



## **IMPACTO DA TOXINA *Bt* SOBRE COMUNIDADES DE LEVEDURAS EPIFITICAS**

ANA GABRIELE **BARBOSA**<sup>1</sup>; ROSELY SANTOS DO **NASCIMENTO**<sup>2</sup>; ITAMAR S.  
**MELO**<sup>3</sup>  
**Nº 12413**

### **RESUMO**

O cultivo de milho (*Zea mays*) está entre as mais importantes culturas do mundo, e o Brasil está em terceiro lugar na produção mundial. Com o advento da biotecnologia foram desenvolvidas plantas geneticamente modificadas que expressam a toxina *Bt*, conferindo à planta hospedeira alto padrão de resistência a insetos evitando, assim, grandes perdas de produção. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da toxina *Bt* presente nas folhas de milho transgênico AG8088 YG e compará-lo com as variedades não transgênicas AG8088 e BRS 1055, quanto ao número de colônias de leveduras epifíticas apresentadas, através da técnica de diluição e espalhamento sobre superfície. A variedade transgênica de milho reduziu, significativamente, a quantidade de colônias de leveduras epifíticas, quando comparado com as demais variedades não transgênicas. Com relação à diversidade de leveduras analisadas de acordo com a morfologia das colônias, verificou-se variação inexpressiva frente à transgênica.

---

<sup>1</sup> Bolsista Embrapa: Graduação em Ciências Biológicas, Uniararas, Araras-SP, anagabrieleb@yahoo.com

<sup>2</sup> Colaboradora: Analista, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

<sup>3</sup> Orientador: Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP



## ABSTRACT

Corn cultivation (*Zea mays*) is among the most important ones of the world and Brazil holds third place in world's production. Due to biotechnology genetically-modified plants which present the Bt toxin have been developed, giving a high pattern of resistance to their host insect, thus avoiding large production losses. The objective of this study was to evaluate the influence of Bt toxin in the leaves of transgenic corn YG AG8088 on epiphytic yeast communities, through the technique of dilution and spreading on the surface. The transgenic variety reduced the amount of epiphytic yeasts colonies, compared to all other non-transgenic varieties. Comparing both treatments, it was obtained an inexpressive variation in the diversity of yeasts colonies morphology on transgenic group.

## INTRODUÇÃO

No Brasil, o milho é cultivado em praticamente todo o território (EMBRAPA, 2009), pois se trata de um produto agrícola de grande importância na alimentação animal e humana. Todavia, um dos fatores que podem comprometer o rendimento e a qualidade da produção é a incidência de pragas. Dentre as pragas que mais causam prejuízos para esta cultura, destaca-se a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, que ao encontrar condições favoráveis aumenta sua população, que destrói folhas e cartucho, comprometendo assim a produção de grãos (PENCOE, MARTIN, 1981).

Visando minimizar as perdas e otimizar a produção, foi desenvolvido com o advento da biotecnologia, plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos. Através de apuradas técnicas de laboratório, um gene (*Bt*) clonado da bactéria *Bacillus thuringiensis* foi introduzido em plantas de milho, tornando os híbridos resistentes ao ataque de insetos-pragas através da expressão da toxina *Bt*, dando origem ao milho geneticamente modificado (BOULDER, 1993; ARMSTRONG et al., 1995).

As leveduras são organismos que pertencem ao reino Fungi, e possuem características típicas dos fungos como presença de parede celular rígida, núcleo organizado com membrana nuclear (célula eucariótica), aclorofilados, nutrição heterotrófica por absorção, entre outras (KURTZMAN, FELL, 1998). São encontradas em diversos ambientes, porém devido à síntese de açúcar simples, as plantas tornam-se excelentes *habitat* para estes organismos.

Diversos trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de avaliar a interferência da toxina *Bt* em organismos alvo, porém pouco se sabe a respeito do impacto desta



toxina sobre a biodiversidade de micro-organismos que estabelecem relações comensalísticas ou simbióticas sobre a superfície das plantas (BARBIERI, CARVALHO, 2001). A superfície foliar ou filoplano é considerado um *hábitat* rico em nutrientes nas quais varias espécies podem ser encontradas (ANDREWS, HARRIS 2000), sendo as bactérias e leveduras presentes normalmente em maior número (LAST, DEIGHTON, 1965). Estes organismos colonizam as folhas desde o inicio de seu desenvolvimento e formam uma barreira natural na sua superfície. De acordo com Droby et al (2003), diversas leveduras foram registradas como agentes de controle de patógenos, pela sua ocorrência natural; agindo principalmente por competição de nutrientes e indução de resistência, mostrando assim que são grandes auxiliadas para o estabelecimento da planta.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a possível influência da toxina *Bt*, presentes nas folhas de milho transgênico nas comunidades de leveduras epifíticas, utilizando as variedades AG 8088 e BRS 1055 que são híbridos simples, e estes serão comparados com a variedade AG 8088 YG transgênica, quanto ao número de colônias presentes em suas folhas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Área da coleta**

