

CARACTERIZAÇÃO DE *ALTERNARIA ALTERNATA*, DEGRADADOR DO FUNGICIDA CARBENDAZIM¹

CÉLIA MARIA MAGANHOTTO DE SOUZA SILVA² e ITAMAR SOARES DE MELO³

RESUMO - Uma linhagem de *Alternaria alternata* isolada de solos suplementados com benomil degradou o fungicida carbendazim, o qual é um produto da hidrólise do benomil. A linhagem foi caracterizada quanto ao crescimento micelial e à esporulação, aos aspectos citológicos e padrões eletroforéticos da esterase e proteínas totais nativas. Observou-se crescimento micelial significativo nos meios de cultura suco V-8, ágar-malte, Sabouraud, aveia-ágar e MC de Pontecorvo. A esporulação em diferentes fotoperíodos foi variável, com produção satisfatória de esporos na ausência de luz. Essa linhagem, denominada Alt A, apresenta esporos ovóides, com comprimento que varia de 15,4 a 38,4 µm e diâmetro de 5,8 a 9,6 µm, com um a cinco septos transversais. Pela caracterização eletroforética efetuada em gel de poliacrilamida, comparou-se a linhagem Alt A com outras duas linhagens fitopatogênicas (CCT 1250 e CCT 3823). Os padrões de esterase e proteínas totais, apresentaram diferentes perfis de banda, indicando a ocorrência de variabilidade genética entre as três linhagens.

Termos para indexação: crescimento, fotoperíodo, isoenzimas.

CHARACTERIZATION OF *ALTERNARIA ALTERNATA*, A CARBENDAZIM DEGRADING STRAIN

ABSTRACT - One *Alternaria alternata* strain, isolated from benomyl treated soil was found to degrade the fungicide carbendazim which is a product of benomyl hydrolysis. This strain was characterized in the following aspects: mycelial growth and sporulation, cytological aspects and electrophoresis of total proteins and esterase. It was observed that the strain had significant mycelial growth in the V-8 juice, malt-agar, Sabouraud, oat-agar and MC de Pontecorvo media and that sporulation in different photoperiods was variable, but it was satisfactory in the absence of light. This strain, called Alt A, presents ovoid spores with length varying from 15.4 to 38.4 µm and diameter from 5.8 to 9.6 µm with one to five transversal septa. When electrophored by total proteins and esterase in polyacrilamide gels, and compared with other two phytopathogenic *Alternaria alternata* strains (CCT 1250 and CCT 3823), the strain Alt A presented typical band patterns, which differed from those of the other two strains. This could be an indication of genetic variation among the strains.

Index terms: growth, photoperiod, isoenzymes.

INTRODUÇÃO

Os solos agrícolas são freqüentemente tratados com grande variedade de compostos químicos, inclusive fungicidas, para o controle de fitopatógenos. Apesar dos inúmeros estudos sobre pesticidas no solo

(Audus, 1964; Siegel, 1975; Kearney & Kellogg, 1985; Tu, 1993), é restrito o conhecimento da sua ação sobre a atividade microbiana.

Uma das características das populações microbianas é a capacidade de adaptação à presença de produtos químicos no ambiente, através da mutação, indução ou inibição seletiva de um ou mais membros da comunidade. O metabolismo microbiano é um processo importante na degradação de pesticidas.

Nos últimos anos, tem sido registrado o aumento da degradação ou a degradação acelerada de vários pesticidas aplicados ao solo, fenômeno que está

¹ Aceito para publicação em 16 de outubro de 1996.

² Bióloga, Ph.D., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (CNPMA), Caixa Postal 69, CEP 13820-000 Jaguariúna, SP.

