

BIODIVERSIDADE GENÉTICA E FENOTÍPICA RELACIONADA À TOLERÂNCIA À RADIAÇÃO UV-B E CALOR DE FUNGOS DECOMPOSITORES ZIGOMICETOS MUCORÓIDES.

Luciana P. Dias; Paulo C. Ferreira; Maiara P dos Santos; Michele S. Pinheiro; Liliana A.A.P. Pasin; Drauzio E.N. Rangel

Universidade do Vale do Paraíba/ Faculdade de Educação e Artes (FEA)/ Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D). Av. Shishima Hifumi, 2911 – São José dos Campos, SP, CEP 12.244-000, drauzio@univap.br

Resumo – A biodiversidade genética e fenotípica (fisiológica) de zigomicetos mucoróides decompositores foi avaliada quanto à tolerância à radiação UV-B e calor na germinação em diferentes meios de cultura. Os isolados foram coletados na Universidade do Vale do Paraíba. Os esporangiósporos foram expostos à radiação UV-B com duas lâmpadas fluorescentes a uma irradiância de 870 mW m⁻² por 2, 3 e 4 horas. Os esporangiósporos em suspensão também foram mantidos em banho-maria a 47 ± 1°C por 1, 2, 3 e 4 horas. Foi observado que: 1) todos os isolados crescidos no meio PDA foram mais tolerantes a radiação UV-B do que os isolados crescidos no meio CZAPEK; 2) todos os isolados crescidos no meio CZAPEK foram mais tolerantes ao calor do que os isolados crescidos no meio PDA; 3) todos os isolados tiveram alta tolerância a radiação UV-B e calor; 4) o isolado coletado de excrementos do cavalo Zaina foi o mais tolerante tanto para a radiação UV-B quanto para o calor do que os outros isolados; 5) verificou-se que a biodiversidade fisiológica dos isolados pode ser avaliada de acordo com sua tolerância a radiação UV-B e calor.

Palavras-chave: zygomycetes mucoróides, radiação UV-B, calor, meio de cultura, fisiologia de fungos.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas, Microbiologia.

Introdução

A Ordem Mucorales, classe zigomicetos é a ordem com maior número de representantes (299 espécies) e diversidade morfológica (HAWKSWORTH et al. 1995). A maior parte dos gêneros da ordem Mucorales são organismos saprófitos, simbioses, parasitas facultativos de animais e vegetais (ALEXOPOULOS, MIMS; BLACKWELL, 1996; ALVES et al., 2002).

Os fungos coprófilos podem passar pelo trato intestinal dos animais e crescer nas fezes ou colonizar posteriormente as fezes. Estes fungos desempenham um importante papel no ecossistema, pois quebram o substrato e reciclam dos micronutrientes causando a degradação de bilhões de toneladas de fezes produzidas pelos herbívoros (MUELLER; BILLS; FOSTER, 2004).

Várias mudanças ambientais estão ocorrendo nos ecossistemas terrestres, incluindo o aumento da radiação solar ultravioleta-B e aquecimento nas latitudes mais elevadas (CALDWELL et al., 2002).

Dentre do espectro da radiação ultravioleta, a radiação UV-B (290–320 nm) é a mais prejudicial para os sistemas biológicos, como demonstrados pelos espectros de ação desenvolvida por vários microrganismos (PAUL et al., 1997). A radiação UV-B é diretamente absorvida pelo DNA e causa

danos diretos no DNA (e.g. dímeros de pirimidina) e mutação.

Com o efeito do aquecimento global, a decomposição de matéria orgânica poderá ser reduzida porque a maioria dos microrganismos vive na faixa mesofílica de temperatura. A alta temperatura afeta as células de diferentes maneiras. O calor úmido causa a desnaturação das proteínas (SETLOW; SETLOW, 1995), desorganização da membrana e parede celular e inativação do metabolismo do sistema respiratório (CRISAN, 1973).

Características fenotípicas, como é o caso da tolerância à radiação UV e radiação térmica, têm uma base genética complexa e que é altamente influenciada pelo meio ambiente (RANGEL et al., 2004; RANGEL; ANDERSON; ROBERTS, 2008). Portanto, na natureza, o fungo coprófilo poderá se tornar mais ou menos tolerante à radiação UV-B e calor de acordo com o substrato de crescimento.

