

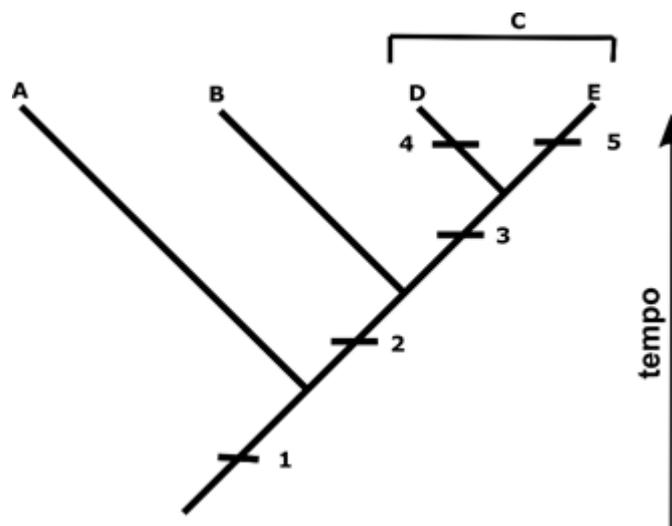
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

Recife, 12 de novembro de 2020.

ESPELHO

PROVA ESPECÍFICA DE MICOLOGIA – PARTE 1

1. Complete as letras do cladograma com os filos e sub-filos do Reino Eumycota, de acordo com Kendrick (2000), e cada número com um evento ou característica compartilhada pelos grupos.



A: Filo Chytridiomycota.

B: Filo Zygomycota.

C: Filo Dikaryomycota.

D: Sub-filo Ascomycotina.

E: Sub-filo Basidiomycotina.

1: Presença de hifas. Parede celular de quitina. Nutrição por absorção ou osmotrófica.

2: Perda do flagelo.

3: Dicariofase. Septação regular nas hifas. Presença de corpos de frutificação.

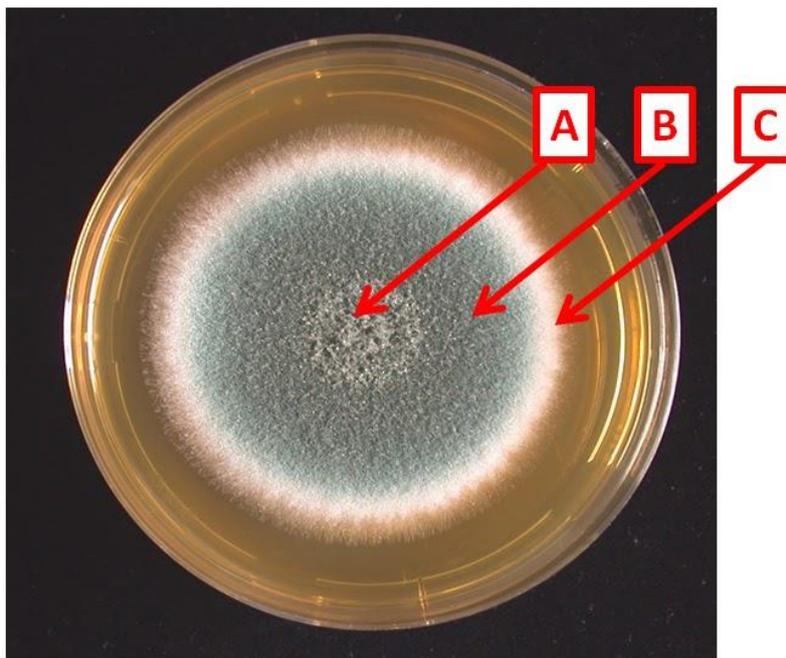
4: Produção de ascos e ascosporos.

5: Produção de basídios e basidiosporos.

2. No passado, os **oomicetos** (Filo Oomycota) eram considerados parte do Reino Fungi. Hoje, sabe-se que fazem parte do Reino Chromista, embora apresente diversas características, tanto morfológicas quanto em seu modo de vida, muito similares às dos fungos. Assinale a alternativa que contém somente características dos fungos verdadeiros:

- a. Meiose espórica, núcleos diploides e zoosporos anisocontes;
- b. Meiose zigótica, núcleos haploides e zoosporos opistocontes;
- c. Meiose gamética, núcleos triploides e zoosporos heterocontes;
- d. Meiose espórica, núcleos poliploides e zoosporos anisocontes.