³ Eng. Agr., Ph.D., Embrapa-CNPMA.

relacionado a aplicações sucessivas do mesmo pesticida ou de compostos estruturalmente relacionados (Kauffman et al., 1985; Harvey, 1987; Yarden et al., 1990; Silva, 1996). Estudos com carbendazim indicaram que aplicações repetidas desse fungicida, sob condições de laboratório e campo, resultaram em sua degradação acelerada, diminuindo a sua persistência de meses para poucos dias (Yarden et al., 1990). São ainda limitados os dados sobre os tipos de microrganismos responsáveis pela degradação acelerada de carbendazim.

O propósito deste estudo é caracterizar morfológica, citológica e bioquimicamente o fungo *Alternaria alternata* que degrada o fungicida carbendazim.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização morfológica

A caracterização morfológica, quanto ao crescimento e à esporulação, foi feita com a linhagem de *Alternaria alternata*, selecionada como degradador de carbendazim e denominada Alt A (Silva, 1996). Discos de meio de cultura contendo micélio com 0,7 cm de diâmetro foram colocados no centro de placas de petri que continham diferentes meios de cultura: BDA, Czapecki, Sabouraud, aveia-ágar, suco V-8, ágar-malte e meio completo de Pontecorvo (MC) (Tuiti, 1969), mantidas em condições ambientais. A avaliação do crescimento foi feita por sete dias, tomando-se valores do diâmetro em dois sentidos perpendiculares, com o auxílio de uma régua milimetrada aplicada no reverso da placa.

A avaliação da esporulação foi efetuada no décimo dia de incubação, contando-se, através de câmara de Neubauer, o número de conídios que estavam contidos em uma suspensão formada pela adição de cinco discos de 0,7 cm de diâmetro contendo micélio, em uma solução de "tween 80" (0,1% v/v) (Tuiti, 1969).

Uma vez selecionado o melhor meio de cultura, procedeu-se à avaliação do melhor fotoperíodo para o crescimento e a esporulação de *Alternaria alternata*. Para isso, o fungo foi incubado em meio de cultura suco V-8 em diferentes regimes de luz: a) luz contínua; b) 12 horas de luz fluorescente de 40 watts, com lâmpadas à distância de aproximadamente 30 cm; c) escuro total; e d) 12 horas de luz próxima ao ultravioleta de 30 watts, com lâmpadas à distância de aproximadamente 30 cm. Os procedimentos para a avaliação do crescimento e da esporulação

seguiram o método descrito por Tuiti (1969). Em ambos os casos, o delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições.

Caracterização citológica

Para a caracterização citológica, a linhagem de *Alternaria alternata* foi cultivada em placas de petri contendo meio de cultura suco V-8, e incubada a 28°C, em regime de 12 horas de luz fluorescente de 40 watts e 12 horas de escuro. Após sete dias de incubação, realizaram-se as observações citológicas pela coloração de núcleos, de acordo com método descrito por Tanaka et al. (1979), estimando-se o número de núcleos por esporos, e o tamanho dos esporos (comprimento e largura).

Caracterização bioquímica

Com a finalidade de verificar a patogenicidade da linhagem Alt A, pela caracterização bioquímica, foram utilizadas três diferentes linhagens de *A. alternata*, sendo uma delas a selecionada para este trabalho, e as outras duas linhagens fitopatogênicas fornecidas pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello". Estas foram inoculadas em frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio BD com diferentes concentrações de carbendazim (0, 10 e 100 µg/mL) e incubadas durante quinze dias. Após esse período, o micélio foi recuperado por filtragem a vácuo em filtro de Büchner, para então ser liofilizado à temperatura de -45°C e à pressão de 6×10^{-1} mm Hg. As amostras foram preparadas de acordo com método descrito por Paccola-Meireles et al. (1988).