O presente estudo teve como objetivo conhecer a biodiversidade fisiológica de zigomicetos mucoróides decompositores, quanto à tolerância à radiação UV-B e calor na germinação dos esporangiósporos produzidos em diferentes meios de cultura.

Material e Métodos

Isolados e cultivo

Os isolados foram coletados através excrementos de quatro cavalos na Universidade do Vale do Paraíba em agosto de 2008 e mantidos em culturas estoque refrigeradas, sendo esses nomeados: Cicarelli, Doc Beaver, Papulsa e Zaina.

Os isolados foram retirados da cultura estoque e transferidos para placas de Petri (Poliestireno, 95 x 15 mm), Cada isolado, cresceu respectivamente em 23 ml de batata dextrose agar médio (PDA) (Difco, Detroit, MI), e CZAPEK Solução Agar (Difco, Detroit, MI), todos foram mantidos no escuro em $28 \pm 1^\circ\text{C}$ por 2 dias. Para cada experimento, três diferentes culturas foram produzidas, uma para cada replicação do experimento.

Suspensão de esporos

Os esporos de todos os quatros isolados foram colhidos com o auxílio da alça de platina e suspensos em 4 ml de água destilada esterilizada em tubo de ensaio de poliestireno 15-ml (Corning®, Corning NY, USA).

Exposição à radiação UV-B

De cada suspensão foi coletada uma alíquota de 40 μl e imediatamente colocado no centro da placa em 4 ml CZAPEK mais 0,004% (w/v) de benomyl com 25% do ingrediente ativo (Hi-Yield Chemical Company, Bonham, TX, USA) em placa de Petri (poliestireno 35 x 10 mm, Fisher Scientific Co., Pittsburgh, PA, USA).

Após a inoculação no meio de cultura, os esporangiósporos foram expostos à radiação UV-B com duas lâmpadas fluorescentes TL 20W/12 RS (Philips, Eindhoven, Holland) a uma irradiância de 870 mW m^{-2} e irradiados por 2, 3 e 4 horas. O material foi coberto com filtro de diacetato de celulose (JCS Industries, Le Miranda, CA) usado para excluir a radiação UV-C e o curto comprimento de onda UV-B ($<290\text{nm}$). O controle não foi exposto à radiação UV-B, mas ele foi inoculado em CZAPEK mais benomyl 0,004% e incubado em $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

Exposição ao calor

Cada suspensão (2 ml) foi transferida para o tubo de ensaio de vidro $16 \times 125 \text{ mm}$ (Pyrex, Corning®, NY, USA) e colocado em banho-maria a $47 \pm 1^\circ\text{C}$. Depois de 1, 2, 3 e 4 horas de exposição, uma alíquota de 40 μl foi transferida imediatamente para o meio no centro da placa de

Petri em 4 ml CZAPEK mais 0,004% (w/v) de benomyl com 25% do ingrediente ativo (Hi-Yield Chemical Company, Bonham, TX, USA) em placa de Petri (35 x 10 mm). O controle não foi exposto ao calor, mas ele foi inoculado imediatamente em CZAPEK mais benomyl 0,004% e incubado em $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

As placas foram mantidas por 12 h no escuro a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, e em seguida, as mesmas foram contadas. A germinação foi observada em um aumento de 400x. Considerou-se um esporo germinado, quando o mesmo apresentou uma projeção visível do tubo germinativo (MILNER et., al 1991). Um mínimo de 300 esporos por placa foi avaliado e a porcentagem de germinação foi calculada pela comparação de esporos germinados e não germinados.

Resultados

Efeito da radiação UV-B na germinação

Esporangiósporos de todos os isolados de zigomicetos mucoróides produzidos em meio PDA foram mais tolerantes à radiação UV-B que os esporos dos isolados produzidos no meio CZAPEK (Fig. 1 e 2).

