

**Distribuição de fungos em grãos de milho transgênico (presença do gene *cry1F* de *Bacillus thuringiensis*), do florescimento à colheita.\***

Gabriela Martins Reis<sup>1</sup>, Liliana de Oliveira Rocha<sup>2</sup>, Vinicius de Moraes Barroso<sup>3</sup> Aildson Pereira Duarte<sup>4</sup> e Benedito Corrêa<sup>5</sup>

<sup>1,2,3,5</sup>Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. <sup>1</sup>[gabrielamreis@usp.br](mailto:gabrielamreis@usp.br)

<sup>2</sup>[lilianarocha@usp.br](mailto:lilianarocha@usp.br) <sup>3</sup>[viniciusmb@usp.br](mailto:viniciusmb@usp.br) e <sup>5</sup>[correabe@usp.br](mailto:correabe@usp.br)

<sup>4</sup>Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP. <sup>4</sup>[aildson@apta.sp.gov.br](mailto:aildson@apta.sp.gov.br)

**RESUMO** - Milho (*Zea mays*) contendo gene *cry1F* de *Bacillus thuringiensis* (Bt), produz *Cry1F*, proteína tóxica para lepidópteros, resultando na diminuição de contaminação por fungos. O gênero *Fusarium*, principalmente *F. verticillioides*, pode contaminar o milho através dos estilo-estigmas, levando ao apodrecimento e produção de fumonisinas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a micobiota de 312 amostras de grãos de milho Bt, Herculex<sup>TM</sup>. A micobiota foi realizada em 6 coletas (fase de florescimento, grão leitoso, pastoso, farináceo, farináceo-duro e maturidade fisiológica), através do isolamento em meio Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol – Oxoid. As atividades de água variaram de 0,99 (C1) a 0,92 (C6). Foram isolados os seguintes fungos, em ordem decrescente de frequência: leveduras (93,27%); *Fusarium* (60,58%); *Penicillium* (43,59%); *Geotrichum* (28,21%); *Cladosporium* (17,63%); *Aspergillus* (15,71%); *Trichoderma* (14,42%); fungos não esporulados (10,26%); *Rhizopus* (8,97%); *Neurospora* (6,41%); *Mucor* (6,41%); *Acremonium* (5,77%); *Alternaria* (2,66%); *Nigrospora* (1,6%); *Curvularia* (0,64%). Dentro do gênero *Fusarium*, foram isoladas as seguintes espécies, *F. verticillioides* (40,71%); *F. proliferatum* (16,99%); *F. anthophilum* (2,89%); *F. subgutinans* (1,92%); *F. graminearum* (0,64%). Análise do crescimento de *F. verticillioides* demonstrou variação do fungo em função das diferentes coletas ( $p < 0,001$ ), e maior frequência de isolamento na fase de milho verde (pastoso), apesar da presença do gene *cry1F*.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L., *Fusarium verticillioides*, micobiota, meio DRBC, milho Herculex<sup>TM</sup>.

### Introdução

Em função da necessidade de aumento da produtividade, o milho (*Zea mays* L.) tem sido submetido a um intenso melhoramento genético, resultando na existência de diversos híbridos comerciais.

Recentemente, com a viabilização das técnicas de transformação de plantas, foi possível a obtenção de genótipos de milho resistentes às principais pragas como *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho) e *Helicoverpa zea* (lagarta da espiga) através da utilização de plantas que expressam o gene *bt* clonado da bactéria *Bacillus thuringiensis*. Essa bactéria produz •-endotoxinas, com ação tóxica para uma ampla variedade de insetos, sendo que o gene codificador para a •-endotoxina Cry, clonado do *Bt* tem sido amplamente utilizado por várias empresas nos EUA (BOULDER, 1993; WAQUIL et al., 2004).

Estudos conduzidos por Munkvolv et al. (1999); Past et al. (2005) e Duvick (2001) demonstraram diminuição na produção de fumonisinas por *F. verticillioides* em milho *Bt*.

