

Distribuição de Fungos em Diferentes Genótipos de Milho Transgênico Recém-Colhido

Vinicius de Moraes Barroso¹, Liliana de Oliveira Rocha², Gabriela Martins Reis³, Ludmila Jalaim de Andrade⁴, Danielle Diniz Atayde⁵, Aildson Pereira Duarte⁶ e Benedito Corrêa⁷.

^{1,2,3,4,5,7}Instituto de Ciências Biomédicas-Universidade de São Paulo, São Paulo. ⁶Instituto Agrônomo - IAC, São Paulo. ¹viniciusmb@usp.br, ²lilianarocha@usp.br, ³gabrielamreis@usp.br, ⁴ludjalaim@yahoo.com.br, ⁵daniatayde@usp.br, ⁶aildson@apta.sp.gov.br e ⁷correabe@usp.br

RESUMO - *Fusarium verticillioides* é o mais prevalente fungo associado com alimentos pertencentes à dieta humana e animal, em especial milho e subprodutos. Tem grande importância por serem toxigênicos, produzindo principalmente as fumonisinas. Alguns estudos têm demonstrado a diminuição na contaminação por fumonisinas em milho transgênico, devido à queda na infestação por insetos, logo, dificultando a entrada de fungos toxigênicos. O objetivo deste trabalho foi comparar a microbiota no milho convencional (controle) e transgênico, respectivamente: 2B710 e 2B710 Herculex (Hx); AG8088 e AG8088 VT PRO; 30F35 e 30F35 YieldGard (YG). Para o isolamento dos diferentes gêneros fúngicos, utilizou-se o método da semeadura direta em meio Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol e para a identificação molecular utilizou-se sequenciamento parcial do gene do fator de alongação 1-•. Os gêneros identificados em ordem decrescente de frequência foram: *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Curvularia*, *Acremonium* e *Alternaria*. Observou-se maior contaminação nas amostras controle, com exceção do híbrido 2B710 Hx. Comparando-se a frequência relativa do *Fusarium verticillioides* nos diferentes híbridos, verificou-se menor contaminação nos transgênicos, com exceção do híbrido AG8088 VT PRO. Os resultados indicam maior resistência dos grãos de milho transgênicos à microbiota.

Palavras-chave: *Fusarium*, microbiota, sequenciamento, identificação molecular.

Introdução

A cultura do milho pode ser considerada como uma das mais importantes no cenário agrícola brasileiro. As principais doenças associadas ao milho, no Brasil, são causadas por vírus, bactérias e fungos. Um dos principais efeitos do crescimento fúngico é a produção de compostos tóxicos (micotoxinas), produzidas principalmente pelos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (POMERANZ, 1982; CASA e REIS, 2003).

Fusarium verticillioides é a principal espécie produtora de fumonisinas, grupo de micotoxinas que ocorre naturalmente no milho e em produtos a base de milho, podendo associada ao câncer esofágico em humanos e defeitos congênitos do tubo neural (MARASAS, 2004). A temperatura e a atividade de água mínima para o crescimento dessa espécie são 2°C a 37 °C e 0,87, respectivamente. Para a produção de fumonisinas a Aa mínima é 0,90

(CAHAGNIER et al., 1995).

Atualmente, através da utilização de plantas que expressam o gene *bt* clonado da bactéria *Bacillus thuringiensis*, bactéria gram-positiva que produz δ -exotoxinas, δ -exotoxinas e δ -endotoxinas, foi possível a obtenção de genótipos de milho resistentes às principais pragas como *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho). Alguns estudos têm demonstrado a diminuição na produção de fumonisinas por *F. verticillioides* em milho *Bt*, como o trabalho de Papst et al. (2005).

A redução nos níveis de fumonisinas pode ser explicada pela redução da infestação por insetos nos grãos, impedindo o desenvolvimento do fungo. Estes fatos, associado ao grande significado econômico da cultura do milho, as perdas econômicas decorrentes da contaminação por fungos e pelas micotoxinas, principalmente fumonisinas, e a tendência, no Brasil, de substituição do milho convencional pelo transgênico (*Bt*) motivaram a presente pesquisa que tem como objetivo principal avaliar a micobiota de amostras de milho transgênico (*Bt*) e convencional.

