

**GABRIELA MARTINS REIS**

**DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS E FUMONISINAS E  
EXPRESSÃO DOS GENES *FUM* EM GRÃOS DE MILHO  
TRANSGÊNICO DA SEMEADURA À COLHEITA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Microbiologia do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa

Versão original

São Paulo  
2014

## RESUMO

REIS, G. M. **Distribuição de fungos e fumonisinas e expressão dos genes *FUM* em grãos de milho transgênico da semeadura à colheita.** 2014. 117 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Este estudo teve como objetivo geral avaliar a expressão dos genes *FUM* como indicativo da contaminação por *Fusarium verticillioides* e da produção de fumonisinas nos grãos de milho durante o processo de amadurecimento dos grãos. Os objetivos específicos foram: identificar a microbiota e a contaminação por fumonisinas no milho transgênico, em diferentes períodos do desenvolvimento dos grãos no campo; determinar o potencial toxigênico dos isolados de *F. verticillioides*; verificar o perfil de expressão de 16 genes *FUM* de *F. verticillioides* no milho; obter dendrograma filogenético através dos dados obtidos por sequenciamento parcial do gene *TEF-1 $\alpha$*  das cepas de *F. verticillioides* isoladas; comparar os resultados obtidos com os fatores climatológicos da região. O isolamento dos fungos foi realizado pela técnica da semeadura direta, utilizando Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol, e a identificação, em nível de gênero, por métodos morfológicos clássicos. Entretanto, os fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* foram identificados até espécie fazendo uso do sequenciamento parcial do gene do fator de alongação 1- $\alpha$  (*TEF-1 $\alpha$* ). A determinação de fumonisinas foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Constatou-se contaminação fúngica em 100% das amostras de milho, destacando-se o gênero *Fusarium* como o mais prevalente, com frequência variando de 3,85% nas amostras do estádio de grão leitoso (R2) (coleta 2) a 100% nas amostras no estádio de maturidade fisiológica (R6) (coleta 6). Dos isolados de *Fusarium* spp., 97% foram classificados como *F. verticillioides*. A presença de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> foi registrada em 100% e em 18,41% das amostras, respectivamente. A amplificação de todos os genes *FUM* foi constatada em 123 (33,8%) amostras de milho, com níveis de expressão de 3,88 (*FUM16*) a 7,65 (*FUM13*) (valores obtidos considerando a amostra calibradora). A totalidade dos isolados de *F. verticillioides* foram produtores de fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Não foram constatadas correlações positivas entre a porcentagem de *F. verticillioides*, a produção de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> e os fatores abióticos ( $p > 0,05$ ), o mesmo ocorrendo entre a expressão relativa dos genes *FUM*, os percentuais de isolamento de *F. verticillioides* e os níveis de contaminação por FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> ( $p > 0,05$ ). Entretanto, constatou-se correlação positiva entre a probabilidade de amplificação dos genes *FUM* e a fase de amadurecimento do grão, sendo a maior probabilidade atingida na fase de grão pastoso ( $p < 0,05$ ).

**Palavras-chave:** Fases de amadurecimento do grão. Fumonisinas. *Fusarium verticillioides*. Genes *FUM*. Milho transgênico.

## **ABSTRACT**

REIS, G. M. **Distribution of fungi and fumonisins and *FUM* genes expression in transgenic corn grains from sowing to harvest.** 2014. 117 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