3. A figura representa o crescimento de sete dias de um fungo em cultura pura. Para realizar um repique (retirar biomassa fértil de uma colônia e inocular em outro recipiente com meio de cultura), de qual destes três pontos seria mais adequado remover material e por quê?



Do ponto B, porque, uma vez que o meio de cultura é homogêneo, não há orientação no crescimento do fungo, que assume crescimento radial (centrífugo). Logo, considerando a divisão de trabalho das hifas, o centro da colônia (ponto A) é a parte mais antiga, contendo poucos esporos viáveis. O ponto C contém os ápices das hifas, onde ocorre, sobretudo, a extensão micelial. É neste ponto que a captação de recursos é mais pronunciada, e tanto os nutrientes como os núcleos são movidos para o centro da colônia (ponto B), onde a esporulação é maior. Logo, como um repique depende de propágulos férteis para ser bem sucedido, o ponto B é o mais recomendado, por ser a parte medial da hifa o sítio de reprodução deste fungo.

4. Considerando a presença e utilização de fungos na indústria alimentícia, mas também os vários fatores abióticos que podem afetar os mecanismos de sobrevivência dos fungos e a possível contaminação e deterioração de alimentos por fungos e que fatores intrínsecos são as propriedades inerentes dos produtos alimentares em si; fatores extrínsecos estão relacionados com o processamento e manipulação alimentar; e fatores implícitos representam as propriedades e interações dos micro-organismos presentes, indique:

a) Quais dos seguintes fatores são intrínsecos (I), extrínsecos (E) ou implícitos (S):

- (I) potencial hidrogeniônico (pH)
- (E) temperatura
- (E) concentração gasosa (oxigênio ou dióxido de carbono)
- (S) taxas de crescimento
- (I) textura
- (I) conteúdo nutricional
- (S) comunicação célula-célula
- (I) sólidos solúveis presentes no alimento (sal/açúcar)
- (E) umidade relativa
- (I) conservantes

b) Para cada uma das afirmações seguintes, se é verdadeira ou falsa:

- (V) tanto os fatores intrínsecos como os extrínsecos podem ser manipulados para conservar os alimentos.
- (F) todos os fungos têm os mesmos requerimentos de atividade da água para o seu crescimento.
- (V) os conservantes alimentares inibem o crescimento fúngico.
- (V) certos nutrientes como o nitrogênio, carbono, minerais e vitaminas podem afetar o crescimento fúngico.
- (V) ausência de oxigênio ou presença de dióxido de carbono inibem a maioria dos fungos e reduzem a deterioração alimentar.

5. As micoses superficiais são infecções fúngicas que acometem principalmente tecidos queratinizados, como pele, unhas e cabelos ou pelos. Sobre estas micoses, assinale verdadeiro (V) ou falso (F):

(F) As dermatofitoses são micoses superficiais benignas popularmente conhecidas como “pano branco”. As lesões são constituídas por placas hipo ou hiperpigmentadas, escamosas e de bordas

delimitadas que podem cobrir diversas áreas do corpo. O agente etiológico desta micose é a *Malassezia* sp., uma levedura lipodependente e polimórfica, que, em parasitismo se apresenta como células leveduriformes globosas ou agrupadas e filamentos curtos, septados e irregulares.

(V) Tinha Nigra é uma infecção superficial benigna que acomete o estrato córneo da pele. Geralmente é assintomática, e caracterizada pela presença de lesões de cor preta ou marrom-escura, com bordas bem definidas e sem descamação, as quais aparecem na palma das mãos. O agente etiológico é a *Hortaea werneckii*, uma levedura escura, polimórfica, que em parasitismo, apresenta-se com hifas demáceas, septadas e ramificadas, e em sua vida sapróbia habita diversos ambientes com elevada salinidade.

(F) Piedra Preta é uma micose causada pela levedura *Trichosporon* sp. que possui caráter assintomático, benigno e de baixo contágio. Acomete indistintamente os cabelos e pelos das regiões axilares, pubiana, perianais, barba e bigode. Caracteriza-se pelo aparecimento de pequenos nódulos de consistência mucilagínosa de coloração clara e são facilmente destacadas do pelo.

(F) Piedra Branca é uma micose superficial causada pelo fungo demáceo *Piedraia hortae*, que se caracteriza pelo aparecimento de nódulos endurecidos de coloração escura nos cabelos que permanecem fortemente aderidos ao pelo. Ao exame microscópico, são observados, juntos aos filamentos, estruturas reprodutivas sexuadas como ascos e ascósporos.

