagem de *TaqI* obtido com o fragmento proveniente da amplificação do DNA de *A. brasilense* isolado, confirmando a identidade das bactérias e reafirmando a sua permanência na mistura de vermiculita e areia durante todo o período do experimento.

Assim como não foi observado nenhum produto de amplificação quando os oligonucleotídeos correspondentes ao gene *nptII* foram utilizados com os DNAs provenientes das películas bacterianas, também não foi observada a multiplicação de nenhuma bactéria resistente à canamicina nas placas inoculadas com alíquotas das suspensões bacterianas provenientes das películas e que continham esse antibiótico adicionado ao meio NFbHP sólido. Do contrário, em placas contendo meio NFbHP e ampicilina, foi observado o aparecimento de colônias após um período de incubação de 48 h a 30°C. Essas colônias apresentaram formato, coloração, tamanho e aparência similares às colônias de *A. brasilense* provenientes das amostras obtidas dos vasos com plantas não transformadas.

Discussão

A enorme disseminação do cultivo de plantas geneticamente modificadas em todo o mundo,

incluindo o Brasil, originou inúmeros debates em relação à segurança e à disseminação de genes marcadores, especialmente os que conferem resistência a antibióticos, a ervas daninhas, bactérias patogênicas ao homem e a outras plantas e, também, suscitou a possibilidade de que esses genes poderiam provocar efeitos prejudiciais aos organismos não-alvos da flora e fauna local.

A transferência horizontal de genes de bactérias para plantas é bem conhecida, sendo o exemplo típico a transferência de DNA de *Agrobacterium tumefaciens* para os genomas de plantas suscetíveis (Zupan *et al.* 1998; Smith *et al.* 2001). A transferência de material genético entre bactérias também é bem conhecida (Droge *et al.* 1998; Droge *et al.* 1999). A possibilidade de transferência gênica horizontal de plantas para bactérias tem sido extensivamente investigada por vários grupos (Nielsen *et al.* 2000; de Vries *et al.* 2001; de Vries & Wackernagel 2002). Nielsen *et al.* (2000) relataram a existência de transferência gênica temporária entre o DNA de plantas geneticamente modificadas com o gene *nptII* e bactérias do gênero *Acinetobacter*. Esse estudo demonstrou a transformação *in vitro* das bactérias com DNA extraído de beterraba transgênica contendo um gene *nptII* funcional e que resultou na complementação do mesmo gene presente no cromossomo bacteriano, que continha uma deleção. O trabalho, no entanto, concluiu que as condições testadas não refletiam as condições reais e que seria extremamente improvável que uma transferência dessa ordem ocorresse em condições naturais. Uma das causas dessa improbabilidade seria a necessidade de homologia total entre os DNAs que irão recombinar, o da planta com o da bactéria. Além disso, uma vez liberado no solo, o DNA das plantas é rapidamente degradado pelos compostos presentes no solo, dificultando muito a fixação de seus genes nos genomas bacterianos (para detalhes ver Azevedo & Araújo 2003; van den Eede *et al.* 2004; Nielsen & Townsend 2004).

Estudos de transferência gênica horizontal envolvendo bactérias fixadoras de nitrogênio ainda são escassos. Donegan *et al.* (1999) realizaram um experimento de campo com plantas de alfafa geneticamente transformadas com gene da α -amilase ou com o gene da lignina peroxidase em associação com linhagens de *Sinorhizobium meliloti* de tipo selvagem ou contendo genes de

resistência aos antibióticos espectinomina e estreptomicina ou elevada atividade de fixação de nitrogênio. Não foram observadas alterações nos microrganismos em relação ao convívio ou não com as plantas geneticamente modificadas; no entanto, foram observadas alterações em alguns componentes do ecossistema, principalmente nas plantas contendo o gene da lignina peroxidase, incluindo alterações no crescimento e características químicas das plantas e características químicas e microbiológicas do solo. Um outro estudo, envolvendo plantas de *Lotus japonicum* transformadas com o gene da glutamina sintetase citosólica (GS) de alfafa mostrou o dobro de atividade de GS em nódulos contendo a bactéria fixadora de nitrogênio *Mesorhizobium loti* e atividade de GS nas raízes similar à atividade de GS observada nas plantas não transformadas, indicando que a presença desse gene aumentou a interação com as bactérias presentes nos nódulos das raízes das plantas (Suarez *et al.* 2003).

