



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

**EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B SOBRE A DIVERSIDADE DE LEVEDURAS
EPIFÍTICAS ASSOCIADAS AO MORANGO**

Ana Gabriele Barbosa **Casteliani**^{1a}; Rosely Santos do **Nascimento**^{1b}; Itamar Soares de **Melo**^{1c}

¹Embrapa Meio Ambiente

N° 13412

Resumo - Nos últimos anos tem sido observado um aumento na radiação ultravioleta B que atinge a superfície terrestre, sendo este comprimento de onda o mais prejudicial para moléculas biologicamente ativas. As superfícies foliares estão constantemente expostas a esta radiação, podendo afetar de forma significativa os micro-organismos que ocupam este nicho. As células de leveduras epifíticas foram removidas das folhas do morango após a incidência de radiação UV-B em condições de campo em diferentes tempos de exposição. A contagem de unidades formadoras de colônia mostrou padrões de pigmentação diferentes em cada tratamento, indicando que tais estruturas atuam como mecanismos de proteção a radiação. A análise com T-RFLP não mostrou diferenças quanto à diversidade de leveduras nos diferentes tratamentos.

Palavras-chaves: radiação UV-B, leveduras, superfície foliar

^aBolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, anagabrieleb@yahoo.com; ^b Colaborador; ^c Orientador.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

ABSTRACT—*In the last few years have been observed an increasing ultraviolet radiation B that reaches the land surface, this wave length is the most damaging to the biologically molecules active. The leaf surfaces are constantly exposed to this radiation that can significantly affect the microorganisms that belong to this niche. The epiphytic yeasts were removed from the strawberry leaves after the UV-B radiation incidence under field conditions in different time exposition. The counting of colony forming units showed different pigmentation patterns in each treatment, indicating that these structures act like protection mechanisms against the radiation. Analysis using T-RFLP showed no differences in the diversity of yeasts in the distinct treatments.*

Key-words: radiation UV-B, yeasts, leaf surface

1. INTRODUÇÃO

Várias mudanças ambientais ocorrem continuamente sobre a superfície terrestre, e nos últimos anos tem sido observado um decréscimo dos níveis de ozônio estratosférico e conseqüentemente um aumento da incidência da radiação ultravioleta sobre os ecossistemas (CALDWELL et al., 2007). Dentre a radiação ultravioleta que incide sobre a superfície terrestre, o espectro de UV-B (290-320 nm) é o mais prejudicial para moléculas biologicamente ativas, pois é diretamente absorvido pelos ácidos nucleicos e proteínas, o que leva a formação de fotoprodutos que comprometem a estrutura e a função de macromoléculas (PAUL et al., 1997; KUNZ et al., 2007).

As superfícies foliares estão constantemente expostas a esta radiação, e de acordo com Parisiet al., (1998) e Correia et al., (1998) as plantas podem responder negativamente a ação do UV-B. Além disso, no filoplano existe uma grande diversidade de micro-organismos epifíticos, e a densidade populacional encontrada neste habitat é caracterizada por constantes flutuações das condições físicas e nutricionais, (RUINEN, 1963; FOKKEMA e HEUVEL., 1986) e o aumento da incidência desta radiação também poderá afetar drasticamente as relação simbióticas estabelecidas entre estas populações e seus hospedeiros.

Segundo Kurtzman e Fell (1998), o filoplano ou superfície externa da folha é um dos nichos ecológicos mais importantes para o desenvolvimento das populações de leveduras, sendo, estas comunidades as principais a colonizarem este micro ecossistema. De acordo com Toussaint e Conconi (2006), diversos ensaios têm sido realizados com leveduras devido à capacidade destas populações de atuarem como agentes de mutagênicos ambientais ou farmacológico, além de servirem como complemento para ensaios de mutagenicidade realizados com bactérias.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