(F) Pitiríase versicolor é uma infecção causada por um grupo de fungos que possuem afinidade por tecidos queratinizados, pois possuem atividades queratinolíticas, isto é, degradam a queratina (pele, pelos e unhas). São também denominadas de tinhas ou *tinea*, e seus principais agentes etiológicos são *Microsporum* spp., *Trichophyton* spp. e *Epidermophyton floccosum*.

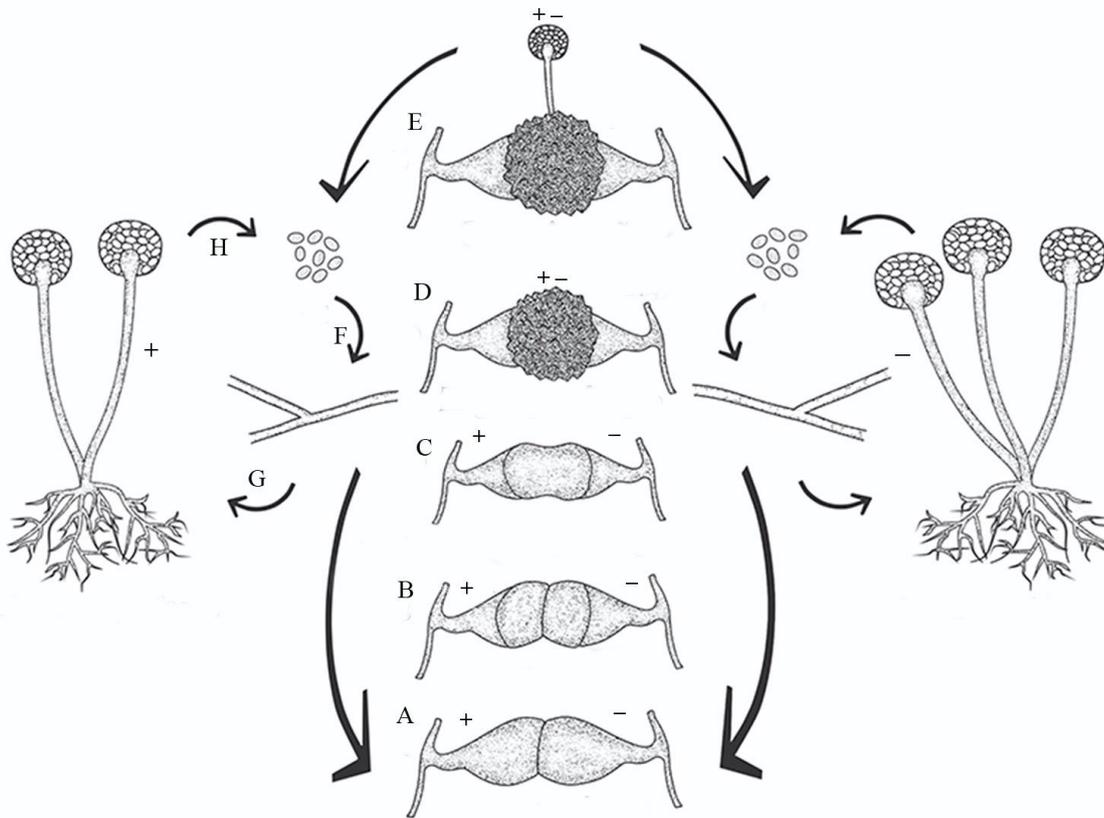
6. O pão é uma das comidas preparadas mais antigas do mundo e tem valor nutricional, cultural e até mesmo religioso para alguns povos. Os ingredientes básicos para produção de pães são farinha de trigo, água, sal e fermento. Na panificação, as leveduras (*Saccharomyces* sp.) são empregadas principalmente com o intuito de promover o crescimento da massa e esse processo está relacionado com a...

- a) Proliferação do fungo em função da temperatura baixa (5 °C)
- b) Liberação de gás carbônico resultante da fermentação.
- c) Formação de ácido láctico e acúmulo de água no interior da massa.
- d) A reação de Maillard.
- e) Propagação das leveduras graças ao consumo do glúten.