As amostras foram cultivadas no campo experimental da Embrapa Meio Ambiente, localizado no município de Jaguariúna, SP, a 570 m de altitude, na latitude de 22° S e longitude de 47°W. Sendo que 9 vasos foram submetidos a condições seca (face), e 9 vasos submetidos à condição úmida próximo a estação de tratamento de esgoto da unidade. As sementes das variedades utilizadas foram obtidas com a Embrapa Milho e Sorgo, e distribuídas em vasos de 30 litros, de modo que cada exemplar se apresentasse com três plantas por vaso, e três vasos de cada variedade.

A primeira coleta ocorreu no dia 27 de Fevereiro, a segunda no dia 13 de Março e a terceira no dia 28 de Março, conforme as fases de desenvolvimento do milho, sendo iniciada entre os estágios V3 e V5 de desenvolvimento e terminada entre os estágios VT e R1 (FANCELLI et al, 2000). As folhas mais velhas eram assepticamente coletadas em sacos plásticos, transportadas para o laboratório e processadas.

### **Efeito de plantas *Bt* em leveduras epifíticas: avaliação do número de colônias**

No laboratório, as folhas foram cortadas assepticamente com o auxílio de um furador de rolha de 16 mm formando 10 halos de cada amostra, que foram colocados em frascos Erlenmeyers com 25 mL de uma solução de água salina 0,85% com uma gota de Tween 80 para cada 500 mL de solução. Estes foram colocados em ultrassom por 30 segundos e mantidos em agitador mecânico (“shaker”) por 60 minutos a 150 rpm.

Após a agitação, foram realizadas diluições decimais seriadas até  $10^{-3}$  e estas foram semeadas em triplicata pela técnica de espalhamento de superfície em meio YMA acrescido de 100mg de cloranfenicol para cada 1000 mL de meio de cultura, e incubadas a 25°C por 4-5 dias. Após o período de incubação foi realizado a leitura das placas através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), com o auxílio de um contador de colônias. Estas foram selecionadas com base em suas diferentes características fenotípicas e purificadas pela técnica do esgotamento em placa de Petri contendo o mesmo meio de cultura utilizado anteriormente, a fim de se obter culturas com características morfológicas distintas.

Para expressar a quantidade de colônias por  $\text{cm}^2$  foi realizado o cálculo da área foliar, para tanto foi calculado a área do círculo, conforme apresentado na seguinte fórmula:

$$=(3,1416*0,8*0,8)*n^{\circ} \text{ de halos} * 2$$

Como os tratamentos se apresentavam em triplicata, foi tirada a média de colônias por tratamento de cada coleta somente da diluição  $10^{-1}$ , pois esta foi a que apresentou resultados mais significativos.

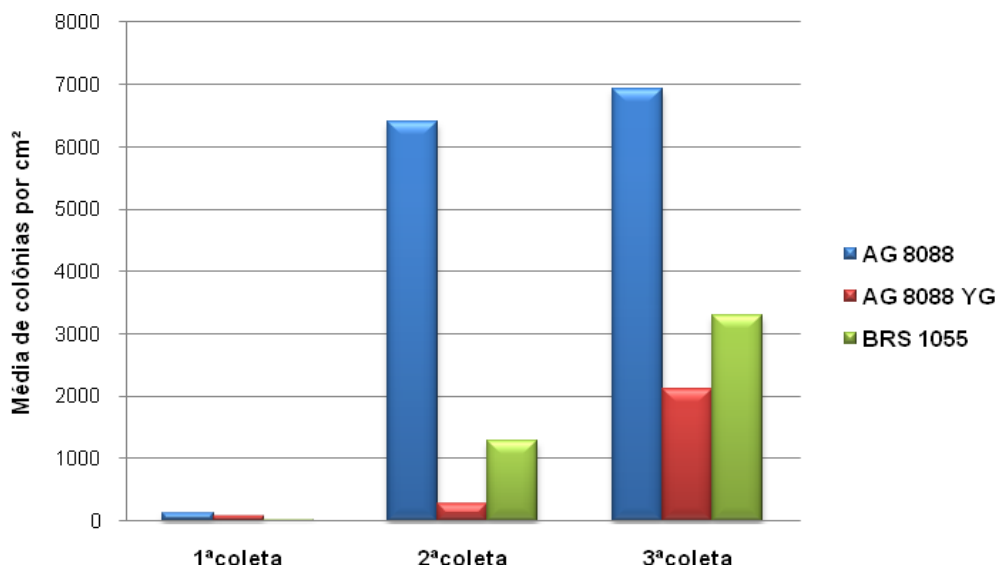
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Quantificação das colônias**