O presente trabalho teve como objetivo fornecer maiores informações a respeito dos possíveis efeitos causados pelo aumento da radiação ultravioleta B sobre a diversidade de leveduras epifíticas em folhas de morango submetidos a três diferentes tratamentos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido na Embrapa Meio Ambiente, e apresentava como delineamento parcelas formadas por estruturas de aço galvanizado (1,20m de largura 2,30 de comprimento e 1,80m de altura) distribuídas nos seguintes tratamentos: “Diminuído”; - sem nenhuma radiação ultravioleta, obtido pelo uso do filme de poliéster cristal tipo OD 125 micra da DuPont que bloqueia a radiação UV-B e UV-A; “Ambiente”, - com irradiação UV-B e UV-A apenas solar e “Aumentado”, - com irradiação UV-B e UV-A proveniente de lâmpadas e do sol. Em cada parcela foram transplantadas 20 plantas de morangueiro cv. Oso Grande, devido ao número desigual de folhas em cada tratamento, foi realizado uma amostragem composta e a primeira amostragem ocorreu após 24 horas de irradiação.

No tratamento aumentado foram utilizadas 8 lâmpadas fluorescentes (Modelo UV, marca Q-Lab Corporation) de 40W acondicionadas em luminárias do tipo tubular com alumínio refletivo para potencializar o desempenho e proteção à estrutura, distanciadas em 250 mm e revestidas com filme de acetato celulose tipo cristal 0,10mm, que permitem apenas a passagem de ondas com comprimento entre 280 e 320nm. As lâmpadas foram posicionadas a 40 centímetros do topo das folhas do cultivar; e o ajuste das lâmpadas permitiu simular o aumento da radiação em relação ao ambiente através do uso de temporizadores programáveis instalados em painéis elétricos com reatores dimerizáveis, que acendiam as lâmpadas das 09:00 às 17:00hs com diferentes intensidades luminosas durante o dia e forneceram por dia 677mW m² de radiação sobre a cultura.

2.2. Isolamento de leveduras epifíticas

Para o isolamento de leveduras epifíticas, foram realizadas 5 amostragens, com sete dias de diferença entre elas, entre Julho e Agosto de 2012. As leveduras foram isoladas a partir do filoplano; através da remoção de aproximadamente 10 folhas de cada tratamento com o auxílio de uma tesoura e colocadas em sacos plásticos estéreis, transportadas para o laboratório e processadas.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

No laboratório as folhas foram cortadas assepticamente em pequenos discos com o auxílio de um furador de rolha de 16mm. Dez discos de folha de cada tratamento foram adicionadas em 25 ml de solução salina estéril (NaCl 0,85%) acrescida de uma gota de Tween 80 para um litro de solução. Posteriormente, foram sonicadas em banho ultrassom por 30", mantidas sob agitação por 60' a 150 rpm e diluições seriadas das suspensões celulares foram preparadas. Em seguida, 100 µl da suspensão 10^{-3} foram semeadas em meio de cultura YMA (Yeast, Malt, Agar) acrescido de cloranfenicol incubadas a 25°C por 7-10 dias, conforme o crescimento de diferentes colônias.

A densidade populacional de leveduras obtidas no tratamento "diminuído" e "aumentado" foi estimada em percentual, sendo estas comparadas com a porcentagem obtida na condição "ambiente", tomada como 100%. Após a contagem das colônias, as mesmas foram selecionadas de acordo com a presença nos diferentes tratamentos com radiação UV-B.

2.3. Extração do DNA total para análise independente de cultivo

Para análise independente de cultivo, o DNA total da filosfera foi extraído após a lavagem das folhas em solução salina estéril (0,85%) acrescidas de uma gota de Tween 80. As amostras foram submetidas a 30" de ultrassom e 60' de agitação a 150rpm. As células foram colhidas por centrifugação a 13000g, ressuspensas em 1mL de água Mili-Q estéril e submetidas a sucessivas centrifugações a 6.000 g por 5' para obtenção de pellet. Posteriormente, realizada a extração conforme descrito por White et al. (1990).