This study evaluated the *FUM* gene expression in corn grains from sowing to harvest as evidence of *Fusarium verticillioides* contamination and fumonisins production. The specific objectives were: to identify the microbiota and fumonisin contamination in transgenic corn, in different periods of kernel maturation; to determine the toxigenic potential of *F. verticillioides* isolated strains; to verify the expression profile of *FUM* gene cluster (16 genes) in corn, using quantitative PCR technique; to obtain the transcription elongation factor *1α* (*EF-1α*) phylogenetic dendrogram for the isolated *F. verticillioides* strains and to compare the obtained data with the climatological factors of the harvesting region. For fungal isolation and identification, grains were seeded directly onto Dichloran-Rose Bengal Chloramphenicol Agar, followed by morphological characterization to the genus level. *EF-1α* partial gene sequencing was used for *Fusarium* species confirmation. FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> extractions were performed using immunoaffinity column followed by high-performance liquid chromatography analysis. All samples were contaminated with fungi. The frequencies of *Fusarium* sp. ranged between 3,85% (silking stage samples – R2) and 100% (physiological maturity stage samples -R6). From 257 isolates, 97% were identified as *F. verticillioides*. FB<sub>1</sub> was detected in 100% of the samples and FB<sub>2</sub> in 18,41%. All *FUM* genes were expressed in 123 samples (33,8%), the relative levels were variable in the samples from different harvest periods, with average ranging from 3.88 (*FUM16*) to 7.65 (*FUM13*), when compared to the calibrator sample. A 100% of the strains were able to produce FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>. Positive correlation among the *F. verticillioides* isolation percentage, FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> production and the abiotic factors was not detected ( $p > 0,05$ ), positive correlation was also not detected among the *FUM* gene cluster relative expressions, *F. verticillioides* isolation percentage and FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> production ( $p > 0,05$ ). However, a positive correlation was detected between the probability of *FUM* gene expression and the kernel maturity stage with the highest probability achieved in kernel milk stage -R3 ( $p < 0,05$ ).

**Key-words:** Kernel maturation stages. Fumonisins. *Fusarium verticillioides*. *FUM* gene cluster. Transgenic corn.

## INTRODUÇÃO

### 1 Milho (*Zea mays* L)

A planta de milho é uma monocotiledônea pertencente à família das gramíneas, atualmente denominada *Poaceae*, gênero *Zea*; espécie *Zea mays* L.

A mais antiga espiga de milho, datada de 7.000 a.C, foi encontrada no Vale do Tehucan, região onde hoje se localiza o México. Chamado de “alimento dos Deuses” pelos maias, o teosinte deu origem ao milho por meio de seleção artificial. Já na época do descobrimento das Américas, o milho era o alimento base de todas as civilizações. Ao longo do tempo, o homem promoveu uma crescente domesticação do milho por meio da seleção visual no campo, e hoje, das mais de 300 raças de milho conhecidas em todo mundo, praticamente todas tiveram sua origem nos trabalhos pioneiros do homem pré-colombiano (CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA, 2006).

**Figura 1.** Teosinte à esquerda até o milho moderno à direita.

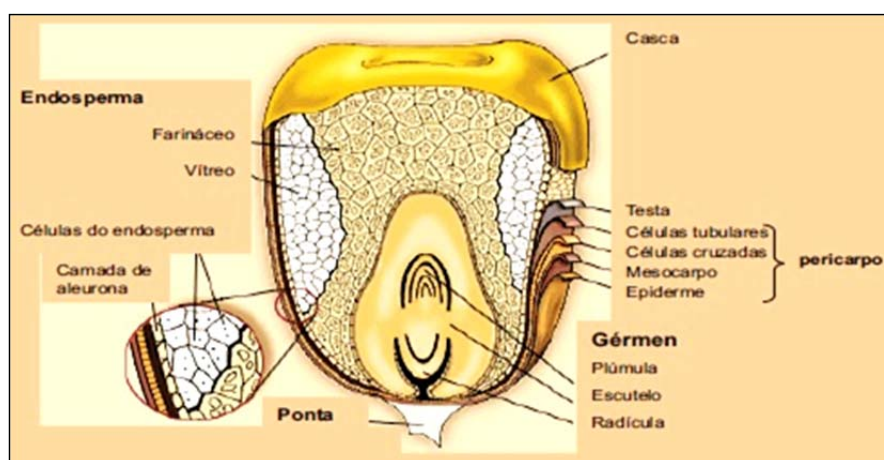


Fonte: CIB, 2006.