PROVA ESPECÍFICA DE MICOLOGIA – PARTE 2

Prova específica Mestrado

7. A figura abaixo mostra os ciclos sexuado e assexuado de *Rhizopus stolonifer*. Explique, detalhadamente, o que ocorre em cada uma das etapas, de acordo com as letras indicadas na figura, citando os nomes de todas as estruturas envolvidas.



A reprodução sexuada se inicia com a fusão de dois gametângios multinucleados que podem ser denominados de "+" e "-", o que significa que são geneticamente diferentes, porém compatíveis. Esses gametângios podem surgir de hifas somáticas comuns ou de ramificações especializadas, denominadas zigóforos. Essas hifas comuns, ou zigóforos, crescem uma em direção à outra e entram em contato. Nesse momento, a parte apical dessas estruturas sofre um inchaço para formar os progametângios que ficam ligados por um septo de fusão (A). Em seguida, um septo é formado na parte apical de cada progametângio e o restante dessa estrutura passa a ser chamada de célula suspensora (B). O septo de fusão se dissolve e os protoplastos dos dois gametângios se misturam (plasmogamia), formando o prozigosporângio (C). Em seguida, a parede da célula formada pela fusão dos dois gametângios, que é delimitada pelos septos formados na parte apical de cada gametângio, sofre um espessamento, pigmentação e se torna um zigosporângio, que pode ter parede lisa (ex: *Lichtheimia* spp.) ou ornamentada (ex: *Mucor* spp.), e porta apenas um zigosporo (D). A cariogamia (fusão de núcleos) ocorre no zigosporo e precede a meiose, que pode ocorrer dentro do zigosporo (que é diplóide) ou durante a germinação desse esporo sexuado. O zigosporo (E) pode germinar emitindo uma hifa germinativa, bem como um esporângio que libera esporangiosporos haplóides. Esses esporangiosporos podem germinar (F), caso encontrem um substrato favorável, e

formar as hifas, que irão se diferenciar em esporangióforos (G) que, quando maduros, liberarão os esporangiosporos (ciclo assexuado).

8. Os fungos podem ser aplicados em diversas áreas e, dentre estas, destaca-se a agropecuária, considerando a necessidade de oferta de alimentos de origem animal e vegetal. Com base nesta informação, escolha um grupo que poderia ser utilizado nesta área e explique de que forma eles contribuiriam para a área.

Grupos dos fungos formadores de micorrizas – tanto ecto como endomicorrizas. Estes fungos aumentam a área de exploração do solo e conseguem acessar partes do solo inacessíveis às raízes, possibilitando aumento na absorção de água e nutrientes, especialmente os de baixa mobilidade no solo – i.e. fósforo. Como o P é um dos elementos mais limitados, especialmente nos solos tropicais, e essenciais ao desenvolvimento das plantas, a inoculação de fungos micorrízicos pode aumentar o aporte de P nas plantas. A otimização na absorção de P pode levar a redução em sua aplicação e nos custos na produção, diminuindo a perda deste elemento por lixiviação aos corpos d'água e consequentemente a eutrofização.

Grupo de fungos utilizados no controle biológico de pragas – entomopatogênicos. Estes fungos colonizam o exoesqueleto dos insetos e se expandem para seu interior, levando-o a morte. O uso de fungos no controle de pragas reduz o uso de agroquímicos e o acúmulo de resíduo que pode trazer impacto negativo ao ambiente. Alguns fungos também são capazes de inviabilizar carrapatos, ectoparasitas de animais de produção – bovinos, equinos, por meio da ação de enzimas; e outros podem preda ou parasitar nematóides, seja por ação física das hifas que comprimem o corpo do animal ou por ação química com secreção de substâncias que podem inibir o desenvolvimento e propagação do nematóide.

Grupo de fungos solubilizadores de Fósforo – São constituídos por representantes de Ascomycota que produzem enzimas (fosfatases) e substâncias que acidificam o solo, aumentando a disponibilidade de fósforo às plantas. Este aumento na disponibilidade de P pode reduzir a aplicação em demasia deste elemento, reduzindo os custos de produção.

Grupo de fungos endofíticos – podem aumentar a produção de substâncias bioativas nas plantas, reduzindo o ataque de patógenos do solo e herbívoros. Esta melhoria na defesa das plantas pode levar a redução no uso de agroquímicos, aumentando a renda do produtor e melhorando a qualidade dos alimentos produzidos.