2.4. Amplificação do gene RNA 18S

Para a reação de polimerização em cadeia (PCR), foram utilizados os primers específicos de regiões ITS (internal transcribed sequences) fúngicas FAM-ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATC 3'), com reação de amplificação realizada através de uma mistura contendo 1µl da suspensão de DNA, 3,0mM de Cloreto de magnésio, 0,2mM de cada dNTP (Desorribonucleotídeo trifosfatado), 20 pmol dos primers, PCR buffer 1X e 2,5 unidade de Taq DNA polimerase, sendo o volume completado com água ultrapura autoclavada para 50µL. A reação foi realizada em termociclador (PTC 200, MJ Research), programado para realizar 94°C por 1' 30" ; 13 ciclos (94°C por 35" ; 55°C por 55" ; 72°C por 45"); 13 ciclos (94°C por 35" ; 55°C por 2' ; 72°C por 45"); 9 ciclos (94°C por 35" ; 55°C por 3' ; 72°C por 45") e uma extensão final a 72°C por 10', conforme Gardes e Bruns (1993).

2.5. Análise de diversidade T-RFLP

O DNA amplificado por PCR foi digerido usando separadamente três enzimas de restrição: HinfI, MboI e HhaI. Para cada reação foram utilizados: 1µL de solução tampão 10X, específicos



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

para cada tipo de endonuclease de restrição; 1µl de BSA; 3µl do produto de PCR; 0,3µl de endonuclease de restrição e água ultrapura para um volume final de 10µl. A reação de restrição foi realizada em um termociclador, através dos seguintes passos: 37°C durante 90' e 35 ciclos de 30" a 65°C. Após a digestão os produtos das restrições foram precipitados respectivamente com EDTA 125mm, acetato de sódio 3M e etanol puro, centrifugados a 3000g por 30'. Elimina-se o conteúdo e adiciona-se etanol 70%, centrifuga por 15', descarta-se o conteúdo por inversão e deixa-se secar a 37°C.

2.6. Análises estatísticas

O perfil T-RFLP foi avaliada através do escalonamento multidirecional não métrico (NMDS), usando uma raiz quadrada transformada em matriz de distância de Bray-Curtis. Análise de similaridade (Anosim) também foi realizada para determinar as diferença entre os sites utilizando o programa PAST (HAMMER et al., 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento de leveduras epifíticas

Os percentuais da população de leveduras obtidos no tratamento “diminuído” e no tratamento “aumentado” apresentaram uma quantidade inferior de leveduras isoladas nas três primeiras amostragens quando comparados com a condição ambiente, (Figura 1).

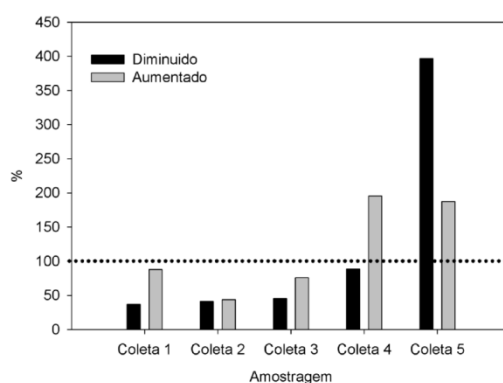


Figura 1. Densidade populacional total da comunidade de leveduras epifíticas obtidos durante as coletas dos diferentes tratamentos. A linha pontilhada representa o tratamento “Ambiente” utilizado como referência 100%.

Entretanto, na quarta coleta o tratamento “aumentado” foi superior ao “ambiente” em cerca de 100%. Na quinta coleta tanto o tratamento “aumentado” quanto o “diminuído” foram superiores



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

ao ambiente. Porém, após análise estatística ANOVA com teste de Tukey, não foram constatadas diferenças significativas ($p.\text{valor} > 0,05$) entre os tratamentos.

Sugere-se que as oscilações observadas após a contagem da densidade populacional de leveduras isoladas (figura 1) estejam relacionadas à idade da planta e ao tempo em que a cultura esteve sob diferentes condições de sazonalidade. Debodeet al., (2013) também observaram a ocorrência de populações transitórias conforme o tempo em que esta cultura esteve em condições de campo. Além de um perfil de dominância de leveduras heterogêneo conforme a idade da planta, outros autores, (MECHABER et al., 1996; ANDREWS e BUCK., 2002; BUCK e ANDREWS, 1999) ao estudarem os mecanismos de adesão à superfície foliar das populações de leveduras, observaram que as folhas mais velhas apresentavam normalmente uma superfície mais áspera e características físico-químicas mais estáveis garantindo maior aderência destas comunidades.