Hammond et al. (2004) verificaram diminuição nos níveis de fumonisinas em híbridos Bt contendo a proteína Cry 1Ab durante o desenvolvimento da cultura em condições naturais e com infestação forçada pelos insetos *Ostrinia nubilalis* e *Diatraea grandiosella* (broca européia do milho e broca do milho do sudoeste, respectivamente). Estes autores atribuem a diminuição na produção de fumonisinas pela queda da infestação dos insetos nos grãos e, conseqüentemente, manutenção da integridade dos mesmos, dificultando a entrada de fungos toxigênicos, como *Fusarium* (DUVICK, 2001).

*Fusarium verticillioides* é o fungo mais prevalente associado à alimentos pertencentes às dietas humana e animal com base de milho e seus subprodutos. São cosmopolitas e têm grande importância por serem produtores de micotoxinas, principalmente as fumonisinas, consideradas pela “International Agency for Research on Cancer” (IARC) como possivelmente carcinogênicas para seres humanos.

Estes fatos, associado ao grande significado econômico da cultura do milho, as perdas econômicas decorrentes da contaminação por fungos e por micotoxinas, principalmente fumonisinas, e a tendência de substituição do milho convencional pelo transgênico (Bt) motivaram a presente pesquisa que teve como objetivo identificar a microbiota do milho Bt, híbrido Herculex™ (presença do gene *cry1F*).

### **Material e Métodos**

Para a amostragem do milho Bt (Herculex™) foi utilizado a metodologia de Delp et al. (1986) adaptada. Foram realizadas seis coletas, cada uma nos diferentes períodos de amadurecimento dos grãos, a constar: Coleta 1 (C1), realizada na fase de florescimento (estádio R1); C2 na fase de grão leitoso (estádio R2); C3, na fase de grão pastoso (milho verde, estágio R3); C4 na fase de grão farináceo (estádio R4); C5 na fase de grão farináceo-duro (estádio R5); e C6 na fase de maturidade fisiológica (estádio R6). Para cada coleta o local de plantio foi dividido em diversas parcelas uniformes. Foram escolhidas, 4 parcelas e de cada uma dessas parcelas foram colhidas 13 espigas de milho, totalizando 52 amostras por coleta. As amostras foram semeadas no meio do mês de outubro de 2010. A amostragem foi feita a partir do 75º dia após a emergência das plantas. Totalizou-se 312 amostras, provenientes do município de Cruzália, região de Assis, Estado de São Paulo. Análise da atividade de água das amostras foi determinada através do aparelho AQUALAB CX-2 (Decagon Devices Inc).

De cada amostra de milho foram retirados trinta e três grãos selecionados ao acaso e semeados diretamente em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Dicloran Rosa

Bengala Cloranfenicol (DRBC – OXOID). As placas foram incubadas a 25 °C por 5 dias e os resultados expressos em porcentagem do total de grãos inoculados infectados por fungos.

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 incubadas a 25 °C por 7-15 dias sob luz branca e luz negra (12 h/dia) em cultivo em lâmina com meio SNA, e, subsequentemente classificados até espécie. As colônias foram transferidas para Ágar Batata (PDA). Em seguida, as colônias foram identificadas de acordo com os compêndios de Nelson et al. (1983) e Leslie e Summerell (2006).

A identificação das espécies de *Fusarium* foi confirmada através do sequenciamento parcial do gene do fator de alongação 1-• (*TEF-1-•*). O fragmento de aproximadamente 650 pb foi amplificado utilizando-se os iniciadores *forward* e *reverse*, ef-1/ef-2, conforme descrito por Geiser et al. (2004). O fragmento gerado foi purificado utilizando kit para purificação *Qiaquick Spin Handbook* (Qiagen).

A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador *Applied Biosystems Thermocycler GeneAmp<sup>R</sup> 9700*, utilizando 2 µL do BigDye Terminator v3.3. (Applied Biosystems), 2µL do tampão para BigDye, 1 µL do iniciador (4 µM), 10 µL de água Milli Q esterilizada e 1 µL de DNA (10 a 20 ng). As condições da reação foram: 95 °C por 2 minutos, 25 ciclos de 96 °C por 20 segundos, 55 °C (20 segundos) e 60 °C (4 minutos).

Após a reação, as amostras foram novamente purificadas e ressuspendidas 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 sequenciador automático *Abi Prism<sup>R</sup> Genetic Analyser* (Applied Biosystems).