Grupo de fungos utilizados na indústria de alimentos – a) queijos: podem agregar valor ao produto por apresentar características organolépticas, resultantes da ação de enzimas que atuam sobre os ácidos graxos do queijo produzindo sabor característico, que agradam o consumidor. Destacam-se os queijos roquefort, camembert; b) bebidas: leveduras utilizadas na produção de vinho, cerveja e

aguardente, que atuam por meio da fermentação alcoólica, ou seja, liberam enzimas que atuam sobre os açúcares presentes na uva, cevada/malte/e outros grãos e cana-de-açúcar produzindo álcool.

Grupo de fungos do rúmen – representantes do grupo Neocallimastigomycota (anteriormente em Chytridiomycota) foram descritos no rúmen de animais ruminantes (exemplo - caprinos, ovinos e bovinos) e são conhecidos pela capacidade de viver em condições anaeróbicas. Estes fungos produzem enzimas que atuam sobre os alimentos fibrosos ingeridos pelos ruminantes, disponibilizando glicose ou celobiose facilmente absorvidas.

9. Após a leitura, assinale a alternativa que contém as palavras corretas para completar o texto:

“Líquens são "organismos duplos", formados por uma associação simbiótica mutualística entre um fungo e um organismo fotossintetizante. O componente fúngico de um líquen, chamado (I) _____, compõe a maior parte do talo, e tem na liquenização uma associação (II) _____. Na grande maioria dos casos, é um fungo do Filo (III) _____. O componente fotossintetizante é, em geral, uma (IV) _____ ou raramente uma cianobactéria. A alga fornece ao fungo produtos da fotossíntese e, no caso de ser uma cianobactéria, pode fornecer também (V) _____ atmosférico após fixação. Com relação à sua morfologia, líquens podem ter talos com vários padrões morfológicos, mas a maioria dos líquens tropicais possui talo (VI) _____, ou seja, que não apresenta córtex inferior, estando a medula diretamente ligada ao substrato. Para a reprodução, podem formar conídios ou esporos sexuados, como os demais fungos, mas também podem formar os propágulos liquênicos, tais como os (VII) _____, agrupamentos de células do fotobionte e hifas do fungo associadas, formados em grande quantidade e com alta capacidade de dispersão”.

- a. (I) fotobionte, (II) obrigatória, (III) Zygomycota, (IV) clorófita, (V) oxigênio, (VI) crostoso, (VII) sorédios;
- b. (I) micorriza, (II) facultativa, (III) Ascomycota, (IV) rodófitas, (V) fósforo, (VI) folioso, (VII) isídios;
- c. (I) micobionte, (II) facultativa, (III) Basidiomycota, (IV) feófitas, (V) nitrogênio, (VI) fruticoso, (VII) isídios;
- d. (I) fotobionte, (II) obrigatória, (III) Ascomycota, (IV) estreptófitas, (V) carbono, (VI) crostoso, (VII) cifelas;
- e. (I) micobionte, (II) obrigatória, (III) Ascomycota, (IV) clorófita, (V) nitrogênio, (VI) crostoso, (VII) sorédios;

10. Um dos grandes problemas da atualidade é o surgimento de bactérias resistentes a antibióticos. Nesse contexto, estudos sobre as propriedades antibacterianas dos fungos vêm se mostrando promissores. De acordo com a tabela abaixo:

- a. Qual fungo apresentaria maior interesse na bioprospecção por compostos bactericidas? Justifique.

Ganoderma multiplicatum, pois, em média, apresentou maior atividade contra as linhagens de bactérias.

- b. Qual delas você não estudaria mais? Justifique.

Phellinus rimosus, pois não mostrou atividade para a maioria das linhagens, além de mostrar uma das menores atividade contra as linhagens de bactérias.

Espécies	Linhagens						
	676	728	729	730	733	677	691
<i>Fomitopsis cupreorosea</i>	20.3±0.42	20.6±0.15	20.15±0.44	20.4±0.12	20.7±0.95	20.2±0.06	20.4±0.17
<i>Ganoderma multiplicatum</i>	21.5±1.80	21.7±2.69	18.7±0.17	18.9±0.42	22.1±0.46	21.8±0.78	22.3±0.35
<i>G. parvulum</i>	-	-	16.1±0.26	16.3±0.36	-	-	17.5±0.35
<i>Grammothele lineata</i>	18.9±0.59	18.3±0.17	18.2±0.42	18.0±0.50	18.1±0.26	17.9±0.56	18.5±0.32
<i>Phellinus rimosus</i>	-	-	-	9.2±0.35	-	-	-
<i>Rigidoporus lineatus</i>	21.0±0.12	22.2±0.68	21.6±0.21	18.1±0.06	18.4±0.47	18.1±0.74	18.2±0.35
<i>R. microporus</i>	22.4±0.96	18.3±0.35	22.6±0.29	22.9±0	18.5±0.36	18.2±0.10	18.2±0.36
<i>Stereum ostrea</i>	9.2±0.17	9.3±0.25	21.3±0.06	9.0±0.40	9.2±0.15	9.0±0.17	21.3±1.33

