

LEVEDURAS ASSOCIADAS A FRUTOS NATIVOS DO CERRADO DO DISTRITO FEDERAL

Lucas Gabriel Ferreira Coelho^{1*}, Geisianny Augusta Monteiro Moreira², Catharine Abreu Bomfim², Helson Mario Martins do Vale³.

1. Docente de graduação em Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.
2. Docente de doutorado do programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana-UnB.
3. Professor Doutor na Universidade de Brasília - Departamento de Fitopatologia / Orientador.

Resumo:

O objetivo do trabalho foi avaliar a ocorrência e diversidade de leveduras em frutos de plantas nativas do Cerrado do Distrito Federal. Frutos sadios de cinco plantas foram coletados para o isolamento e cultivo de leveduras em meio MYGP. Após a contagem de colônias, as leveduras morfológicamente distintas foram isoladas em cultura pura. A identificação molecular foi realizada por meio de sequenciamento da região ITS (rDNA). Os hospedeiros *O. hexasperma* e *B. gaudichaudii* apresentaram maior densidade de leveduras por grama de fruto e diversidade de espécies. Foram recuperados 37 isolados de leveduras, sendo a maioria pertencente ao Filo Ascomycota. Os gêneros mais frequentes foram *Aureobasidium*, *Meyerozyma* e *Hannaella*. Gêneros como *Candida*, *Filobasidium* e outros também foram identificados. Este é um dos poucos relatos da ocorrência e diversidade de leveduras em frutos de plantas do Cerrado, bem como, selecionar isolados com potencial para aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Diversidade; região ITS; Isolamento e Cultivo.

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: Universidade de Brasília (UnB)

Introdução:

O Cerrado Brasileiro corresponde cerca de 2 milhões de Km² do território nacional, sendo considerado a maior e a mais diversa savana do mundo (Cardoso Da Silva & Bates 2002). Esse bioma possui cerca de 12 mil espécies de plantas vasculares, sendo que 44% destas são endêmicas desse bioma (Myers *et al.* 2000). Porém, grande parte desse bioma está ameaçado pelo avanço da fronteira agrícola, sendo uma estimativa de 22 mil Km² de vegetação nativa perdida (Machado *et al.* 2004).

Essas plantas são nichos favoráveis para muitos micro-organismos, e as leveduras são comumente encontradas em várias partes como raízes e folhas (Ferreira *et al.* 2017; Sperandio *et al.* 2015), órgãos de reserva subterrâneos (Isaeva *et al.* 2010), caule (Ferreira *et al.* 2017), frutos (Moreira *et al.* 2015; Sperandio *et al.*, 2015), néctar (Barbosa *et al.* 2012) e flores (Rosa *et al.* 2009).

Leveduras são comumente encontradas em superfícies e tecidos internos de plantas, dependendo de substratos com altas concentrações de compostos prontamente disponíveis, como frutos e outros órgãos de reserva (Isaeva *et al.* 2010). A maioria das leveduras epifíticas possuem características morfológicas e fisiológicas que permitem sobreviver a fatores adversos, sendo a ocorrência em tecidos internos (endofíticos) uma possível adaptação para sobreviver aos fatores externos. Muitas espécies já foram relatadas como importantes em processos biotecnológicos, como no biocontrole de fungos patogênicos em frutos de pós colheita (Sperandio *et al.* 2015), na produção de enzimas como celulase, lipase, proteases (Oliveira 2015) e produção de compostos secundários que promovem crescimento e proteção as plantas (Moller *et al.* 2016). No entanto, informações sobre a ocorrência e diversidade de leveduras em frutos de plantas nativas do Cerrado continuam escassas. Com base nisso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ocorrência e diversidade de leveduras totais (epifíticas e endofíticas) em frutos de plantas nativas do Cerrado do Distrito Federal, por meio de técnicas de cultivo e identificação molecular.

Metodologia:

Foram coletados frutos sadios e maduros de cinco espécies de plantas nativas do Cerrado em duas Unidades de Conservação do Distrito Federal: *Myrcia tomentosa* (Araçacinho); *Byrsonima coccolobifolia* (Murici), coletadas no Jardim Botânico de Brasília - DF e as espécies *Ouratea hexasperma* (Vassoura de Bruxa), *Brosimum gaudichaudii* (Mama-cadela) e *Passiflora nitida* (Maracujá do Cerrado) coletadas na Reserva Ecológica do IBGE, Distrito Federal.