A quantidade de colônias de leveduras obtidas nas amostras de folhas das diferentes variedades de milho na condição úmida está representada na figura 1.

Diante dos resultados obtidos nestas condições úmidas, a primeira coleta apresentou os menores índices de colonização de micro-organismo. Contudo, nas outras coletas este número aumentou consideravelmente, sendo que na segunda coleta a variedade AG 8088 apresentou os maiores índices quando comparados com as demais variedades, onde é possível observar uma média de colônias por  $\text{cm}^2$  igual

a 6.403 seguido pela variedade BRS 1055 com valores iguais a 1.292 e a variedade transgênica, AG 8088 YG, com índices iguais a 283. Na terceira coleta a variedade AG 8088 continuou apresentando índices superiores, com médias iguais a 6.922 por cm<sup>2</sup>, seguidos pela variedade BRS 1055 com valores iguais a 3.305 e a variedade transgênica AG 8088 YG com uma média de 2.124 colônias por cm<sup>2</sup>.



**FIGURA 1.** Comparação do número de colônias de leveduras por cm<sup>2</sup> entre as variedades AG 8088, AG 8088 YG (transgênico) e BRS 1055, sob condições de umidade.

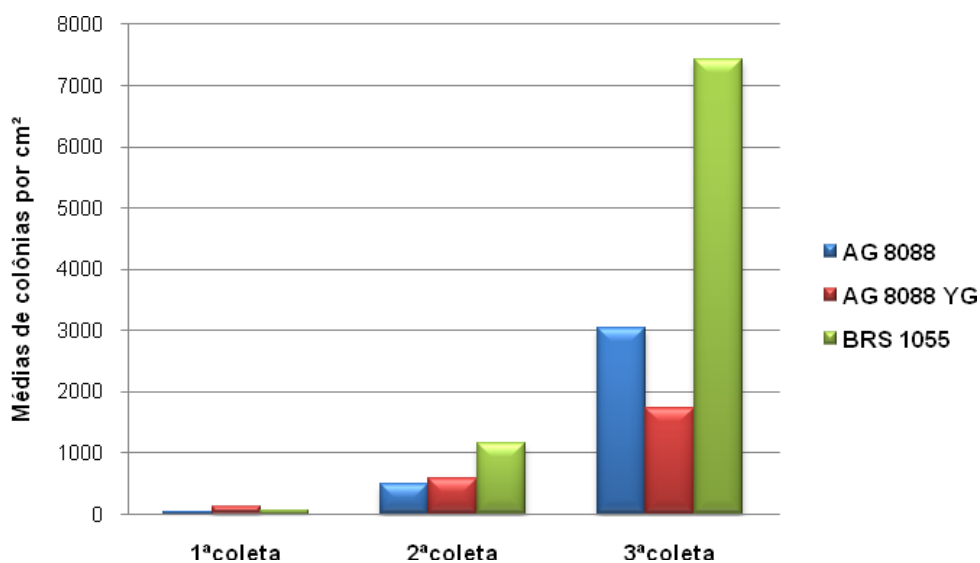
De acordo com Azevedo (1998), a composição das espécies epifíticas presentes no hospedeiro pode variar conforme a idade da planta, indicando que quanto mais jovem, menos estabelecida está a comunidade de micro-organismos. Normalmente, os primeiros organismos a colonizarem as folhas são as bactérias (BLAKEMAN, 1991). As leveduras começam a se tornar mais abundantes com o passar do tempo, devido à disponibilidade de novos nutrientes e grandes quantidades de açúcares (STADLER, MULLER, 1996); explicando assim tais resultados.