Quatro principais estruturas físicas formam um grão, sendo elas: o endosperma que representa aproximadamente 83% do peso seco do grão, consistindo principalmente de amido (88%), organizado na forma de grânulos, onde também estão presentes as proteínas de reserva (8%) e os carotenóides, substâncias lipídicas que conferem a cor aos grãos; o gérmen que representa 11% do grão de milho e concentra quase a totalidade dos lipídeos (óleo e vitamina

E) (83%) e dos minerais (78%) do grão, além de conter proteínas (26%) e açúcares (70%); o pericarpo (casca) que é a parede celular do gametófito maduro e compreende as camadas celulares externas que envolvem o endosperma e o embrião, representa 5% do grão, sendo a estrutura que protege as demais estruturas da elevada umidade do ambiente, insetos e microrganismos; e a ponta (2% do grão), é responsável pela conexão do grão ao sabugo, única área do grão não coberta pelo pericarpo, sua composição é essencialmente de material lignocelulósico (PAES, 2006).

**Figura 2.** Estrutura anatômica e composição química do grão de milho



Fonte: Paes, 2006.

Com um ciclo vegetativo bem variado, evidencia desde cultivares precoces, cuja polinização pode ocorrer 30 dias após a emergência, até aqueles cujo ciclo vital pode alcançar 300 dias. Contudo, nas condições brasileiras, a cultura do milho apresenta ciclo variável entre 110 e 180 dias, em função da caracterização dos cultivares (superprecoce, precoce e normal), período este compreendido entre a semeadura e a colheita (ALMEIDA, 2001).

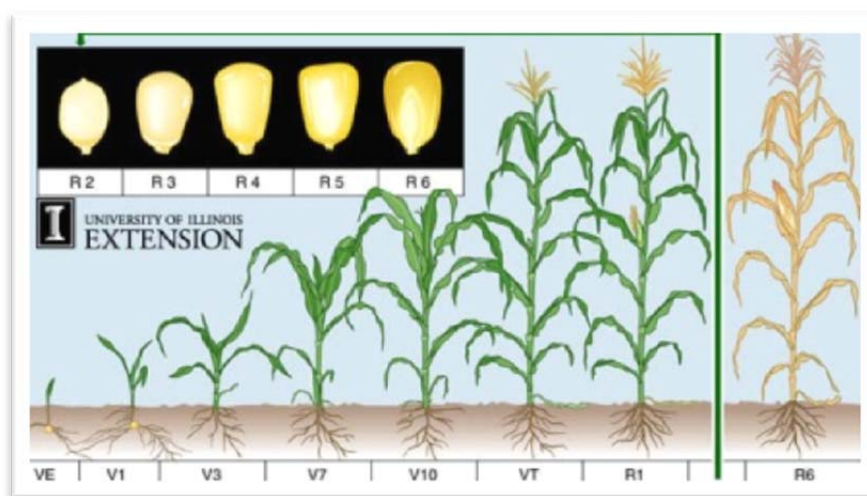
De forma geral, o ciclo da cultura compreende as seguintes etapas de desenvolvimento:

- germinação e emergência:** período entre a semeadura até o aparecimento da plântula, cuja duração, em função da temperatura e umidade do solo, pode variar entre 5 a 12 dias;
- crescimento vegetativo:** período entre a emissão da segunda folha e o início do florescimento, possui duração variável, fato que permite a caracterização dos cultivares quanto à extensão do ciclo;
- florescimento:** período entre a polinização e o início da frutificação, raramente ultrapassa 10 dias (R1);
- frutificação:** período entre a frutificação e o enchimento completo dos grãos, cuja duração é estimada entre 40 e 60 dias (R2 a R5);
- maturidade:** período entre o final da frutificação (R6) e o aparecimento da camada negra,

fase relativamente curta e indicativa do final do ciclo de vida da planta (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 2003).

Para maior facilidade de manejo e estudo, bem como para a possibilidade de estabelecer correlações entre elementos fisiológicos, climatológicos, fitogenéticos, fitopatológicos e fitotécnicos, o ciclo de cultura do milho foi dividido em estádios distintos de desenvolvimento (FANCELLI, 1986).