Para o isolamento de leveduras totais, os frutos dos hospedeiros *O. hexasperma*, *B. gaudichaudii*, *P. nitida* (casca do fruto), *M. tomentosa* e *B. coccolobifolia* foram macerados, homogeneizados com água peptonada (0,1%) e submetidos a agitação por 20 minutos a 150 rpm. Foi realizada diluição seriada até 10⁻³, e 0,1 ml dessa solução foi inoculado em meio de cultura MYGP (extrato de malte 0,3%, extrato de levedura 0,3%, peptona 5% e glicose 1%) e incubadas em temperatura ambiente. Após a incubação foram feitas leituras das placas para obtenção do número de Unidade Formadora de Colônia (UFC), e em seguida, as colônias de leveduras morfológicamente distintas foram repicadas para obtenção de cultura pura. Todos os isolados de

leveduras foram armazenados com Glicerol (25%) em freezer a -80°C.

A extração de DNA foi realizada a partir do precipitado de células, utilizando o método clorofórmio/álcool isoamílico e *beads* de vidro para lise mecânica das células e tampão de extração (2% Triton, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10mM Tris pH 8 e 1 mM EDTA pH 8).

A identificação foi realizada a partir da amplificação, por meio da técnica de PCR, da região ITS utilizando o par de *primers* ITS 4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3') e ITS 5 (5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAGG 3'). As amplificações foram realizadas para um volume final de 25µl, contendo 20-30 ng de DNA, 200 µM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Tampão 10x, 1,25U de *Taq* DNA polimerase, 0,2 µl de cada primer e água deionizada (*Milli-Q*) esterilizada para completar o volume final. O programa de termociclagem consistiu em: desnaturação inicial a 94°C durante cinco minutos, seguido de 33 ciclos de 30 segundos a 94°C, um minuto a 58°C e dois minutos a 72°C, com uma extensão final de 72°C durante sete minutos. Os fragmentos amplificados foram enviados para sequenciamento na empresa ACTGene utilizando o sequenciador ABI 3130xl *Applied Bio Systems* de acordo com a metodologia de Sanger. Para a identificação das espécies, as sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no NCBI (www.ncbi.nih.gov) usando o algoritmo BLAST(n).

Foi utilizado o programa Past (versão 3.13) para calcular o índice de diversidade (Dominance (D), Shannon (H), Simpson (1-D)). Para todos os índices foram calculados intervalos de confiança aproximados pelo teste *bootstrap* com 10.000 repetições.

Resultados e Discussão:

Em todos os frutos das plantas hospedeiras estudadas foram isoladas leveduras. Os hospedeiros *O. hexasperma* e *B. gaudichaudii* apresentaram as maiores densidades de colônias por grama de fruto. A ocorrência de leveduras são influenciadas por diversos fatores morfológicos, fisiológicos e ecológicos (Glushakova & Chernov 2007; Glushakova & Chernov 2010).

Foram isolados 37 leveduras totais, 20 pertencem ao Filo Ascomycota e 17 pertencem ao Filo Basidiomycota. Para o Filo Ascomycota, as espécies de leveduras mais encontradas foram *Aureobasidium leucospermi*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Candida* sp. Em relação ao Filo Basidiomycota, os gêneros encontrados foram: *Filobasidium*, *Hannaella*, *Rodosporidiobolus*, *Papiliotrema*, *Erythrobasidium*, *Symmetrospora* e *Meira*. As espécies mais abundantes foram *Hannaella pagnoccea*, *Rhodosporeidiobolus ruineniae*, *Filobasidium magnum* e *Filobasidium* sp.

A ocorrência de leveduras do Filo Ascomycota foi maior e esse resultado foi observado em outros trabalhos com leveduras de frutos de plantas nativas do Cerrado (Moreira *et al.* 2015; Sperandio *et al.* 2015). A ocorrência em frutos de plantas nativas do Cerrado predominaram os gêneros *Candida* (Costa *et al.* 2015; Oliveira 2015), *Hanseniaspora* (Oliveira 2015) e *Aureobasidium* (Moreira *et al.* 2015; Sperandio *et al.* 2015) e algumas dessas leveduras isoladas de frutos do Cerrado são utilizadas em processos biotecnológicos (Sperandio *et al.* 2015).