O gel de poliacrilamida foi confeccionado a 10% de acordo com Paccola-Meireles et al. (1988). A amperagem foi mantida constante a 133 mA por quatro horas. Para prevenir a desnaturação pelo calor e a perda da atividade enzimática, a corrida eletroforética foi mantida a 4°C. A migração, tendo iniciado no ponto de aplicação da amostra, foi de 12 cm e 14,5 cm para os sistemas esterase e proteínas totais, respectivamente. Os géis foram retirados das placas e incubados em solução corante, respeitando-se os diferentes sistemas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização morfológica

O crescimento e a esporulação de *A. alternata* foram estudados em diferentes meios de cultura e fotoperíodos. A natureza da curva de crescimento

micelial foi avaliada graficamente e verificou-se crescimento linear no período observado. Foram então calculadas as taxas de crescimento médio (cm/dia) no período. Os dados de crescimento obtidos em relação aos diferentes meios de cultura (Tabela 1), demonstraram que a linhagem de *A. alternata* em estudo apresentou melhor desenvolvimento micelial diário nos meios de cultura suco V-8, ágar-malte, Sabouraud, aveia-ágar e MC de Pontecorvo, diferindo ($P>0,05$) do observado nos meios BDA e Czapeck. A menor média de crescimento foi obtida no meio de cultura Czapeck, sugerindo que aqueles organismos são exigentes em algum fator que está ausente nesse meio.

A análise do efeito dos meios de cultura na esporulação foi realizada considerando-se que o número de conídios, nos oito quadrantes observados, tem distribuição de Poisson. Nos meios de cultura Sabouraud, ágar-malte, BDA e MC de Pontecorvo, não houve esporulação. O isolado de *A. alternata* esporulou satisfatoriamente no meio de cultura suco V-8, diferindo significativamente ($P>0,05$) dos demais (Tabela 1).

A influência do fotoperíodo no crescimento e na esporulação de *A. alternata* em meio suco V-8 pode ser observada na Tabela 2. Analisou-se a natureza da curva do crescimento micelial (diâmetro x tem-

po), verificando-se um comportamento linear no período observado. Foram então calculadas as taxas de crescimento micelial para cada unidade experimental. Houve um desenvolvimento micelial diferenciado de acordo com o fotoperíodo. A esporulação foi maior quando *A. alternata* foi incubado nas condições de escuro e no fotoperíodo de 12 horas de luz próxima ao ultravioleta, diferindo dos demais tratamentos. Nos demais fotoperíodos, houve um decréscimo na esporulação, indicando que houve influência da luz na produção de conídios.

Uma característica comum a todas as espécies do gênero *Alternaria* é a baixa capacidade ou mesmo ausência de esporulação em meio de cultura. Um grande número de trabalhos indica diferentes métodos de indução da esporulação. Misaghi et al. (1978) consideraram desnecessária a alternância de luz e escuro para a esporulação de *A. alternata*, enquanto Ungaro & Azevedo (1986) obtiveram esporulação abundante nas colônias mantidas no escuro. Segundo esses autores, a ausência de luz favoreceu o crescimento e a esporulação; entretanto, se a temperatura utilizada fosse mais baixa, provavelmente a luz teria sido necessária, conforme constataram Prasad et al. (1973), ao verificarem que, em colônias mantidas a temperaturas inferiores a 24°C, a presença de luz favoreceu a esporulação e o crescimento. No presente trabalho, a esporulação foi favorecida pela

TABELA 1. Taxa de crescimento micelial e esporulação de *Alternaria alternata* em diferentes meios de cultura. Média de cinco repetições.

Meio de cultura	Taxa de crescimento micelial ¹		Esporulação (x 10 ³ conídios/mL) ³
	cm/dia	Diâmetro da colônia ²	
Suco V-8	1,02a	8,3a	5,0a
Ágar-malte	0,99a	8,2ab	0,0
Sabouraud	0,90ab	8,0ab	0,0
Aveia-ágar	0,90ab	7,7ab	2,3a
MC de Pontecorvo	0,82abc	7,6ab	0,0
BDA	0,76c	6,6bc	0,0
Czapeck	0,61c	5,2c	0,3b

¹ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

² Médias (cm) tomadas aos oito dias de incubação.

³ Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste qui-quadrado de Wald.

TABELA 2. Taxa de crescimento micelial e produção média de esporos de *Alternaria alternata* em meio suco V-8 sob diferentes regimes de luz. Média de cinco repetições.