Porém, foi constatado que a planta transgênica apresentou, de modo geral, valores inferiores às demais variedades. Até o presente momento, não foram encontrados trabalhos com isolamento de micro-organismos epifíticos provenientes de plantas transgênicas, porém diversos trabalhos foram publicados relatando o efeito de plantas transgênicas sobre micro-organismos da rizosfera. Donegan et al. (1995), ao adicionar a toxina *Bt* ao solo, não observou qualquer efeito detectável sobre os números totais de bactérias e fungos; o mesmo foi observado por Saxena e Stotzky (2001) ao trabalhar com duas linhagens de milho e a relação da toxina com micro-

organismos presentes na rizosfera. Já no estudo realizado por Wolfenbarger & Phifer (2000), as variedades transgênicas além de causarem a mortalidade de insetos adultos, provocaram a diminuição da diversidade bacteriana na rizosfera; tais publicações indicam a carência de trabalhos abordando o efeito da toxina *Bt* em micro-organismos presentes sobre a superfície foliar.

De acordo com Azevedo (1998), as interações micro-organismos-plantas são extremamente importantes para que o equilíbrio seja mantido; muitas vezes a extinção ou diminuição de um grupo de microrganismos que vivem em simbiose com plantas superiores pode causar danos e até extinção do hospedeiro.

Na figura 2 são apresentadas as quantidades de colônias de leveduras encontradas nas amostras que foram expostas a condição seca. É possível observar que assim como na condição úmida, a primeira coleta também apresentou baixos índices de colonização. Porém, na segunda coleta a variedade BRS 1055 apresentou os maiores índices, sendo estes iguais a 1.147, seguidos pela variedade AG 8088 YG apresentando valores iguais a 580, e a variedade AG 8088 mostrou uma média de 497, indicando novamente uma pequena diferença entre a variedade transgênica e não transgênica AG 8088. Na Terceira coleta a variedade BRS 1055 continua a se apresentar com índices superiores às demais, com uma média de 7.419 colônias por cm<sup>2</sup>, porém é possível observar que ocorre uma inversão entre as variedades AG 8088, que apresenta índices iguais a 3.036 e a variedade transgênica AG 8088 YG com valores iguais a 1.741.



**FIGURA 2.** Comparação do número de colônias de leveduras por cm<sup>2</sup> entre as variedades AG 8088, AG 8088 YG (transgênico) e BRS 1055, em condições de seca.

Todos os valores obtidos na condição seca foram inferiores quando comparados com a condição úmida. As condições climáticas apresentam relação direta com as variações na população de micro-organismos epifíticos, sendo a disponibilidade de água o fator mais relevante (RUINEN, 1963; LIN et al, 1992; AZEVEDO, 1998), comprovando assim os diferentes valores observados entre as condições.

Na condição seca também foi possível constatar uma baixa incidência de unidades formadoras de colônia na variedade transgênica (AG 8088 YG), quando comparada com as demais.

Tanto na condição úmida quanto na condição seca, é possível observar uma diferença na quantidade de colônias de leveduras totais presentes nas variedades utilizadas. Esta diferença de valores entre os hospedeiros pode ser explicada devido à possível diferença na disponibilidade de açúcar simples e na composição química apresentada pela superfície da folha de cada variedade, pois são estes compostos que permitem a colonização desses nichos por parte das leveduras que dependem de fontes de carbono orgânico para seu crescimento e obtenção de fontes de energia (SPERANDIO, 2012).

### Isolamento das leveduras

Os valores obtidos na primeira coleta foram inexpressivos, devido à imaturidade da planta de milho. Foram obtidos 74 isolados provenientes da 2ª e da 3ª coleta em ambas as condições das quais foram submetidas às amostras. A tabela 1 apresenta resultados obtidos quanto à porcentagem das leveduras totais isoladas das folhas de cada variedade. Sendo que a variedade BRS 1055 apresentou 8% de isolados, sendo este o maior índice na segunda coleta. Na terceira coleta a maior quantidade de isolados foi obtida com a variedade AG 8088, que apresentou 32% de isolados.