Uma transição na pigmentação das leveduras foi observada comparando os diferentes tratamentos. No tratamento “Diminuído” predominaram isolados não pigmentados, no “Ambiente” observou-se uma variação entre isolados pigmentados e não pigmentados (70 e 30%) e no “Aumentado” somente isolados pigmentados. As leveduras pigmentadas da condição “Ambiente” e do “Aumentado” apresentaram, em maior quantidade, colônias nas colorações rosa e laranja. Segundo Fonseca e Inácio (2006), isolados produtores de tais pigmentos como carotenóides, são mais comumente encontrados em nichos como o filoplanopora desempenharem um papel importante na proteção contra danos oxidativos causados pela luz (SAKAKI et al., 2001). Além disso, diferentes condições ambientais, incluindo aumento de UV-B, influenciam a estrutura celular dos organismos e geram respostas metabólicas e fisiológicas distintas quando são submetidos a condições de estresses (GRIFFIN, 1994; ALEXOPOULOS et al., 1996).

Sugere-se que tais padrões de pigmentação estejam diretamente relacionados com a presença e ausência de radiação ultravioleta utilizadas nos tratamentos do estudo em questão, pois a presença de tais pigmentos garantiu a colonização destas populações em condições com alta incidência de UV-B, o que não foi observado na condição diminuída.

3.2. Análise de diversidade T-RFLP

A análise de similaridade (Anosim) dos perfis de T-RFLP não mostrou diferenças significativas entre os três tratamentos quanto à diversidade de leveduras para as três enzimas de restrição utilizadas, (Tabela 1). Todos os valores de relação (R) entre as amostras se apresentaram com valores inferiores a 0,15, não apresentando portanto diferenças significativas entre as amostras.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Tabela 1. Valores de R obtidos a partir da análise de T-RFLP em comparação com os tratamentos e enzimas de restrição utilizadas.

	Hinf I	Mbo I	Hha I
T1 X T2	0,080	-0,072	0,024
T2 X T3	-0,076	-0,164	0,043
T1 X T3	-0,080	-0,136	0,031

Para análise multidirecional não métrico os perfis de diversidade de leveduras também não apresentaram diferenças significativas, conforme mostra a figura 2. Os valores de stress 0.07, 0.10 e 0.20, representam a confiabilidade dos dados.

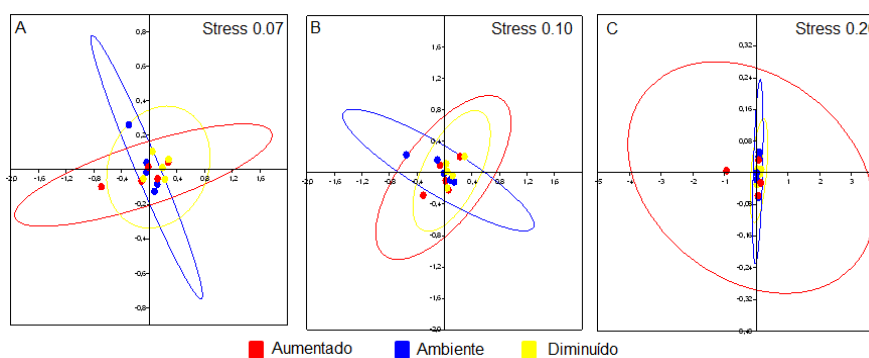


Figura 2. Análise multidirecional não métrico dos perfis da diversidade de leveduras, comparação entre as três enzimas de restrição (A- Hinf I, B- Mbo I e C- Hha I).

Gunasekeraet al., (1997), em estudos com leveduras expostas a radiação UV-B, mostrou que nenhuma levedura exposta a tais condições apresentou uma total insensibilidade a incidência de radiação. Estes autores explicam que as populações de leveduras apresentam diferentes níveis de tolerância e mecanismos que permitem a colonização de ambientes com altas incidências de radiação ultravioleta; e como a superfície foliar não é uniforme, as células mais sensíveis podem ocupar áreas que forneçam proteção contra a radiação, tais como depressões entre as células, cavidades subestomáticas ou base de tricomas. Tais fatores podem explicar a ausência de diferença quanto ao estudo de diversidade nos diferentes tratamentos.