As sequências foram editadas utilizando o software BioEdit v7.0.9.0 e posteriormente alinhadas com o Blast dos bancos de dados, GeneBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## **Resultados e Discussão**

De maneira geral, os níveis de umidade (atividade de água) variaram de 0,99 (C1) a 0,92 (C6). Foram isolados os seguintes fungos, em ordem decrescente de frequência: leveduras (93,27%); *Fusarium* (60,58%); *Penicillium* (43,59%); *Geotrichum* (28,21%); *Cladosporium* (17,63%); *Aspergillus* (15,71%); *Trichoderma* (14,42%); fungos não esporulados (10,26%); *Rhizopus* (8,97%); *Neurospora* (6,41%); *Mucor* (6,41%); *Acremonium* (5,77%); *Alternaria* (2,66%); *Nigrospora* (1,6%); *Curvularia* (0,64%). Dentro do gênero

Fusarium, foram isoladas as seguintes espécies, *F. verticillioides* (40,71%); *F. proliferatum* (16,99%); *F. anthophilum* (2,89%); *F. subglutinans* (1,92%); *F. graminearum* (0,64%).

Em relação à primeira coleta (estádio R1) constatou-se atividade de água de 0,99 e a presença dos seguintes fungos, em ordem decrescente de frequência: leveduras (100,0%) *Penicillium* spp. (57,77%), fungos não esporulados (FNE) (34,62%), *Geotrichum* spp. (28,85%), *Cladosporium* spp. (23,08%), *Aspergillus* spp. (13,46%), *Fusarium* spp. (11,54%), *Neurospora* spp. (11,54%), *Acremonium* spp. (9,62%), *Rhizopus* (9,62%), *Mucor* spp. (7,59%), *Trichoderma* spp. (3,85%), *Nigrospora* spp. (3,85%), *Curvularia* spp. (1,92%) e *Alternaria* spp. (1,92%). Em relação ao gênero *Fusarium*, foram observadas as seguintes espécies: *F. verticillioides* (9,06%), *F. subglutinans* (3,85%) e *F. anthophilum* (1,92%) (Figura 1).

Na segunda coleta (estádio R2), onde se constataram níveis de a atividade de água entre 0,97 a 0,99, os fungos isolados foram: leveduras (100%), *Geotrichum* spp. (78,85%), *Penicillium* spp. (26,92%), FNE (26,92%), *Rhizopus* spp. (26,92%), *Aspergillus* spp. (23,08%), *Mucor* spp. (21,15%), *Cladosporium* spp. (19,23%), *Alternaria* spp (11,54%), *Neurospora* spp. (7,69%), *Trichoderma* spp. (5,77%), *Fusarium* spp. (3,85%), *Acremonium* spp. (1,92%), *Nigrospora* spp. (1,92%) e *Curvularia* spp. (1,92%). As espécies de *Fusarium* isoladas foram: *F. verticillioides* (1,92%) e *F. anthophilum* (1,92%) (Figura 1).

Na terceira coleta (estádio R3), onde os níveis de atividade de água variaram de 0,96 a 0,98, os fungos isolados foram: leveduras (100%), *Fusarium* spp. (63,46%), *Cladosporium* spp. (51,92%), *Penicillium* spp. (44,23%), FNE (21,15%), *Geotrichum* spp. (19,23%), *Rhizopus* (17,31%), *Trichoderma* spp. (13,46%), *Acremonium* spp. (13,46%), *Aspergillus* spp. (7,69%), *Alternaria* spp (1,92%), *Nigrospora* spp. (1,92%), *Neurospora* spp. (1,92%) e *Mucor* spp. (1,92%). Com relação à *Fusarium*, foram observadas as espécies *F. verticillioides* (59,62%) e *F. anthophilum* (3,85%) (Figura 1).

Na quarta coleta (estádio R4) a atividade de água média foi de 0,96. Nesta etapa, foram observados os seguintes fungos: leveduras (100%), *Fusarium* spp. (78,85%), *Cladosporium* spp. (67,31%), *Trichoderma* spp. (30,77%), *Penicillium* spp. (28,85%), *Geotrichum* spp. (28,85%), FNE (19,33%), *Aspergillus* spp. (9,62%), *Neurospora* spp. (3,85%), *Nigrospora* spp. (1,92%) e *Mucor* spp. (1,92%). As espécies de *Fusarium* isoladas foram: *F. verticillioides* (76,92%), *F. subglutinans* (1,92%) e *F. graminearum* (1,92%) (Figura 1).