PROVA ESPECÍFICA DE MICOLOGIA – PARTE 2

Prova específica Doutorado

7. A Figura 1 representa uma árvore filogenética gerada através da análise de sequências da região ITS (*nuclear ribosomal internal transcribed spacer region*). As amostras de estudo (S1-S17) são comparadas com estirpes de algumas espécies conhecidas. Sobre as amostras de estudo, indique qual o número mínimo de espécies diferentes estão presentes e identifique quais são potenciais

novidades taxonômicas. Como justifica a sua escolha? Quais as amostras de estudo que não podem ser classificadas ao nível de espécie e por quê? Proponha pelo menos uma potencial limitação à interpretação desta análise e possível solução.

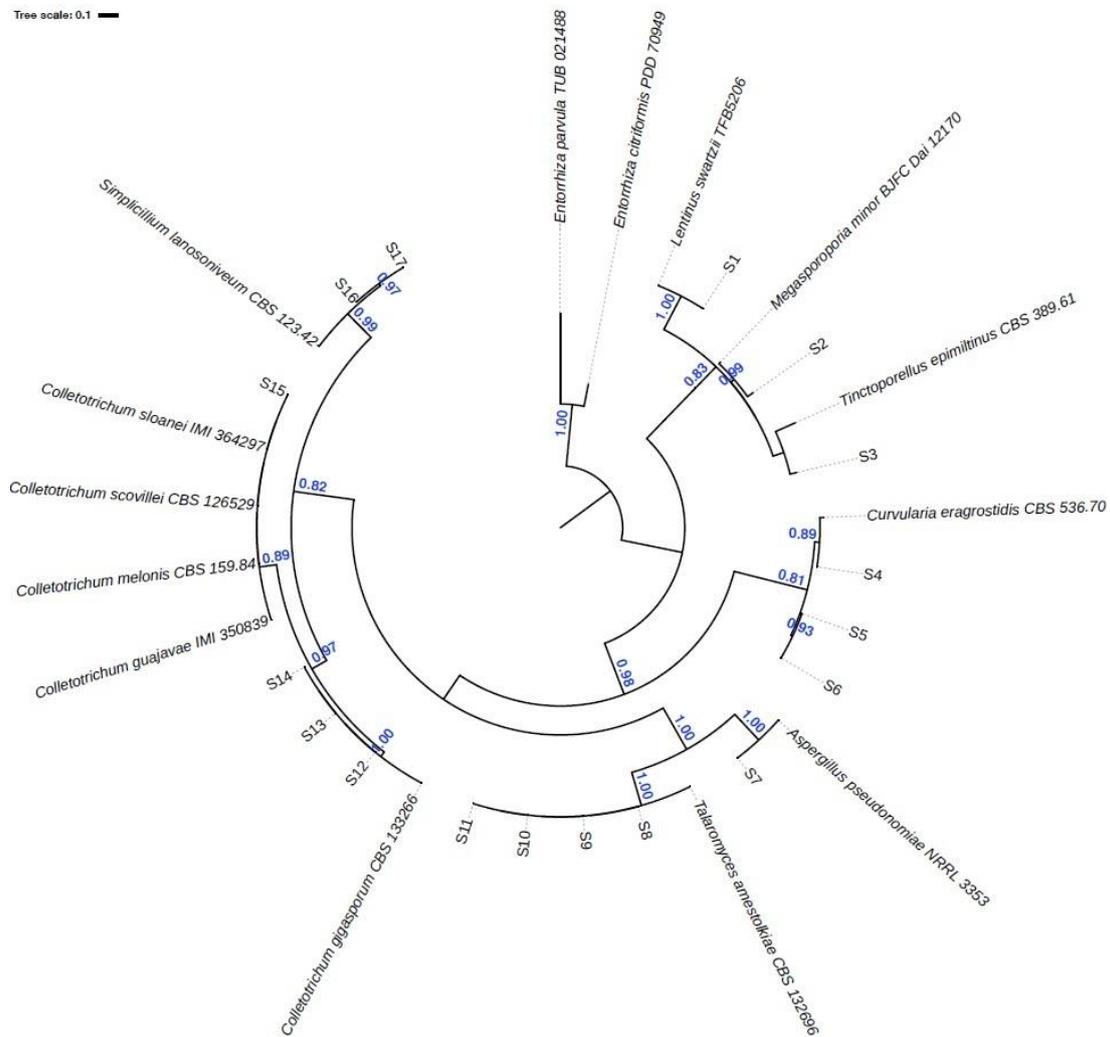


Figura 1: Árvore filogenética construída com base na análise da região ITS. As espécies *Entorrhiza parvula* e *E. citrifomis* foram utilizadas como outgroup. Os valores acima dos ramos representam a porcentagem de árvores nas quais os táxons agruparam no teste de bootstrap (1000 réplicas). A árvore está desenhada à escala, com o comprimento dos ramos em função do número de substituições por sítio.

As amostras de estudo representam pelo menos 10 espécies distintas (S1 / S2 / S3 / S4 / S5+S6 / S7 / S8-S11 / S12-S14 / S15 / S16+S17). Cada um destes conjuntos agrupa em grupos monofiléticos com um alto valor de apoio estatístico. Os grupos S5+S6 e S16+S17 representam potenciais novidades taxonômicas uma vez que não agrupam com as espécies conhecidas incluídas (apoio > 90%).

As amostras S3 e S15 não podem ser classificadas ao nível de espécie por razões distintas: a S3 porque o agrupamento com a amostra *T. epimiltinus* não tem o suficiente apoio estatístico - neste caso pode-se dizer que está relacionada com esta espécie, mas seria necessário realizar análises complementares para confirmar; a S15 porque está incluída num grupo monofilético que inclui várias espécies conhecidas sendo que a distância genética entre todas é reduzida - neste caso seria classificada como *Colletotrichum* sp..