Materiais e Métodos

Foram analisadas 240 amostras de milho transgênico (40 de cada genótipo): 1- genótipos 2B710- controle e 2B710 Hx- transgênico; 2- 30F35- controle e 30F35 YG- transgênico; 3- AG 8088- controle e AG 8088 VT PRO-transgênico. Estes foram cultivados pelo Programa Milho e Sorgo IAC/APTA do Instituto Agrônomo - IAC, no município de Cruzália, São Paulo. A amostragem foi realizada segundo metodologia proposta por Delp et al. (1986), coletando espigas em parcelas uniformes. Para cada híbrido foram instaladas 4 parcelas de 8 linhas de 10 m de comprimento. Coletaram-se 10 espigas de cada parcela, retiradas da 4ª linha a partir da sétima planta.

De cada sub-amostra (1 kg) de milho foram retirados, aproximadamente, 30 g para desinfecção em solução de hipoclorito de sódio (2%) por 3 minutos. Após a desinfecção os grãos foram lavados, por 3 vezes, com água destilada esterilizada. Trinta e três grãos foram selecionados ao acaso e semeados diretamente em placas de Petri contendo Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol. Foram utilizadas 3 placas contendo 11 grãos para cada uma das amostras, incubadas a 25°C por 5 dias. As colônias foram transferidas para Ágar Batata (PDA) e Ágar Spezieller Nährstoffarmer (SNA), sendo incubadas a 25 °C por 5-7 dias. As colônias de diferentes tipos morfológicos foram isoladas em Ágar Batata e submetidas à identificação em nível de gênero. Entretanto, aqueles pertencentes ao gênero *Fusarium* foram classificados até

espécie, de acordo com os seguintes compêndios: Pitt e Hocking, 1997; Leslie e Summerell, 2006.

A atividade de água dos grãos de milho foi determinada utilizando-se o equipamento AquaLab CX-2 (Decagon, Washington, EUA).

A identificação morfológica dos fungos do gênero *Fusarium* foi confirmada através do sequenciamento parcial do gene do fator de alongação 1-*, utilizando os *primers forward e reverse*, ef-1/ef-2 (* 650 pb), como descrito por Geiser et al., 2004.

Para a obtenção da biomassa fúngica, as cepas selecionadas foram semeadas em placas de Petri contendo o meio Yes (ágar-sacarose-extrato de levedura) e incubadas por 5 dias a 25 °C. Após esse período, os micélios das placas foram retirados, acondicionados em microtubos e mantidos à – 20°C. Posteriormente, o DNA genômico das cepas de *F. verticillioides* foi extraído conforme o manual de instruções do *kit Easy-DNA (Invitrogen)*. A quantificação e a verificação do grau de pureza das amostras foram realizadas em Nanodrop (*Life Technologies*).

O fragmento de aproximadamente 650 pb foi amplificado em termociclador *Applied Biosystems Thermocycler GeneAmp^R 9700*, utilizando-se os iniciadores conforme descrito por Geisen et al. (2004). Os produtos da reação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (2%) com TBE 0,5x e corados com *safe DNA (Invitrogen)*. O marcador de peso molecular utilizado foi de 1 Kb DNA *ladder (Invitrogen)*. A presença das bandas foi visualizada pela exposição dos géis à luz UV.

O fragmento gerado foi purificado utilizando o kit para purificação *Qiaquick Spin Handbook (Qiagen)*. Posteriormente, as amostras foram quantificadas utilizando o equipamento Nanodrop (*Life Technologies*).

A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador *Applied Biosystems Thermocycler GeneAmp^R 9700*, utilizando 2 µL do BigDye Terminator v3.3. (Applied Biosystems), 2 µL do tampão para BigDye, 1 µL do iniciador (5 µM), 4 µL de água Milli Q esterilizada e 1 µL de DNA (10 a 20 ng).

Após a reação, as amostras foram purificadas utilizando 40 µL de isopropanol 60%, em seguida, incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 3000 rpm (30 minutos), o sobrenadante foi descartado e 150 µL de etanol 65% adicionados. O material foi centrifugado novamente a 3800 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado, este último passo foi repetido mais uma vez e, em seguida, o tubo foi seco em *Speed Vacum*.