Nesse trabalho foi monitorada a possibilidade de ocorrência natural de transferência gênica horizontal entre plantas transgênicas e bactérias fixadoras de nitrogênio que são abundantes em solos cultivados de regiões tropicais e sub-tropicais. Os resultados obtidos, ainda que preliminares, contribuem para reforçar a possibilidade extremamente remota da incorporação de DNA transgênico pelas bactérias em condições naturais (Nielsen & Townsend 2004). Após um período de 12 meses de monitoramento das bactérias não foi possível detectar a presença do gene *nptII* no DNA extraído de amostras bacterianas analisadas. Também não foram observadas alterações fenotípicas nas bactérias submetidas ao contato com as plantas transgênicas, uma vez que não houve o aparecimento de colônias resistentes à canamicina nas placas contendo esse antibiótico. Entretanto, a ocorrência de bactérias resistentes à canamicina através do processo de transformação natural não era um evento esperado, uma vez que o gene marcador utilizado está sob o controle de um promotor eucariótico, o qual não é reconhecido pela maquinaria de transcrição procariótica. Por outro lado, nas placas onde houve multiplicação bacteriana, as colônias apresentaram-se uniformes quanto ao formato, coloração, tamanho e aparência, similares às colônias de *A. brasilense* provenientes das amostras obtidas dos vasos com plantas não trans-

formadas. Ainda que outros experimentos devam ser realizados, o protocolo de atividades estabelecido nesse trabalho poderá ser utilizado como ponto de partida para o desenvolvimento de protocolos mais completos que sejam úteis na averiguação da ocorrência ou não de modificações importantes nos genomas dos microrganismos que foram submetidos ao contato com plantas geneticamente modificadas.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Giancarlo Pasquali, do Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia e do Centro de Biotecnologia da UFRGS pelas sementes de tabaco transgênicas e de tipo selvagem. À FAPERGS pelo auxílio financeiro ao projeto e ao CNPq pela bolsa de iniciação científica do primeiro autor.

Referências Bibliográficas

- AMMANN, K., JACOT, Y. & AL MAZYARD, P. (2001) Safety of genetically engineered plants: an ecological risk assessment of vertical gene flow. In: CLUSTERS, R. (Ed.). *Safety of genetically engineered crops*. Zwijnaarde, Institute for Biotechnology, Belgian Flanders Interuniversity, p.60-87.
- AZEVEDO, J. L. & ARAÚJO, W. L. (2003) Genetically modified crops: environmental and human health concerns. *Mutation Research*, 544: 223-233.
- CONNER, A. J.; GLARE, T. R. & NAP, J. (2003) The release of genetically modified crops into the environment. *Plant Journal*, 33: 19-46.
- DE VRIES, J.; MEIER, P. & WACKERNAGEL, W. (2001) The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. *FEMS Microbiology Letters*, 195: 211-215.
- DE VRIES, J. & WACKERNAGEL, W. (2002) Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 99: 2095-2099.