**Figura 3.** Estádios de desenvolvimento da cultura de milho.



A produção do milho no Brasil cresce a cada ano, sendo que na safra 2011/2012 a colheita foi de 65 mil toneladas, a safra 2012/2013 de 76 mil toneladas (4,2% maior) e na safra 2013/2014, a produção brasileira foi de 79 milhões de toneladas em uma área cultivada de 16 milhões de hectares (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013).

Atualmente, o Brasil é considerado o terceiro maior produtor e consumidor desse grão, estando atrás dos Estados Unidos e China e terceiro maior exportador mundial de milho, superado pelos EUA e Argentina (CONAB, 2012). Em função da necessidade de aumento da produtividade, o milho tem sido submetido a um intenso melhoramento genético, resultando na existência de diversos híbridos comerciais.

## **2 O Milho transgênico (Bt) e as toxinas Cry**

Sendo o milho cultivado em quase todas as regiões do país, com grande diversidade de situações e níveis tecnológicos, a difusão e adoção de variedades geneticamente modificadas

resistentes à insetos, torna-se uma saída simples e compatível com as situações produtivas encontradas no Brasil. Assim, a produção e adoção de tecnologias redutoras de custos e poupadora de insumos químicos torna-se acessível a qualquer agricultor (LERAYER et al., 2011).

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 os genes clonados da bactéria *Bacillus thuringiensis*.

**Figura 4.** Duas das principais pragas do milho.



A- *Spodoptera frugiperda* - lagarta do cartucho. B- *Helicoverpa zea* - lagarta da espiga.

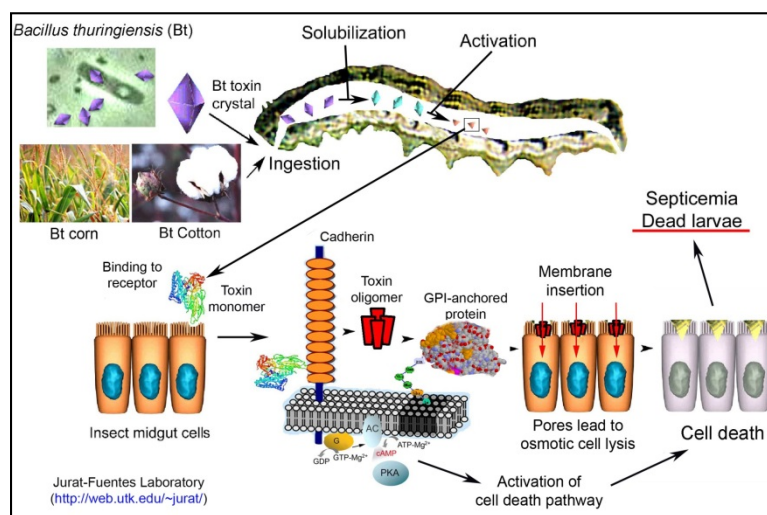
*Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria gram-positiva e entomopatogênica, aeróbica ou anaeróbica facultativa, encontrada naturalmente no solo. Como outras bactérias, esta espécie pode permanecer em latência na forma de endósporos, sob condições adversas. Durante a produção do esporo, essas bactérias sintetizam proteínas que se acumulam nas extremidades dos esporos sob forma de cristais em um dos polos da célula (LERECLUS, 1988). Estes cristais podem ser compostos por uma ou várias proteínas Cry, também denominadas de  $\delta$ -endotoxinas ou *Insecticidal Crystal Proteins* (ICPs). Tais proteínas são tóxicas, porém apresentam a vantagem de serem específicas, por isso inócuas para a maioria dos organismos, incluindo muitos insetos benéficos (HERRERO et al., 2001). O gene codificador para a  $\delta$ -endotoxina, *Cry1Ab*, por exemplo, clonado de Bt tem sido amplamente utilizado por várias empresas nos EUA (BOULDER, 1993; IGNOFFO; GREGORY, 1972; WAQUIL et al., 2004).