As amostras foram ressuspensas em formamida *Hi-Di (Applied Biosystems)*,

desnaturadas a 95 °C por 2 minutos e incubadas em gelo por 1 minuto. Em seguida foram aplicadas às colunas capilares contendo o polímero POP6 no seqüenciador automático *Abi Prism^R Genetic Analyser* (Applied Biosystems). As seqüências foram editadas utilizando o software BioEdit v7.0.9.0 e posteriormente alinhadas com o Blast do banco de dados *Fusarium* ID v1.0 (<http://isolate.fusariumdb.org>) (Geiser et al., 2004).

Resultados e Discussão

Análise da micobiota de 240 amostras de grãos de milho recém-colhido dos híbridos 2B710, 30F35 e AG8088 (controle e transgênico), provenientes da região de Cruzália (São Paulo), revelou a presença de fungos filamentosos na totalidade das amostras, destacando-se *Fusarium verticillioides* como o fungo mais frequente.

Das 80 amostras de grãos de milho, referentes ao híbrido 2B710 (controle e transgênico - Hx) foram isolados os seguintes gêneros fúngicos em ordem decrescente de frequência: híbrido controle - *Fusarium* (75,4%), *Penicillium* (40,52%), *Cladosporium* (3,2%), *Neurospora* (2,8%), *Trichoderma* (2,2%), levedura (1,74%), *Aspergillus* (1,73%), *Mucor* (0,45%), *Rhizopus* (0,40%), fungo não esporulado – FNE (0,23%), *Curvularia* (0,1%). A Aa variou de 0,74 a 0,94 (média: 0,90); Híbrido transgênico - *Penicillium* (66,8%), *Fusarium* (54,5%), *Trichoderma* (12,6%), levedura (3,68%), FNE (1,36%), *Cladosporium* (0,7%), *Neurospora* (0,67%), *Acremonium* (0,08%), *Aspergillus* (0,07%). Os valores de Aa variaram de 0,93 a 0,94 (média: 0,96). Pertencentes ao gênero *Fusarium* constatou-se somente a presença da espécie *F. verticillioides*, tanto nos grãos transgênicos quanto nos isogênicos.

Das 80 amostras de grãos de milho do híbrido 30F35 (controle e transgênico - YG), foram isolados os seguintes gêneros fúngicos em ordem decrescente de frequência: *Fusarium* (91,8%), *Penicillium* (40,7%), *Trichoderma* (10,2%) *Cladosporium* (4,7%), *Aspergillus* (1,4%), *Mucor* (1,4%), *Rhizopus* (0,15%), *Alternaria* (0,08%). A Aa variou de 0,87 a 0,98, com média de 0,93; Híbrido transgênico - *Fusarium* (84,1%), *Penicillium* (34,7%), *Trichoderma* (5,2%) *Cladosporium* (2,3%), *Neurospora* (1,7%), *Aspergillus* (0,9%), *Mucor* (0,2%), *Rhizopus* (0,08%). A Aa variou de 0,92 a 0,97 (média: 0,95).

Dentro do gênero *Fusarium*, as espécies isoladas foram: *F. verticillioides* e *F. bulbicola* (amostra 19 – híbrido 30F35 controle). Vale salientar que a espécie *F. bulbicola*, isolada principalmente de flores como narciso (*Narcissus* sp.) e nerine (*Nerine* sp.), está associada ao apodrecimento do bulbo das plantas (LESLIE e SUMMERELL, 2006).

Com relação as 80 amostras referentes ao híbrido AG8088 (controle e transgênico – VT PRO), observou-se a presença dos seguintes fungos: Controle - *Fusarium* (59,5%), *Penicillium* (30,1%), *Neurospora* (17%), *Trichoderma* (10,9%), *Cladosporium* (1,4%), *Aspergillus* (1,1%), *Mucor* (1,1%), *Rhizopus* (0,8%), levedura (0,7%). A Aa variou de 0,87 a 0,96, com média de 0,91; Transgênico - *Fusarium* (81,5%), *Penicillium* (17,8%), *Neurospora* (4,6%), *Trichoderma* (3,3%), *Mucor* (1,8%), *Aspergillus* (0,8%), *Cladosporium* (0,3%), FNE (0,08%). A Aa variou de 0,86 a 0,93, com média de 0,91. Com relação ao gênero *Fusarium*, identificou-se apenas a espécie *F. verticillioides*.