- DONEGAN, K. K.; SEIDLER, R. J.; DOYLE, J. D.; PORTEOUS, L. A.; DIGIOVANNI, G.; WIDMER, F. & WATRUD, L. S. (1999) A field study with genetically engineered alfalfa inoculated with recombinant *Sinorhizobium meliloti*: effects on the soil ecosystem. *Journal of Applied Ecology*, 36: 920-936.
- DROGE, M.; PÜHLER, A. & SELBITSCHKA, A. (1998) Horizontal gene transfer as a biosafety issue: a natural phenomenon of public concern. *Journal of Biotechnology*, 64: 75-90.
- DROGE, M.; PÜHLER, A. & SELBITSCHKA, A. (1999) Horizontal gene transfer among bacteria in terrestrial and aquatic habitats as assessed by microcosm and fields studies. *Biology and Fertility of Soils*, 29: 221-245.
- GAY, P. (2001) The biosafety of antibiotic resistance markers in plant transformation and the dissemination of genes through horizontal gene flow. In: CLUSTERS, R. (Ed.). *Safety of genetically engineered crops*. Zwijnaarde, Institute for Biotechnology, Belgian Flanders Interuniversity, p.135-159.
- GERMIDA, J. J.; SICILIANO, S. D.; FREITAS, J. R. & SEIB, A. M. (1998) Diversity of root-associated bacteria associated with field grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology and Ecology*, 26: 43-50.
- GRAYSTON, S. J.; WANG, S.; CAMPBELL, C. D. & EDWARDS, A. C. (1998) Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 369-378.
- JAMES, C. (2004) Preview: Global status of commercialized transgenic crops: 2004 ISAAA Briefs, 32, Ithaca, New York, p.17.
- KERN, M. F. (2003) *Expressão de uma quitinase de Metharizium anisopliae em Nicotiana tabacum: Obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças fúngicas*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 83 p.
- MACHADO, H.B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. & PEDROSA, F.O. (1991) Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. *Canadian Journal of Microbiology*, 37: 549-553.
- NIELSEN, K.; ELSAS van, J. & SMALLA, K. (2000) Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 (pFG4DnptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1237-1242.
- NIELSEN, K.M. & TOWNSEND, J. P. (2004) Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nature Biotechnology*, 22: 1110-1114.
- NUNES, C. P.; PASSAGLIA, L. M. P.; SCHRANK, A. & SCHRANK, I. S. (2000) Directed mutagenesis affects recombination in *Azospirillum brasilense* *nif* genes. *Genetics and Molecular Biology*, 23: 901-905.
- PASSAGLIA, L. M.; NUNES, C.; ZAHA, A. & SCHRANK, I. (1991) The *nifHDK* operon in the free-living nitrogen fixing bacteria *Azospirillum brasilense* sequentially comprises genes H, D, K, an 353 ORF and gene Y. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 24: 649-675.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3.ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque.
- SARRUGE, J. R. (1975) Soluções nutritivas. *Summa Phytopathology*, 1: 231-234.
- SCHRANK, I. S.; ZAHA, A.; DE ARAÚJO, E. F. & SANTOS, D. S. (1987) Construction of a gene library from *Azospirillum brasilense* and characterization of a recombinant containing the *nif* structural genes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 20: 321-330.
- SICILIANO, S. D. & GERMIDA, J. J. (1999) Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. *FEMS Microbiology and Ecology*, 29: 263-272.
- SMITH, N.; KILPATRICK, J. B. & WHITELAM, G. C. (2001) Superfluous transgene integration in plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 20: 215-249.
- SUAREZ, R.; MARQUEZ, J.; SHISHKOVA, S. & HERNANDEZ, G. (2003) Overexpression of alfalfa cytosolic glutamine synthetase in nodules and flowers of transgenic *Lotus japonicum* plants. *Physiologia Plantarum*, 117: 326-336.

- TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. (1978) A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 24: 967-980.
- VAN DEN EEDEA, G.; AARTSB, H.; BUHKC, H.-J.; CORTHIERD, G.; FLINTE, H. J.; HAMMESF, W.; JACOBSENG, B.; MIDTVEDTH, T.; VAN DER VOSSENI, J.; VON WRIGHTJ, A.; WACKERNAGELK, W. & WILCKSL A. (2004) The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 1127-1156.
- ZUPAN, J. R.; WARD, D. & ZAMBRYSKI, P. (1998) Assembly of the VirB transport complex for DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Current Opinion on Microbiology*, 1: 649-655.