Fotoperíodo	Taxa de crescimento micelial ¹		Esporulação (x 10 ³ conídios/mL) ³
	cm/dia	Diâmetro da colônia ²	
Escuro	1,03a	7,6a	7,0a
12 h luz UV/12 h esc.	1,00a	8,5a	3,2b
Luz contínua (fluor.)	0,90b	8,6a	0,0
12 h luz fluor/12 h esc	0,88b	5,2b	0,7c

¹ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

² Médias (cm) tomadas aos seis dias de incubação.

³ Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste qui-quadrado de Wald.

ausência de luz, à temperatura ambiente de $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Vários meios de cultura têm sido utilizados para melhorar a esporulação e o crescimento das espécies de *Alternaria*. O meio mais comum é o batata-dextrose-ágar (BDA); porém observa-se que meios de cultura como suco V-8 ou com extrato de folhas de girassol (Ungaro & Azevedo, 1986), apesar de não alterarem o crescimento, favoreceram a esporulação. Neste trabalho observou-se uma esporulação significativa no meio de cultura suco V-8, indicando que a presença de algum fator nesse meio induziu a produção de esporos.

Caracterização citológica

A linhagem foi caracterizada citologicamente pela técnica de coloração de núcleos, sendo analisados 100 conídios. Essa linhagem apresenta conidióforos e conídios marrons-ouro. Os conídios apresentam-se em longas e ramificadas cadeias e possuem formato ovóide, com comprimento de 15,4 a 38,4 μm e diâmetro de 5,8 a 9,6 μm , com 1 a 5 septos transversais.

As espécies do gênero *Alternaria* formam um grupo de fungos que podem estar associados com plantas, como saprófitas ou como parasitas. A espécie *A. alternata* é assim descrita por Simmons (1967): possui conidióforos simples, retos ou curvos, lisos, com um a três septos e com perfuração apical; o conídio é em geral ovóide, septado e usualmente possui um poro basal bastante visível. A linhagem isolada possui estas características, o que confirma sua classificação como *Alternaria alternata*.

Caracterização bioquímica

Através de eletroforese em gel de poliacrilamida, a linhagem de *A. alternata* em estudo (Alt A) foi comparada com outras duas linhagens fitopatogênicas (CCT 1250 e CCT 3823), quanto aos padrões de esterase e proteínas totais.

A ocorrência de bandas eletroforéticas nos sistemas izoenzimáticos das esterases α e β das três linhagens de *A. alternata* está representada na Fig. 1. Os modelos obtidos do sistema esterase diferiram no número de bandas e na mobilidade entre elas, nas três linhagens. Foi possível distinguir oito

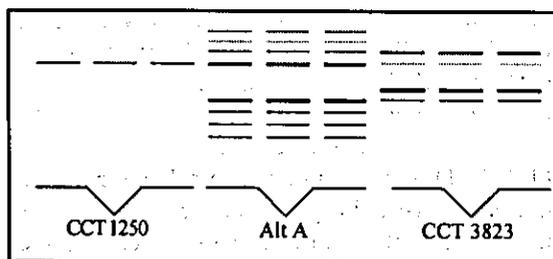


FIG. 1. Zimograma dos padrões eletroforéticos nos sistemas alfa e beta-esterases em três linhagens de *Alternaria alternata*.

bandas, sendo a banda α esterase com $R_m = 0,58$ comum às três linhagens, diferindo somente na mobilidade para a linhagem CCT 1250. As bandas com $R_m = 0,65$ e $0,67$ da β esterase foram comuns às linhagens Alt A e CCT 3823. As bandas α esterase com $R_m = 0,54$ e $0,52$ e as bandas β esterase com $R_m = 0,72$ e $0,76$ foram detectadas somente na linhagem Alt A. Os resultados mostram que a variabilidade detectada no sistema esterase de *A. alternata* permite a caracterização das diferentes linhagens. A caracterização também foi possível com o uso do padrão eletroforético para proteínas totais (Fig. 2).