Das 235 cepas de *Fusarium* spp. isoladas das amostras de milho (transgênico e convencional), 234 foram classificadas como pertencentes a espécie *F. verticillioides*, utilizando o sequenciamento parcial do gene do fator de alongação 1• (TEF-1 •). Constatou-se, também, o isolamento uma cepa de *F. bulbicola*. A predominância de *F. verticillioides*, principal espécie produtora de fumonisinas, em todos os híbridos estudados vem ao encontro dos resultados obtidos por diversos pesquisadores que mencionam a referida espécie endofítica como a principal contaminante de grãos de milho, podendo contaminar até 100% das amostras, dependendo do lote (MILLS, 1989).

Relacionando a frequência do gênero *Fusarium* com os níveis de Atividade de água (Aa), observou-se maior frequência de isolamento do fungo em Aa média de 0,93 (91,8%), no híbrido 30F35 (controle), e menor frequência em Aa média de 0,96 (54,5% - híbrido 2B710 Hx). Segundo Lacey, et al. (1991), os níveis mínimos e máximos de atividade de água para o crescimento de *F. verticillioides* variaram de 0,87 e 0,98, valores que coincidem com os encontrados nesta investigação.

Alguns trabalhos têm demonstrado a redução de *Fusarium* spp., como também da contaminação por fumonisinas em grãos de milho transgênico (PAPST et al. 2005). Em 2002, Bakan et al., compararam a micobiota de grãos de milho Bt (expressam a toxina Cry1Ab) e de grãos convencionais isolados, da França e da Espanha e demonstraram que *F. verticillioides* foi a espécie mais frequente, tanto no Bt, como no convencional. Entretanto, os autores constataram massa fúngica de 4 a 18 vezes menor no milho Bt comparado com o isogênico.

No presente trabalho, observou-se redução da frequência fúngica nos grãos transgênicos dos híbridos AG8088 e 30F35 (Figura 1). As tecnologias utilizadas nesses dois híbridos são capazes de expressar as toxinas cry1Ab (YG – 30F35) e cry 1A.105 (cry 1Ab + cry 1Ac + cry1F + Cry 2Ab2) + cry 2Ab2 (VTPRO – AG8088). A primeira está envolvida com a morte dos insetos na fase adulta e a segunda na fase larval e adulta, além de propiciar a

morte de insetos resistentes às toxinas cry disponíveis atualmente. Com relação à frequência do gênero *Fusarium*, houve redução da contaminação nos grãos transgênicos 2B710 e 30F35.

A tecnologia Herculex utilizada no híbrido 2B710 é eficiente na morte dos insetos na fase larval e adulta, além disso, observou-se redução da frequência de *Fusarium* spp. em 27,3% nos grãos 2B710Hx em relação ao controle. Já a tecnologia YG proporcionou redução da contaminação por *Fusarium* spp. de 8,4% em comparação com o controle (Figura 2).

Conclusões

A realização deste trabalho permitiu chegar às seguintes conclusões: 1- o gênero *Fusarium* foi encontrado em sementes de todos os híbridos, sendo a espécie *F. verticillioides* a mais predominante; 2- a tecnologia transgênica reduziu mais a contaminação fúngica, nos grãos de milho, em relação à tecnologia convencional; 3- a utilização do gene do fator de alongação 1-• para confirmação da identidade das espécies de *Fusarium*, isoladas através do sequenciamento desta região, provou ser adequada, permitindo uma correlação de aproximadamente 99,4% da identificação morfológica com a identificação molecular.

Literatura Citada

BAKAN, B.; MELCION, D.; RICHARD-MOLARD, D.; CAHAGNIER, B. Fungal growth and *Fusarium* mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetic modified maize grown in France and Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 728-731, 2002.

CAHAGNIER, B.; MELCION, D.; RICHARD-MOLARD, D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B₁ on maize grain as a function of different water activities. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 20, p. 247-51, 1995.

CASA, R.T. e REIS, E.M. Doenças na cultura do milho. In: FANCELLI, A.L.; DOURADO, D. Neto. eds. *Milho: estratégias de manejo e alta produtividade*. Piracicaba, Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento da Produção Vegetal, p. 1-18, 2003.