Todos isolados crescidos em meio PDA (exceto o isolado Zaina), expostos à radiação UV-B por 2, 3, e 4 h apresentaram diferença significativa de tolerância (Fig. 1). Entretanto, esporangiósporos dos isolados crescidos em meio CZAPEK apresentaram maior redução na taxa germinativa quando expostos à radiação UV-B a partir das 3 h de exposição (Fig. 1). Após 4 h de exposição, com exceção do isolado Zaina, todos isolados apresentaram reduzida germinação (Fig. 1).

Em um segundo experimento foi realizado uma curva de sobrevivência para avaliar a tolerância de esporangiósporos do isolado Zaina (o isolado mais tolerante à radiação UV-B). Este isolado foi produzido em meio PDA e CZAPEK e expostos à radiação UV-B de 0 (controle) a 12 h. Neste experimento foi verificado resultado similar aos resultados obtidos no primeiro experimento, onde os esporangiósporos produzidos em PDA foram mais tolerantes que os produzidos em CZAPEK (Fig. 2). Para os esporangiósporos produzidos em CZAPEK houve uma severa redução logo na quarta hora de irradiação enquanto que os esporangiósporos produzidos em PDA a mesma redução se deu às 10 horas (Fig. 2).

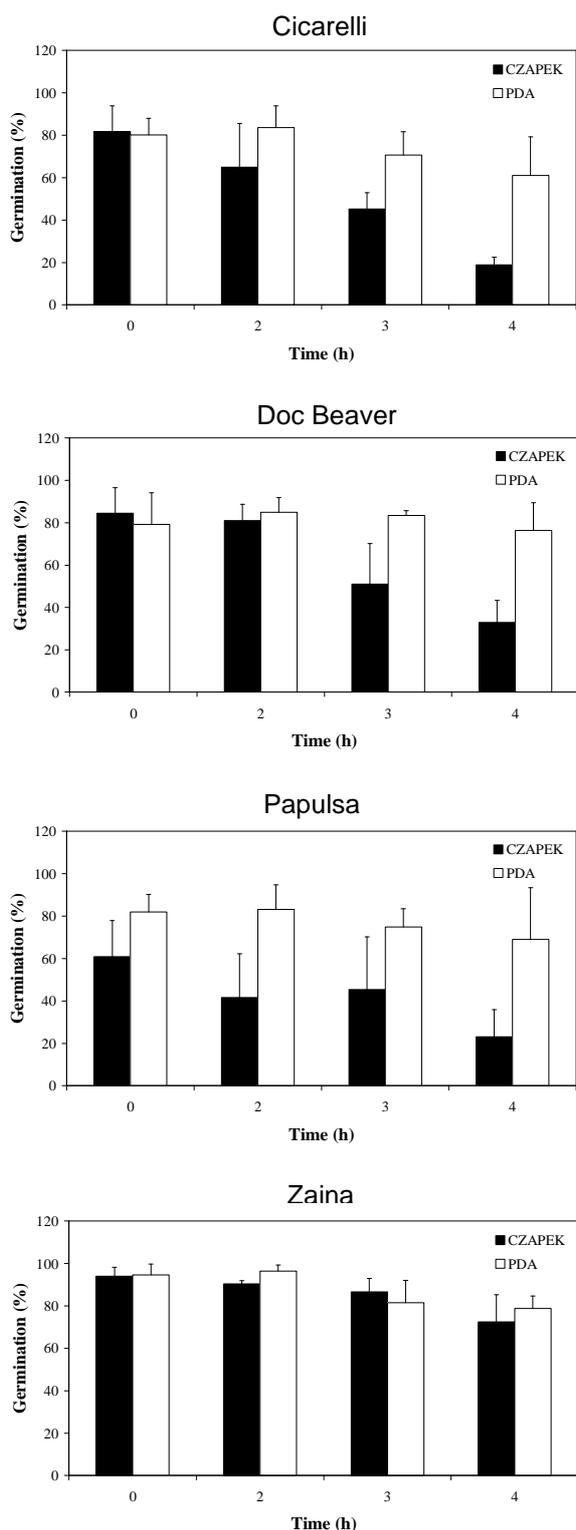


Figura 1. Porcentagem de germinação de isolados de fungos zigomicetos mucoróides após a exposição à radiação UV-B por 0, 2, 3 e 4 h. a uma irradiância de 870 mW m⁻².