**Tabela 1:** Porcentagem (%) de leveduras totais encontradas nas folhas das diferentes variedades.

Variedade	2ª Coleta	3ª Coleta	Total por variedade (%)
<b>AG 8088</b>	7	32	39
<b>AG 8088 YG</b>	5	28	34
<b>BRS 1055</b>	8	19	27



Observando a tabela 1, fica evidente que a porcentagem final de isolados apresentou pequenas diferenças entre as variedades de milho, indicando que mesmo a variedade transgênica apresentando valores inferiores de unidades formadoras de colônia durante o plaqueamento, a presença da toxina *Bt* não interferiu significativamente na quantidade de leveduras isoladas, porém são necessários estudos moleculares para comprovar tais observações.

As variações observadas dentro de um mesmo hospedeiro podem sugerir que o crescimento de leveduras tem íntima relação com a disponibilidade e distribuição dos nutrientes, além das condições físicas, como luz, temperatura, umidade e, principalmente, disponibilidade de água (RUINEN, 1963).

## CONCLUSÃO

A população de leveduras associadas às folhas da variedade transgênica apresentou densidade populacional inferior quando comparadas com as variedades comuns; indicando que a toxina *Bt* pode ser o agente causador da redução do número de colônias de micro-organismos epifíticos. Porém, a quantidade de isolados não apresentou índices de variação, podendo indicar que o agente causador não interfere no número total de isolados e sim de colônias.

Diante de tais resultados, análises moleculares se mostram como uma ferramenta fundamental para se determinar a real variedade dos isolados obtidos, para que posteriormente possamos determinar a possível interferência da toxina sobre micro-organismos.

## AGRADECIMENTOS

A Embrapa Meio Ambiente pelo apoio com a bolsa de iniciação científica, pelo suporte e estrutura para realização dos experimentos.

## REFERÊNCIAS

ANDREWS, J. H.; HARRI, R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v. 38, p.145-180, 2000.





ARMSTRONG, C. L.; et al. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 550-557. 1995.

AZEVEDO, J.L. **Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico**. In Ecologia microbiana. Editora Embrapa, CNPMA, Jaguariúna. p.445-461, 1998.

BARBIERI, R.; CARVALHO, I. F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7, p.79-83,2001.

BLAKEMAM, J. P. Foliar bacterial pathogens: epiphytic growth and interactions on leaves. **Journal of Applied Bacteriology**, v.70, p.49-59, 1991.

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

DONEGAN, K.K.,et al., (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.

DROBY, S.; et al., Influence of food additives on the control of post-harvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. **Post-harvest Biology and Technology**, The Netherlands, v. 27, n. 2, p. 127-135, 2003.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <[http://www.embrapa.br/kw\\_storage/keyword.2009-07-09.5363093788](http://www.embrapa.br/kw_storage/keyword.2009-07-09.5363093788)>. Acesso em: 18 de Junho de 2012.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Ecofisiologia e fenologia**: Produção de milho. Guaíba: Agropecuária, p. 21-54, 2000.

FUENTEFRIA, A.M. *Trichosporon insectorum* SP. nov., a new anamorphic basidiomycetous killer yeast. **Mycological Research**, London, v. 112, p.93-99, 2008.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeasts, a taxonomic study**. 4. Ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p.1088,1998.

LAST, F.T.; DEIGHTON, F.C. The non parasitic microflora on the surfaces of living leaves. **Transactions of the British Mycological Society**, v.48, p.83-99, 1965

LIN, C. et al. Epiphytic microflora on Alfafa and Whole-Plant Corn. **Science**. v. 75, n. 9, 1992.

MAUTONE, J. N. **Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isoladas de folhas de figueiras do parque de Itapuã, Brasil**. Porto Alegre RS, 2008. 124p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



PENCOE, N. L.; MARTIN, P. M. Development and reproduction of fall armyworm on several wild grasses. **Environmental Entomology**, College Park, v.10, n. 6, p. 999-1002, 1981.

RUINEN, J. The phyllosphere II: yeasts from the phyllosphere of tropical foliage. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, p. 425-438, 1963.

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. **Biochemistry**, v. 33, p.1225–1230, 2001.

SPERANDIO, E. M. **Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a plantas do Cerrado**, Brasil. Brasília DF, 2012. 100p. Dissertação(Mestrado) – Universidade de Brasília.

STADLER, B., MULLER, T., Aphid honeydew and its effect on the phyllosphere microflora of *Picea abies* (L.) Karst. **Oecologia**, v. 108, p. 771-776, 1996.

WOLFENBARGER, L.L; PHIFER, P.R.;The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. **Science**, v. 290: p. 2088–2093; 2000.