DELP, R.B.; STEWELL, L.J.; MAROIS, J.J. Evaluation of field sampling techniques for estimation of disease incidence. *Phytopathology*, v. 76, p. 1299-305, 1986.

GEISER, D.M. *et al.* FUSARIUM-ID V.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, v. 110, p 473-479, 2004.

LACEY, J.; MAGAN, N. Fungi in cereal grain: their occurrence and water and temperature relations. In: CHELKOWSKI, J. (Ed.). *Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Amsterdam: Elsevier Science, 1991. p. 77-118.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. *The Fusarium laboratory manual*. Iowa, Blackwell

Publishing, 2006. 388p.

MARASAS, W.F.O.; RILEY, R.T.; HENDRICKS, K.A.; STEVENS, V.L.; SADLER, T.W.; GELINEAU-VAN WAES, J.; MISSMER, S.A.; CABRERA, J. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J Nutr.* v. 134, p. 711–716, 2004.

MILLS, J.T. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* Species on cereal seeds. *Journal of Food Protection*, v. 52, n. 10, p. 737-742, 1989

PAPST, C.; UTZ, A.E.; MELCHINGER, A.E.; EDER, J.; MAGG, T.; KLEIN, D.; BOHN, M. Mycotoxins produced by *Fusarium* spp. in isogenic Bt vs. non Bt maize hybrids under European corn borer pressure. *Agronomy J.* v. 97, p. 219-224, 2005.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. *Fungi and food spoilage*. 2 ed. Gaithersburg, Aspen Pub., Inc., 1997. p. 593.

POMERANZ, Y. Biochemical, functional and nutritive changes during storage. In: CHRISTENSEN, C.M. (ed). *Storage of cereal grains and their products*, 1982. p.145-217.

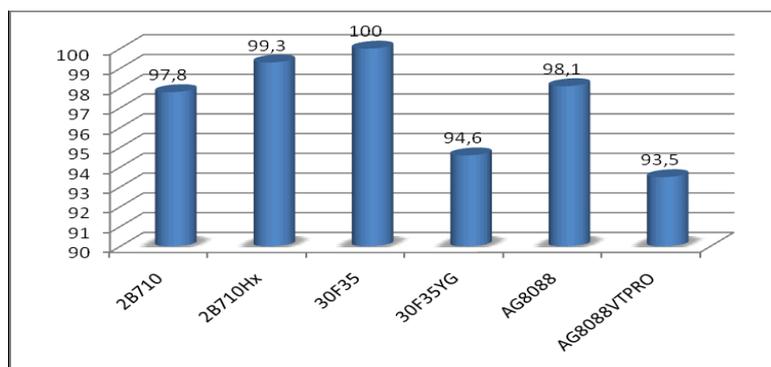


Figura 1. Porcentagem de contaminação fúngica nos híbridos 2B710, 2B710Hx, 30F35, 30F35YG, AG8088 e AG808VTPRO

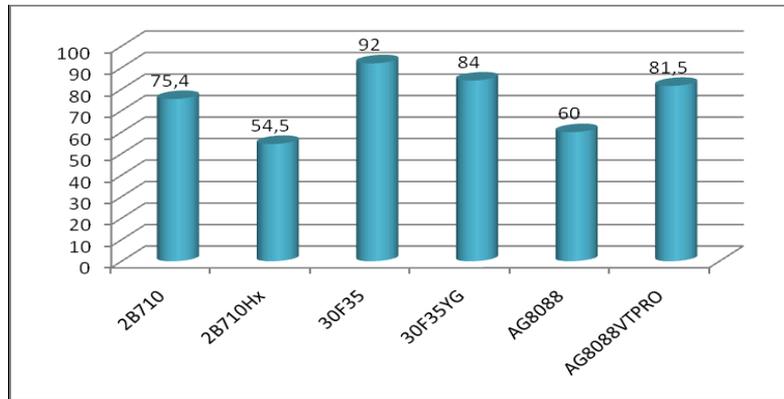


Figura 2. Porcentagem de contaminação por *Fusarium* spp. nos híbridos 2B710, 2B710Hx, 30F35, 30F35YG, AG8088 e AG8088 VTPRO de milho