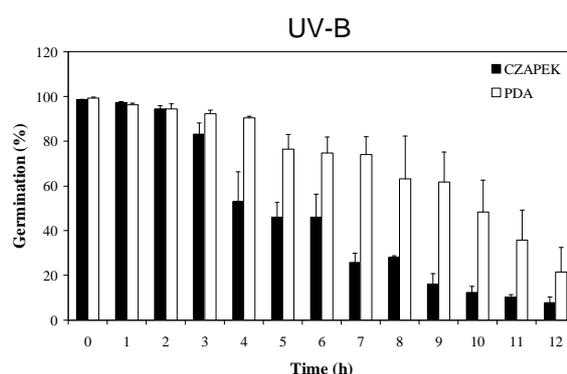


Figura 2. Porcentagem de germinação de isolados de fungos zigomicetos mucoróides após a exposição à radiação UV-B por 12 horas a uma irradiância de 870 mW m⁻².

Efeito do calor na germinação

Esporângiosporos de todos os isolados de zigomicetos mucoróides produzidos em meio CZAPEK foram mais tolerantes ao calor (47 °C) que os isolados crescidos no meio PDA (Fig. 3 e 4).

Todos isolados crescidos em meio CZAPEK expostos a 47 °C por 1, 2 e 3 h apresentaram alta taxa germinativa. Após 4 h de exposição ao calor apenas os isolados Cicarelli e Doc Beaver apresentaram pequena redução de viabilidade enquanto que os isolados Zaina e Papulsa tiveram viabilidade similar ao controle (Fig. 3).

Exceto para o isolado Zaina que teve alta taxa germinativa quando crescido no meio PDA, os outros isolados mostraram-se mais susceptíveis ao calor após 3 h de irradiação. Após 4 h de exposição os isolados tiveram uma maior redução de viabilidade abaixo de 50%.

No segundo experimento foi realizado uma curva de sobrevivência por doze horas. Os esporângiosporos do isolado Zaina produzidos no meio PDA tiveram uma redução de viabilidade de aproximadamente 50% após 4 horas de exposição ao calor enquanto que os esporângiosporos produzidos no meio CZAPEK tiveram a mesma redução após 6 h expostos ao calor (Fig. 4).