As toxinas Cry apresentam formas variáveis e constituem proteínas com massa variável entre 27 a 140 kDa (AUGUSTYNIAK; DABERT; WYPIJEWSKI, 1997). Os genes codificadores de  $\delta$ -endotoxinas estão localizados, em sua maioria, em grandes plasmídeos.

Alguns isolados de Bt contêm múltiplos genes de  $\delta$ -endotoxina (KRONSTAD; SCHNEPF; WHITELEY, 1983).

O mecanismo de ação das  $\delta$ -endotoxinas, constituintes dos cristais, se dá da seguinte maneira: as proteínas Cry (protoxinas) são solubilizadas e proteoliticamente convertidas em polipeptídeos menores no trato digestivo das larvas suscetíveis. Estes polipeptídeos associam-se a receptores específicos de ligação nas microvilosidades apicais das células do intestino dos insetos, causando lise osmótica através da formação de poros na membrana (FIUZA et al., 1996).

**Figura 5.** Mecanismo de ação das proteínas Cry em insetos suscetíveis.



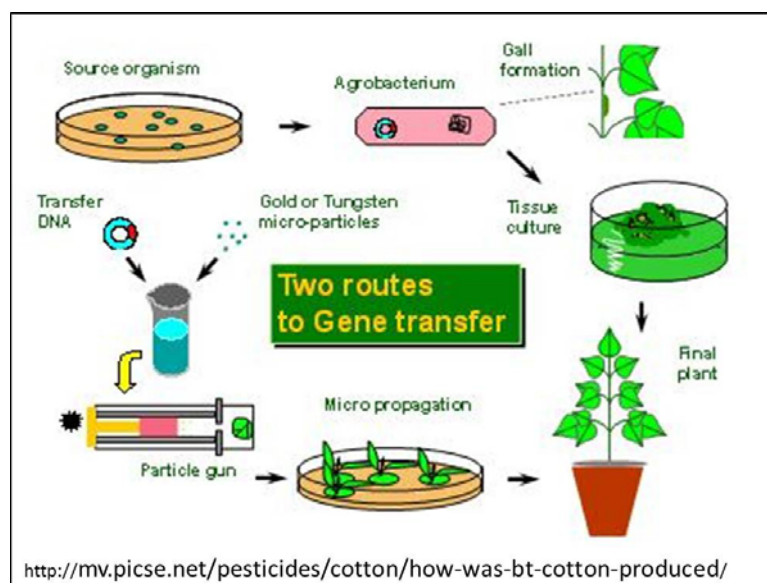
Diversas vantagens também são atribuídas às variedades de milho Bt, tais como a necessidade de uso de menor quantidade de inseticidas, oferecendo menor risco de contaminação do lençol freático e dos rios, além de um menor consumo de água, gerando maior produtividade e maior rentabilidade (CASTRO, 2008), e o fato de não haver diferença na abundância e variabilidade das espécies de insetos nos campos plantados com milho Bt, quando comparados com os convencionais não tratados com inseticida, com exceção da espécie-alvo e de seus parasitas específicos (LERAYER et al., 2011).

Segundo Carneiro et al. (2009), existem duas metodologias para a inserção de genes codificadores para as toxinas Cry no genoma do milho: a transformação genética indireta e a direta. A metodologia direta envolve o bombardeamento de células vivas com o DNA de interesse através da utilização de micropartículas de tungstênio ou ouro cobertas com o gene (SANFORD et al., 1987), enquanto que a metodologia indireta se dá através da transformação



via bactéria *Agrobacterium tumefaciens*. Essa bactéria possui o plasmídeo Ti, que pode se replicar independentemente do genoma da bactéria (CARNEIRO et al., 2009; GELVIN, 2003). A Figura 6 esquematiza essas duas metodologias citadas acima em algodão, a exemplo do que ocorre para os genes Bt em milho.