As amostras incubadas por diferentes períodos (um a seis dias) em três concentrações do fungicida carbendazim (0; 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram submetidas à análise do padrão protéico: nenhuma variação, tanto no padrão como nas bandas, foi observada quando a linhagem Alt A de *A. alternata* foi incubada em meio de cultura BD sem carbendazim. Porém houve expressão de diferentes proteínas quando as linhagens fúngicas em estudo foram inoculadas em meio de cultura BD com carbendazim. Pode-se verificar, pela análise das bandas protéicas, que os padrões das bandas nas amostras que cresceram na presença do fungicida são muito semelhantes, apesar de a intensidade da expressão ser diferente. As exceções encontradas foram as bandas com $R_m = 0,65$ e $0,83$. No primeiro caso, verificou-se a presença da banda somente quando o fungo foi avaliado aos dois dias de incubação, na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbendazim. As bandas com $R_m = 0,83$ foram observadas somente na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbendazim, indicando expressão diferenciada das proteínas na presença de

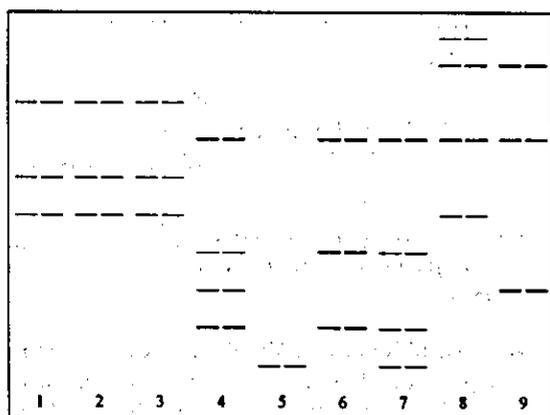


FIG. 2. Zimograma da expressão protéica em três diferentes linhagens de *Alternaria alternata* incubadas em meio de cultura (batata-dextrose - BD) com e sem carbendazim (MBC). 1) 2 dias; 2) 4 dias; 3) 6 dias; 4) 2 dias (MBC 10 µg/mL); 5) 2 dias (MBC 100 µg/mL); 6) 4 dias (MBC 10 µg/mL); 7) 6 dias (MBC 100 µg/mL); 8) CCT 1250; 9) CCT 3823.

altas concentrações do fungicida. As linhagens CCT 1250 e CCT 3823, incubadas somente em meio de cultura BD sem carbendazim, apesar de apresentarem bandas em comum, têm algumas proteínas que são expressas somente em uma das linhagens. Esses resultados corroboram com os do perfil esterático, no tocante à variabilidade das linhagens.

Os modelos eletroforéticos de enzimas solúveis e outras proteínas de fungos representam uma manifestação direta da constituição genética celular e podem ser bastante úteis quando utilizados para classificação taxonômica daqueles organismos. Esses modelos exibem uma menor variação dentro da espécie do que entre espécies, mas são muito úteis para a caracterização dos isolados dentro da espécie (Clare et al., 1968, citados por Conti et al., 1980). A possibilidade de caracterização eletroforética de diferentes linhagens é importante para melhorar algumas técnicas, como, por exemplo, a de degradação, uma vez que alguns isolados podem exibir diferentes graus de patogenicidade.

Alguns autores têm correlacionado diferenças nos perfis enzimáticos com alterações do material genético ocorrido por mutações, responsáveis pelos padrões com diferentes posições de migrações em

linhagens selvagens e mutantes (Furlaneto, 1989; Valadares, 1989). Sendo assim, podem-se utilizar perfis de esterase para a detecção da variabilidade natural de *Alternaria*, pois esse padrão possibilitou a obtenção de bandas visíveis e características nas diferentes linhagens estudadas.