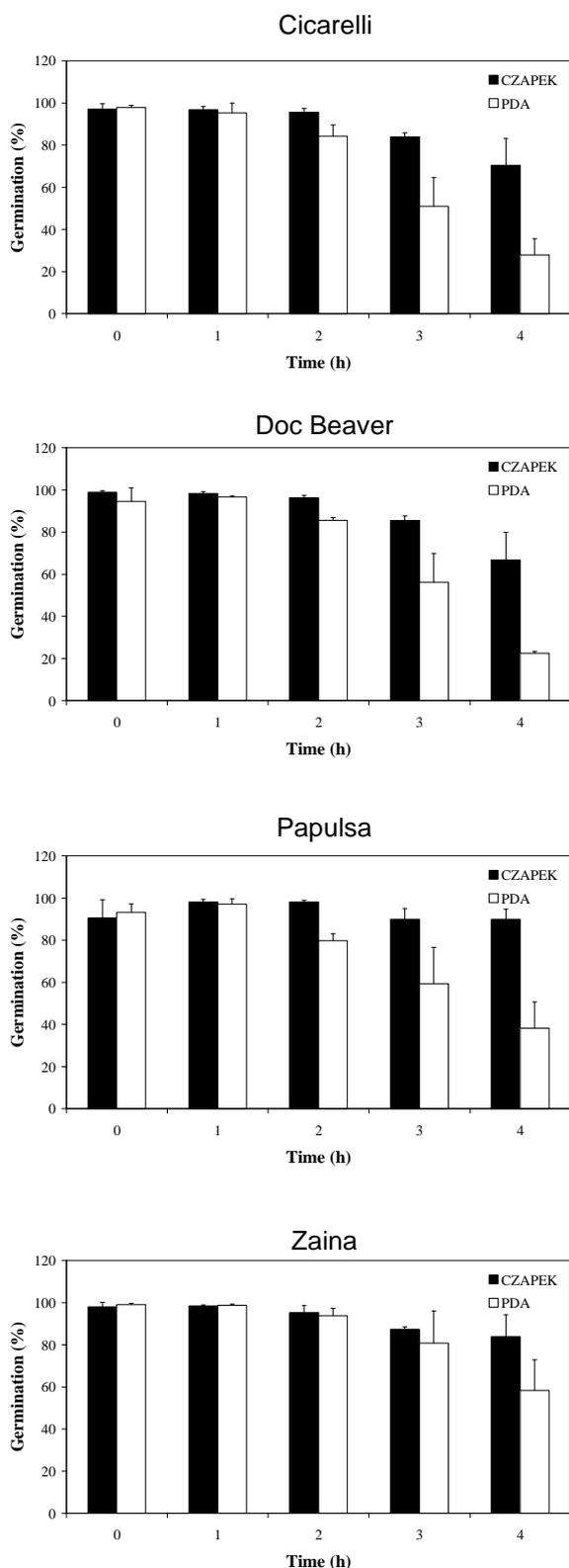


Figura 3. Porcentagem de germinação de isolados de fungos zigomicetos mucoróides após exposição ao calor (47 °C) por 0, 1, 2, 3 e 4 h.

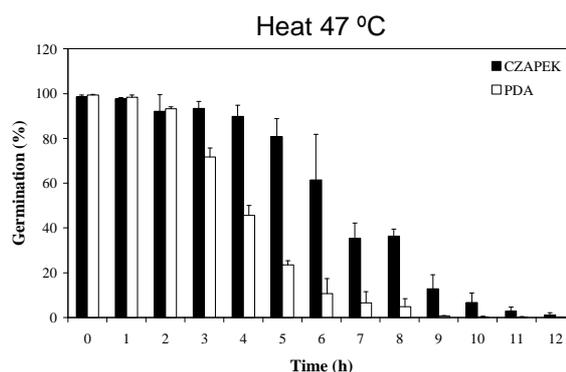


Figura 4. Porcentagem de germinação de isolados de fungos zigomicetos mucoróides após exposição ao calor (47 °C) por 12 h.

Discussão

Sabe-se que esporos de fungos produzidos em meios de cultura pobres se tornam mais tolerantes a vários estresses devido da acumulação do carboidrato trealose e manitol nos esporos ou conídios de fungos protegendo-os contra vários estresses (HALLSWORTH; MAGAN, 1997; RANGEL et al., 2008). Em estudos com o fungo patógeno de insetos *Metarhizium robertsii*, foi verificado que os conídios produzidos no meio menos nutritivo CZAPEK ou meio mínimo sem fontes de carbono foram mais tolerantes a radiação UV-B que os conídios produzidos no meio PDA suplementado com extrato de levedura (PDAY) (RANGEL et al., 2006; RANGEL et al., 2008; RANGEL et al., 2004). Entretanto, o resultado deste estudo foi surpreendente, pois foi verificado o inverso para tolerância a radiação UV-B, todos isolados crescidos em PDA tiveram esporangiósporos mais resistentes à radiação UV-B do que os isolados crescidos em CZAPEK. Este resultado foi repetido em um segundo experimento com o isolado mais resistente Zaina, pois este isolado não teve alteração de tolerância por apenas quatro horas em uma curva de sobrevivência por doze horas.

Alguns trabalhos demonstraram que condições ambientais como temperatura, pH, aeração, radiação, entre outras exibem influência sobre a estrutura dos organismos, e a presença de diferentes nutrientes também induzem respostas diferentes, como forma de adaptação ao meio ambiente, induzem a ativação de sistemas enzimáticos diferenciados, e, portanto geram respostas metabólicas e fisiológicas distintas (GRIFFIN, 1994; ALEXOPOULOS et al., 1996). Então, acredita-se que diferentes meios com concentrações ricas em nutrientes e pouco nutritivas, e, além disso, diferentes condições de estresses (UV-B e calor) induziram respostas

distintas de acordo com o substrato de crescimento.