4. CONCLUSÃO

O aumento da radiação UV-B não apresentou influência sobre a diversidade de leveduras epifíticas isoladas do morango, porém atolerância a UV-B pode estar relacionada com a produção



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

de pigmentos; e a alta incidência de radiação ultravioleta B pode causar a diminuição de determinadas espécies obrigando-as a ocupar locais que forneçam abrigo desta radiação e consequentemente favorecendo a colonização de espécies de leveduras epifíticas com mecanismos de adaptação a tais ambientes.

5. AGRADECIMENTOS

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

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W., BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons, 1996. 896 p.
- ANDREWS, J.H., BUCK, J.W. Adhesion of yeast to leaf surfaces. In: *Phyllosphere microbiology*. Minneapolis: Editor Lindow, S.E., Hecht-Poinar, E.L., Elliott, V.J., 2002. p. 53-68.
- BUCK, J. W., ANDREWS, J.H., Attachment of the Yeast *Rhodosporidium toruloides* mediated by adhesives localized at sites of bud cell development. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 465-471, 1999.
- CALDWELL, M. M. BORNMAN, J.F., BALLARE, C.L., FLINT, S.D., KULANDAIVELU, G. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 252-266, 2007.
- CORREIA, C.M., AREAL, E.L.V., TORRES-PEREIRA, M.S., TORRES-PEREIRA, J.M.G., Intraspecific variation in sensitivity to ultraviolet-B radiation in maize grown under field conditions. I. Growth and morphological aspects. **Field Crops Research**, 59, p. 81-89, 1998.
- DEBODE, J., HEMELRIJCK, W.V., CREEMERS, P. MAES, M. Effects of fungicides on epiphytic yeasts associated with strawberry. **Microbiology Open**. v. 2, n. 3, p. 482-491, 2013.
- FOKKEMA, N.J., HEUVEL, V.D. **Microbiology of the phyllosphere**. Academic Press, New York, 1986.
- FONSECA, A.; INÁCIO, J. Phylloplane yeasts. In: Peter G. e Rosa, C., Eds. **Biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Berlin: Springer-Verlag, 2006. p. 263-301.
- GARDES, M., BRUNS, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular ecology**, v. 2, n. 2, 1993. p. 113-118.
- GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. 2 ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 458 p.
- GUNASEKERA, T.S., PAUL, N.D., AYRES, P.G. Responses of phylloplane yeasts to UV-B (290-320 nm) radiation: interspecific differences in sensitivity. **Mycological Research**. v. 101, n. 7, p. 779-785, 1997.
- HAMMER, O., HARPER, D.A.T. RYAN, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9p. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em: 11 jul. 2013.
- KUNZ, B. A.; CAHILL, D. M.; MOHR, P. G.; OSMOND, M. J. ; VONARX, E. J. Plant responses to UV radiation and links to pathogen resistance. **International Review of Cytology**, v. 255, p. 1-40, 2007.
- KURTZMAN, C.P., FELL, J. **The Yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1998. p. 1088.
- MECHABER, W.L., MARSHALL, D.B., MECHABER, R.A., JOBE, R.T., CHEW, F.S. Mapping leaf surface landscapes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 93, p. 4600-4603, 1996.
- PARISI, A.V., WONG, J.C.F., GALEA, V.J. A study of the total ultraviolet exposure of all the leaves of small-plant growth. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 45, p. 36-42, 1998.
- 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**, v. 128, p. 296-308, 1997.
- RUINEN, J. The phyllosphere II: yeasts from the phyllosphere of tropical foliage. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, p. 425-438, 1963.
- SAKAKI, H., NAKANISHI, T., TADA, A., MIKI, W., KOMEMUSHI, S., Activation of torularhodin production by *Rhodotorula glutinis* using weak white light irradiation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 92, n. 3, p. 294-297, 2001.
- SPERANDIO, E.M., **Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a plantas do cerrado**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Brasília, Brasília DF, 2012.
- TOUSSAINT, M.; CONCONI, A. High-throughput and sensitive assay to measure yeast cell growth: a bench protocol for testing genotoxic agents. **Nature protocols**, v. 1, n. 4, p. 1922-1928, 2006.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315–322.