Entre as possíveis limitações temos:

- o poder de diferenciação entre espécies do marcador genético utilizado - apesar de ter sido definido como o “código de barras” (*barcode*) genético e de ter boa capacidade para diferenciar grupos taxonômicos mais afastados, sabe-se que o ITS tem várias limitações a diferenciar espécies próximas, como aconteceu no caso da amostra S15. Isto explica os comprimentos mais longos dos ramos na base de grupos taxonômicos superiores e mais curtos (ou aparentemente inexistentes) dentro dos gêneros. Para solucionar as limitações associadas ao ITS é possível realizar uma análise multi-locus, ou seja, combinar marcadores genéticos adicionais (por exemplo EF1- α , RPB2, calmodulina, beta-tubulina).
- podemos não ter incluído todas as espécies conhecidas de um determinado grupo e por isso temos potenciais novidades taxonômicas. Neste caso é necessário tentar circunscrever o grupo taxonômico mais próximo e efetuar uma boa revisão bibliográfica de forma a incluir todas as espécies descritas à data.

8. A produção de inoculantes microbianos é um dos entraves para aplicação e comercialização de fungos micorrízicos arbusculares. Desta forma, a empresa Valemic obteve produção de esporos (esporos/grama de substrato) de algumas espécies utilizando substratos diversos (S+BC = solo + bagaço de cana; S+L = solo + leguminosa; S+BU = solo + bagaço de uva; e Solo), após quatro meses de cultivo em estufa. O custo de cada substrato variou em função da fonte de resíduo utilizado, a saber: S+BC – R\$ 5,00; S+L – R\$ 17,00; S+BU – R\$ 10,00 e Solo – sem custo.