Com um aumento da radiação UV-B, interagindo com outros fatores de mudança global, podem afetar muitos dos processos ecossistêmicos e atributos, tais como a produção de biomassa vegetal, o consumo de plantas por herbívoros, incluindo insetos, incidência de doenças de plantas e animais, e mudanças na abundância e composição mineral e ciclagem de nutrientes (CALDWELL et al., 2003). Por exemplo, a partir de estudos com fungos decompositores, pode prever que um aumento na radiação UV-B esperado para 15% de destruição do ozônio reduziu a germinação em até 40% em algumas espécies (PAUL et al., 1997). Todos isolados crescidos em meio PDA apresentaram alta tolerância à radiação UV-B e não tiveram diferenças significativas entre eles. Entretanto, para os isolados crescidos em meio CZAPEK quando expostos à radiação UV-B, apresentaram maior redução na taxa germinativa.

Sabe-se que a tolerância à radiação UV é de uma natureza quantitativa e existe grande variabilidade na tolerância à radiação UV, tanto entre espécies e variedades, quanto entre leveduras e fungos filamentosos (FARGUES et al., 1996; PAUL et al., 1997). Entre os isolados utilizados neste estudo, notou-se que o fungo zigomiceto mucoróide, especialmente o isolado Zaina, foi mais resistente à radiação UV-B que muitos outros fungos descritos na literatura como *Verticillium lecanii*, *Aphanocladium album*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumorososea*, *Trichoderma harzianum* que em apenas quatro horas de irradiação UV-B com similar irradiância perderam totalmente a viabilidade (BRAGA et al., 2001; BRAGA et al., 2002; FARGUES et al., 1996; FARGUES et al., 1997; FERNANDES et al., 2007; MOORE et al., 1993).

Fatores ambientais, particularmente diferenças na temperatura, restringem o crescimento de espécies de fungos coprófilos como ocorre com o fungo *Pilobolus* (FOOS; ROYER, 1989). Quando os isolados foram expostos ao calor, pode-se observar que os esporangiósporos de todos os isolados de zigomicetos mucoróides produzidos em meio CZAPEK tiveram uma tolerância maior ao calor 47 °C do que os isolados crescidos no PDA. Este comportamento fisiológico tem sido demonstrado para o fungo *M. anisopliae* onde conídios do fungo produzidos no meio pobre em carboidratos como o meio mínimo sem carboidratos foram mais tolerantes ao calor do que os conídios produzidos no meio PDA suplementado com extrato de levedura (PDAY).

Novamente, notou-se que os isolados de fungos zigomicetos mucoróides foram mais

tolerantes ao calor do que outros fungos como *M. anisopliae*, *B. bassiana* (FERNANDES et al., 2008; RANGEL et al., 2005; ZIMMERMANN, 1982). Todos os isolados apresentaram alta tolerância ao calor, sendo o mais tolerante o isolado coletado de excremento do cavalo Zaina.

Neste estudo pode-se observar grande biodiversidade genética e fenotípica (fisiológica) dos isolados de acordo com sua tolerância à radiação UV-B e calor. Pois a variabilidade na tolerância reflete na biodiversidade dos isolados, como natural adaptação em diferentes condições de meio ambiente, incluindo intensidade de radiação UV e temperatura.

Conclusão

Em conclusão, verificou-se que: 1) todos os isolados zigomicetos mucoróides crescidos no meio PDA foram mais tolerantes a radiação UV-B do que os isolados crescidos no meio CZAPEK; 2) todos os isolados crescidos em meio CZAPEK foram mais tolerantes ao calor do que os isolados crescidos no meio PDA; 3) todos os isolados tiveram alta tolerância tanto para a radiação UV-B como para o calor; 4) o isolado coletado de excrementos do cavalo Zaina foi o mais tolerante tanto para a radiação UV-B quanto para o calor do que os outros três isolados; 5) verificou-se que a biodiversidade genética e fenotípica (fisiológica) dos isolados pode ser avaliada de acordo com sua tolerância a radiação UV-B e calor.