A quinta coleta (estádio R5), a atividade de água média foi de 0,97. Os fungos isolados

foram: *Fusarium* spp. (98,08%), leveduras (88,46%), *Cladosporium* spp. (61,54%), *Penicillium* spp. (25%), FNE (19,23%), *Trichoderma* spp. (13,46%), *Geotrichum* spp. (5,77%), *Acremonium* spp. (3,85%), *Rhizopus* spp. (3,85%), *Aspergillus* spp. (3,85%) e *Neurospora* spp. (1,92%). As espécies de *Fusarium* encontradas foram: *F. verticillioides* (96,15%), *F. proliferatum* (1,92%), *F. graminearum* (1,92%) e *F. oxysporum* (1,92%) (Figura 1).

Na sexta coleta (estádio R6) a atividade de água média dos grãos foi de 0,96. Os fungos encontrados foram: *Fusarium* spp. (100%), *Penicillium* spp. (84,62%), FNE (73,08%), *Cladosporium* spp. (73,08%), leveduras (71,15%), *Aspergillus* spp. (36,54%), *Trichoderma* spp. (21,15%), *Neurospora* spp. (7,69%), *Geotrichum* spp. (5,77%), *Mucor* spp. (5,77%) e *Acremonium* spp. (3,85%). As espécies de *Fusarium* encontradas foram: *F. verticillioides* (94,23%), *F. proliferatum* (1,92%), *F. anthophilum* (1,92%) e *F. subglutinans* (1,92%) (Figura 1).

A presença de leveduras e de fungos filamentosos constatada nas 312 amostras de grãos de milho transgênico (Herculex™), nas 6 fases de amadurecimento dos grãos, vem ao encontro de Almeida et al. (2002), em estudo realizado no Brasil. A elevada atividade de água das amostras (média de 0,96 a 0,99), também favoreceu o crescimento de leveduras.

Em relação a distribuição de *Fusarium* spp., os menores percentuais de isolamento foram constatados nas duas primeiras coletas, observando-se, a partir da terceira coleta percentuais acima de 60%, com freqüência máxima (100%) na 6ª coleta. Tais resultados podem ser explicados pelos elevados níveis de atividade de água detectados nas amostras. Segundo Lacey et al. (1991), a atividade de água máxima para o crescimento de *F. verticillioides*, espécie de *Fusarium* mais abundantemente encontrada em milho, é de 0,98.

Diversos trabalhos desenvolvidos com milho convencional proveniente do Brasil, apontam o gênero *Fusarium* como o de maior freqüência em grãos recém colhidos e armazenados (ALMEIDA et al., 2005 e ROCHA et al., 2009). Almeida et al. (2002) analisando a micobiota em diversas fases de milho convencional, demonstraram *F. verticillioides* como fungo contaminante mais freqüente.

Bakan et al. (2002) compararam a micobiota de grãos de milho Bt (que expressam a toxina Cry1a-(b)) e de grãos convencionais isolados da França e da Espanha. Os resultados demonstraram *F. verticillioides* como a espécie mais frequente tanto no Bt como no convencional, porém, constatou-se uma massa fúngica de 4 a 18 vezes menor no milho Bt comparado com o isogênico.

Em nossa investigação, apesar da presença do gene cry1F, a frequência de *F. verticillioides*, variou em função das diferentes coletas ( $p < 0,001$ ). Na fase R3, coleta do “milho verde”, foi encontrada 59,62% desta espécie. Já na última coleta, fase de maturidade fisiológica, o fungo foi isolado 96,15% das amostras analisadas. Tais resultados são preocupantes, uma vez que esta espécie pode produzir altos níveis de fumonisinas em milho.

### Literatura Citada

ALMEIDA, A.P.; FONSECA, H.; FANCELLI, A.L.; DIREITO, G.M.; ORTEGA, E.M.; CORRÊA, B. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 13, p. 3877-3882, 2002.

ALMEIDA, A.P.; SABINO, M.; FONSECA, H.; CORRÊA, B. Milho recém-colhido no Brasil: interação da microbiota fúngica, fatores abióticos e ocorrência de micotoxinas. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 64, p. 1-9, 2005.

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.