CONCLUSÕES

1. O crescimento de *Alternaria alternata* Alt A varia entre os diferentes meios de cultura.
2. A ausência de luz é essencial à esporulação de *A. alternata* Alt A.
3. Os padrões eletroforéticos de α e β esterases e de proteínas totais apresentam perfis de bandas entre a linhagem Alt A e as linhagens fitopatogênicas CCT 1250 e CCT 3823 de *A. alternata*.

REFERÊNCIAS

- AUDUS, L.J. Herbicide behavior in the soil. In: AUDUS, L.J. (Ed.). *The physiology and biochemistry of herbicides*. New York: Academic Press, 1964. p.163-206.
- CONTI, E. de; MESSIAS, C.L.; SOUZA, M.L. de; AZEVEDO, J.L. Electrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarrhizium anisopliae*. *Experientia*, v.36, p.293-294, 1980.
- FURLANETO, M.C. *Recombinação genética e produção de celulases em Trichoderma pseudokoningii var. rifa*. Piracicaba: USP-ESALQ, 1989. 151p. Dissertação de Mestrado.
- HARVEY, R.G. Herbicide dissipation from soils with different herbicide use histories. *Weed Science*, v.35, p.583-589, 1987.
- KAUFFMAN, D.D.; KATAN, J.; EDWARDS, D.F.; JORDAN, E.G. Microbial adaptation and metabolism of pesticides. In: HILTON, J.L. (Ed.). *Agricultural chemicals of the future*. Totowa: Rowman & Allanheld Pub., 1985. p.437-451.
- KEARNEY, P.C.; KELLOGG, S.T. Microbial adaptation to pesticides. *Pure and Applied Chemistry*, v.57, p.389-403, 1985.

- MISAGHI, I.J.; GROGAN, R.G.; DUMIWAY, J.M.; KIMBLE, K.A. Influence of environment and culture media on spore morphology of *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, v.68, p.29-34, 1978.
- PACCOLA-MEIRELES, L.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L.; ALFENAS, A.C. *Manual de técnicas eletroforéticas em microrganismos*. Piracicaba: FEALQ, 1988. 54p.
- PRASAD, B.; DUTT, B.L.; NAGAICH, B.B. Inducing sporulation in *Alternaria solani*. I. Effect of water treatment. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, v.49, p.141-146, 1973.
- SIEGEL, M.R. Benomyl-soil microbial interactions. *Phytopathology*, v.65, p.219-220, 1975.
- SILVA, C.M.M.S. *Biodegradação do fungicida carbendazim*. Rio Claro: UNESP, 1996. 86p. Tese de Doutorado.
- SIMMONS, E.G. Typification of *Alternaria*, *Stemphyllirim* and *Ulocladium*. *Mycologia*, v.59, p.67-92, 1967.
- TANAKA, T.; MURATA, N.; KATO, H. Behavior of nucleic acid chromossomes during ascus development in matting between rice-strain or weeping lovegrass-strain and ragistra of *Pyricularia*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, v.45, p.182-191, 1979.
- TU, C.M. Effect of fungicides, captafol and chlorotalonil, on microbial and enzymatic activities in mineral soil. *Journal of Environmental Science and Health: Part B*, v.28, p.67-80, 1993.
- TUITI, J. *Plant pathological methods: Fungi and Bacteria*. Minneapolis, MI: Burgess Pub. Co., 1969. 239p.
- UNGARO, M.R.G.; AZEVEDO, J.L. Crescimento e esporulação de *Alternaria alternata* em diferentes condições de cultivo. *Fitopatologia Brasileira*, v.11, p.75-82, 1986.
- VALADARES, M.C.C. *Genética e produção de exoenzimas em linhagens de *Metharizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsh.) Sorokin*. Piracicaba: USP-ESALQ, 1989. 160p. Dissertação de Mestrado.
- YARDEN, O.; SALOMON, R.; KATAN, J.; AHARONSON, N. Involvement of fungi and bacteria in enhanced and nonenhanced biodegradation of carbendazim and other benzimidazole compounds in soil. *Canadian Journal of Microbiology*, v.36, p.15-23, 1990.