Agradecimentos

Ao Dr. Donald W. Roberts, Utah State University, Logan, UT pela doação de microscópios, meios de culturas, lâmpadas UV-B, e outros materiais de laboratório. Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica para Luciana P. Dias. Ao CNPq – MCT/CNPq 14/2008 Universal Faixa A 473104/2008-3. A Embrapa Meio Ambiente – Projeto Climapest

Referências

- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. John Wiley & Sons, New York, 1996. p 896
- ALVES, M. H., et al. **Táxons de Mucor Fresen. (Zygomycota) em fezes de herbívoros, Recife, PE, Brasil**. Rev. bras. Bot. 2002, vol.25, n.2, p. 147-160.
- BRAGA, G.U.L., et al. **Effects of UV-B irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: A study of reciprocity and recovery**.

Photochemistry and Photobiology 73, 2001. p. 140-146.

- BRAGA, G.U.L., et al. **Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*.** Mycologia 94, 2002. p. 912-920.

- CALDWELL, M.M., et al. **Terrestrial ecosystems increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors.** Photochemical & Photobiological Sciences 2, 2002. p. 29-38.

- CALDWELL, M.M., BALLARE, C.L., BORNMAN, J.F., FLINT, S.D., BJORN, L.O., TERAMURA, A.H., KULANDAIVELU, G., TEVINI, M. **Terrestrial ecosystems increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors.** Photochemical & Photobiological Sciences, 2003. v. 2 p. 29-38.

- CRISAN, E.V. **Current concepts of thermophilism and the thermophilic fungi.** Mycologia 65, 1973. p. 1171-1198

- FARGUES, J., Goettel, M.S., Smits, N., Ouedraogo, A., Vidal, C., Lacey, L.A., Lomer, C.J., Rougier, M. **Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes.** Mycopathologia, 1996 v. 135. p. 171-181.

- FERNANDES, E.K., Rangel, D.E., Moraes, A.M., Bittencourt, V.R., Roberts, D.W. **Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates.** J Invertebr Pathol 2007 v. 96 p. 237-243.

- FERNANDES, E.K.K., Rangel, D.E.N., Moraes, A.M.L., Bittencourt, V.R.E.P., Roberts, D.W. **Cold activity of *Beauveria* e *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*.** J Invertebr Pathol 98, 2008. p. 69-78

- FOOS, K. M; ROYER, J. A. . **A survey of *Pilobolus* from Yellowstone National Park.** Mycotaxon, 34: N°2, 1989. p. 395-397

- GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology.** 2ª ed. New York: Wiley-Liss, 1994. p. 458.

- HALLSWORTH, J.E., Magan, N., 1994. **Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi.** Microbiology 140, 1994 p. 2705-2713.

- MAGAN, N. **Fungi in Extreme Environments.** Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1997

MOORE, D., Bridge, P.D., HIGGINS, P.M., BATEMAN, R.P., PRIOR, C., 1993. **Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens.** Ann. Appl. Biol, 1993 v. 122 p. 605-616.

MUELLER, G. M., G. F. BILLS, M. S. FOSTER. **Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods.** Elsevier Academic Press, San Diego, Calif, 2004. p. 777

PAUL, N.D., Rasanayagam, S., MOODY, S.A., HATCHER, P.E., AYRES, P.G. **The role of interactions between trophic levels in determining the effects of UV-B on terrestrial ecosystems.** Plant Ecology, 1997 v. 128 p. 296-308.

RANGEL, D.E.N., BRAGA, G.U.L., FLINT, S.D., ANDERSON, A.J., ROBERTS, D.W., 2004. **Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on artificial and natural substrates.** J Invertebr Pathol, 2004. v 87 p. 77-83.

RANGEL, D.E.N., BRAGA, G.U.L., ANDERSON, A.J., ROBERTS, D.W., 2005. **Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins.** J. Invertebr. Pathol. 2005 v. 88 p. 116-125.

RANGEL, D.E.N., ANDERSON, A.J., ROBERTS, D.W. **Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance.** J. Invertebr. Pathol, 2006 v. 93 p. 127-134.

RANGEL, D.E.N., ANDERSON, A.J., ROBERTS, D.W. **Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia.** Mycol. Res, 2008 v. 112, p. 1362-1372.

SETLOW, B., SETLOW, P. **Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat.** Appl. Environ. Microbiol, 1995 v. 64, p. 4109-4112.

ZIMMERMANN, G. **Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*.** J. Invertebr. Pathol, 1982 v. 40, p. 36-40.