A diversidade de leveduras totais foram analisadas pelos índices de Shannon. Os hospedeiros *B. gaudichaudii* e *O. hexasperma* apresentaram a maior riqueza de espécies (Shannon: 1,733 e 1,677 respectivamente). O hospedeiro *O. hexasperma* obteve o maior número de leveduras compartilhadas com outros hospedeiros. Segundo Isaeva *et al.* 2010, como forma de adaptação a fatores adversos, as leveduras são encontradas em superfícies e tecidos internos de plantas, podendo uma mesma espécie ocupar esses dois ambientes.

Conclusões:

Houve ocorrência de leveduras em todas as plantas hospedeiras estudadas, sendo a diversidade maior nas espécies *O. hexasperma*, *B. gaudichaudii*, considerados, então, ótimos hospedeiros para ocorrência de leveduras. Uma mesma espécie de levedura pode ocorrer em mais de um hospedeiro, com algumas sendo mais específicas que outras. Leveduras do Filo Ascomycota foram mais frequentes nos frutos, porém o Filo Basidiomycota obtiveram maior riqueza de espécies.

Este é o primeiro conjunto abrangente de dados sobre leveduras assintomáticas associadas aos frutos nas espécies *O. hexasperma*, *B. coccolobifolia*, e *M. tomentosa*, com possíveis duas novas espécies de leveduras pertencentes ao gênero *Filobasidium* sp.

Referências bibliográficas

- Barbosa, A.C. et al., 2012. *Wickerhamiella pagnoccae* sp. nov. and *Candida tocantinsensis* sp. nov., two ascomycetous yeasts from flower bracts of *Heliconia psittacorum* (Heliconiaceae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(2), pp.459–464.
- Cardoso Da Silva, J.M. & Bates, J.M., 2002. Biogeographic Patterns and Conservation in the South American Cerrado: A Tropical Savanna Hotspot. *BioScience*, 52(3), p.225.
- Costa, S. et al., 2015. Ocorrência e potencial biotecnológico de leveduras associadas aos frutos de *Attalea speciosa* Mart ex Spreng. *Journal of Bioenergy and Food Science*, 02(4), pp.213–225.
- Ferreira, M.C. et al., 2017. Diversity of the endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical plant *Vellozia gigantea* from the endangered Brazilian rupestrian grasslands. *Biochemical*

- Systematics and Ecology*, 71(April), pp.163–169. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2017.02.006>.
- Glushakova, A.M. & Chernov, I.Y., 2007. Seasonal Dynamic of the Numbers of Epiphytic Yeasts. , 76(5), pp.590–595.
- Glushakova, A.M. & Chernov, I.Y., 2010. Seasonal Dynamics of the Structure of Epiphytic Yeast Communities. *Microbiology*, 79(6), pp.830–839.
- Isaeva, O. V et al., 2010. Endophytic yeast fungi in plant storage tissues. *Biology Bulletin*, 37(1), pp.34–43.
- Machado, R.B. et al., 2004. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. *Conservação Internacional*, pp.1–23. Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Estimativas+de+perda+da+?rea+do+Cerrado+brasileiro#0>.
- Moller, L., Lerm, B. & Botha, A., 2016. Interactions of arboreal yeast endophytes: an unexplored discipline. *Fungal Ecology*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2016.03.003>.
- Moreira, G.A.M., Sperandio, E.M. & Vale, H.M.M., 2015. Leveduras associadas a frutos de plantas nativas do Cerrado: *Eugenia lutescens* Cambess, *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg e *Brosimum guadichaudii* Tréc. *Revista de Biologia Neotropical*, 12(2), pp.104–111.
- Myers, N. et al., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), pp.853–858. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706275> \n <http://www.nature.com/doi/10.1038/35002501>.
- Oliveira, M., 2015. OCORRÊNCIA, DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE LEVEDURAS ISOLADAS DE FRUTOS DO CERRADO. Universidade de Brasília.
- Rosa, C.A. et al., 2009. *Wickerhamomyces queroliae* sp. nov. and *Candida jalapaonensis* sp. nov., two yeast species isolated from Cerrado ecosystem in North Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(5), pp.1232–1236.
- Sperandio, E.M., Martins do Vale, H.M. & Moreira, G.A.M., 2015. Yeasts from native Brazilian Cerrado plants: Occurrence, diversity and use in the biocontrol of citrus green mould. *Fungal Biology*, 119(11), pp.984–993. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2015.06.011>.