**Figura 6.** Mecanismo de inserção de genes bacterianos em tecidos de plantas.



Em 1995, as primeiras plantas transgênicas foram aprovadas para venda nos EUA, tais como milho expressando Cry1A(b) (Maximizer<sup>TM</sup> da Novartis Corporation, Basileia-Cidade, Basileia, Suíça), algodão expressando Cry1A(c) (Bollgard<sup>TM</sup> da Monsanto, Creve Coeur, Missouri, Estados Unidos) e batata expressando Cry IIIA (Newleaf<sup>TM</sup> da Monsanto, Creve Coeur, Missouri, Estados Unidos) e em 1996, os milhos Bt já ocupavam mais de 1,2 milhões de hectares nos EUA (JOUANIN et al., 1998).

Menos de 20 anos depois o Brasil já possui o título de terceiro maior produtor de transgênicos, responsável por 12% da área total com plantação de espécies transgênicas no mundo, superado pela Argentina e EUA (JAMES, 2007).

Para a produção do milho Bt que produz a proteína Cry1F, o gene *cry1F* foi originalmente isolado de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2005). Esta proteína controla efetivamente algumas larvas de insetos lepidópteros, como por exemplo a broca do milho europeia (*Ostrinia nubilalis*). Cry1F é uma pró-toxina de 130 kDa que é clivada a uma toxina ativa de 65 kDa (GAO et al., 2006). Segundo a Environmental Protection Agency (2005), há um risco mínimo de

toxicidade ou de efeitos alérgicos em humanos ou animais expostos à proteína Cry1F, e ainda há uma certeza de que não há efeitos maléficos à saúde humana ou animal devido à exposição aos resíduos desta proteína. Além disso, esta mesma agência afirma que a proteína Cry1F não causa efeitos prejudiciais mensuráveis para população microbiológica nos solos, mesmo em níveis muito maiores ao esperado em culturas de milho Bt Cry1F. No Brasil, em 2008, ocorreu a regulamentação para cultivo do milho Bt Cry1F (CENTER FOR ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT, 2013).

### **3 Micobiota do milho e *Fusarium verticillioides***

Os grãos em geral, são constantemente expostos, no campo, a uma ampla variedade de microrganismos, provenientes da poeira, água, plantas doentes, insetos, fertilizantes e material orgânico de animais. Seus esporos ou fragmentos de micélio darão início à contaminação e desenvolvimento do fungo na planta, particularmente em sementes imaturas. A quantidade e os tipos destes microrganismos dependem, principalmente, das condições climáticas durante o plantio e do estágio de desenvolvimento e maturação do grão (LACEY, 1975; SILLIKER; ELLIOTT, 1980).

Os grãos de milho são frequentemente contaminados com espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Os fungos são causadores de diminuição da germinação e de lesões nas plântulas, desencadeando menor desenvolvimento destas (ROSSETTO; SILVA; ARAÚJO, 2005). Além do emboloramento visível, causam descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, perda da qualidade e produção de micotoxinas (CHRISTENSEN; KAUFMAN, 1965).

As principais espécies do gênero *Fusarium* associadas aos grãos de milho são *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* (membros do complexo *Gibberella fujikuroi*) e *F. graminearum*. A espécie *F. verticillioides*, considerada como principal patógeno do milho, predomina em regiões tropicais e áreas temperadas úmidas, mas é pouco frequente em zonas temperadas frias. Por sua vez, *F. graminearum* predomina em regiões de clima tropical a temperado (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Espécies do gênero *Fusarium*, necessitam para seu crescimento de teor de umidade de 20% /21% e Aa entre 0,80 e 0,90 (CAHAGNIER; MELCION; RICHARD-MOLARD, 1995; LACEY; MEGAN, 1991).

*F. verticillioides* (Nirenberg), sinônimo de *F. moniliforme* (Sheldon) é uma espécie fúngica ubíqua, predominante em regiões tropicais e temperadas. Possui uma fase anamórfica (assexuada), sendo denominado de *F. verticillioides*, e uma teleomórfica (sexuada), conhecida

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