BOULDER, D. Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. *Phytochemistry*, v. 34, p. 1453-1466, 1993.

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.

DUVICK, J. Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification. *Environmental Health Perspectives*. v. 109, p. 337-342, 2001.

GEISER, D.M.; JIMENEZ-GASCO, M.; KANG, S.; MAKALOWSKA, N.; VEERARAGHAVAN, T.J.; WARD, N.; ZHANG, G.A.; KULDAU, G.A.; O'DONNELL, K. FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, v. 110, p. 473-479, 2004.

HAMMOND, B.G.; CAMPBELL, K.W.; PILCHER, C.D.; DEGOOYER, T.A.; ROBINSON, A.E.; MC MILLEN, B.L.; SPANGLER, S.M.; RIORDAN, S.G.; RICE, L.G.; RICHARD, J.L. Lower fumonisin mycotoxin levels in the grain of Bt corn grown in the United States in 2000-2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 1390-1397, 2004.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC, 1993. v.56, p. 445-446.

LACEY, J.; RAMAKRISHMA, N.; HAMER, A.; MAGAN, N.; MARFLEET, C. Grain fungi. In: DILIP, K.; ARORA, D. K.; MUKERJI, K. G.; MARTH, E.H. (Eds.). Handbook of Applied Mycology: foods and feeds. New York: Marcel Dekker, 1991, p. 121-177.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. The *Fusarium* laboratory manual. Iowa: Blackwell Publishing, 2006. 388p.

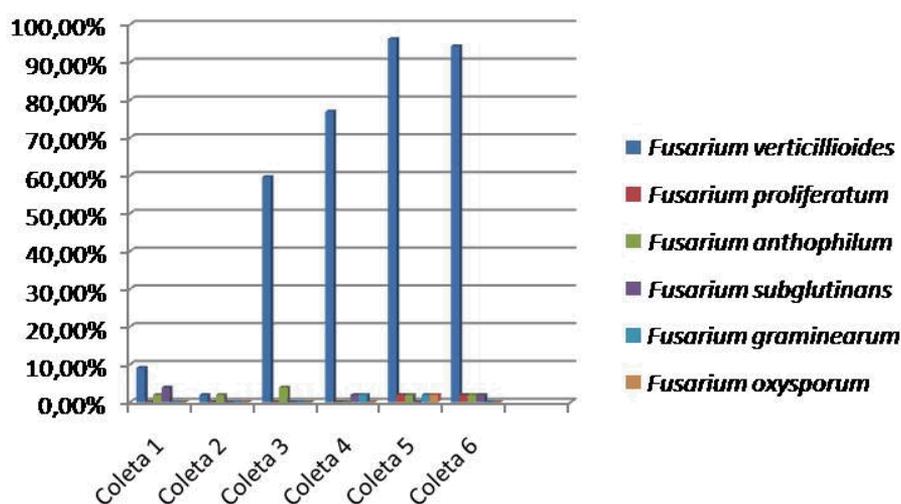
MUNKVOLD, G. P.; HELLMICH, R. L.; RICE, L. G. Comparison of fumonisin concentration in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids. Plant Disease, v. 83, p. 130-138, 1999.

NELSON, P.E.; TOUSON, T.A. MARASAS, W.F.O. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. Pennsylvania: University Press, 1983. 193p.

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 Journal, v. 97, p. 219-224, 2005.

ROCHA, L.O.; NAKAI, V.K.; BRAGHINI, R.; REIS, T.A.; KOBASHIGAWA, E.; CORRÊA, B. Mycoflora and co-occurrence of fumonisins and aflatoxins in freshly harvested corn in different regions of Brazil. International Journal of Molecular Science, v. 10, p. 5090-5193, 2009.

WAQUIL, J.M.; VILELLA, F.M.F.; SIEGFRIED, B.D.; FOSTER, J.E. Atividade biológica das toxinas do Bt, *Cry 1 A (b)*, e *Cry 1 F* em *Spodoptera frugiperda* (Smith) (*Lepdoptera* : *Noctuidae*). Revista Brasileira de Milho e Sorgo. v. 3, n. 2, p. 161-171, 2004.



**Figura 1** - Frequência relativa (%) de isolamento das diferentes espécies de *Fusarium* das amostras de grãos de milho das seis coletas.