Espécies	S+BC	S+L	S+BU	Solo
<i>Acaulospora longula</i>	3 bC	31 bA	21 bAB	13 bB
<i>Claroideoglomus etunicatum</i>	13 aC	51 aA	35 aAB	23 aBC
<i>Gigaspora albida</i>	7 abC	22 cAB	33 aA	15 bBC

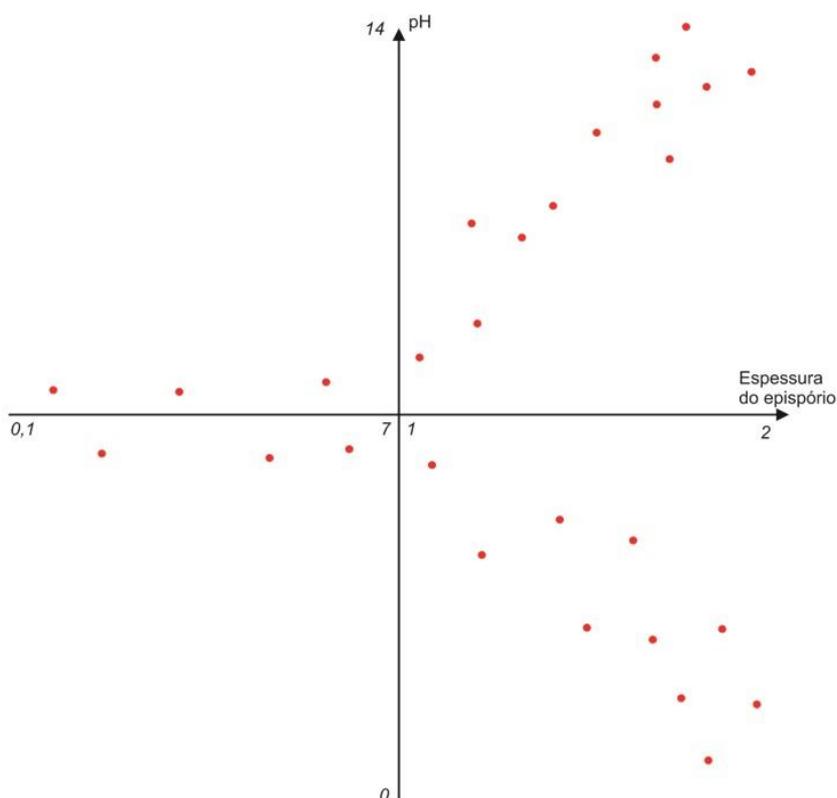
Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Com base nas informações sobre esporulação e custo, qual o substrato mais promissor para produção de inoculante? Justifique a resposta.

A esporulação dos fungos varia em função da espécie e do substrato de cultivo. O substrato a base de solo + leguminosa foi o mais favorável à produção de inóculo de todas as espécies, embora o substrato a base de solo + bagaço de uva também seja propício à esporulação, pois não difere

significativamente de S+L. Considerando o custo do substrato, a escolha de S+BU pode ser mais indicada para produção em larga escala, pois reduziria em 70% o custo de produção.

9. Esporos de fungos apresentam grande variabilidade morfológica e podem ser extremamente resistentes. O **epispório**, camada mais externa do esporo, pode conferir a essa proteção contra situações de estresse. O gráfico abaixo apresenta fungos de diversas espécies (pontos) em um gradiente, correlacionando a espessura do epispório com o pH que estes fungos podem tolerar. O que você pode concluir após observar esta correlação?



Observando a figura, torna-se claro que a espessura do epispório tem correlação positiva forte com a resistência dos esporos, em várias espécies, em situações de extremos de pH. Tanto ambientes ácidos como ambientes com pH muito alcalino não são limitantes para fungos com esporo de parede espessa. Já fungos com epispório delgado (eg. $> 1 \mu\text{m}$) toleram somente intervalos neutros de pH.

10. É de comum conhecimento que alimentos perecíveis precisam ser **preservados** para ter sua sanidade mantida. Ao preparar uma refeição, uma pessoa partiu uma fatia de queijo ao meio, guardando uma metade na geladeira e esquecendo a outra do lado de fora! Dois dias depois, a pessoa percebeu que a metade que estava este tempo em temperatura ambiente, terminou “mofada”.

Para a surpresa da pessoa, duas semanas depois, a metade que estava dentro da geladeira também apareceu mofada, mas os fungos pareciam diferentes. Porque você acha que os fungos que esporularam sobre queijo em temperatura ambiente não foram os mesmos que aqueles que o fizeram dentro da geladeira?

Existem fungos que podem esporular em temperaturas ambientes ou ambientes mais frios. Os fungos encontrados em temperaturas ambientes, que circulam no ar são os chamados fungos anemófilos, e provavelmente foram os encontrados no queijo fora da geladeira, enquanto os fungos da geladeira são aqueles que necessitam de um ambiente mais frio para crescerem, já que os fungos são organismos que podem depender da especificidade do substrato e do ambiente onde crescem, podendo ou não tolerar.