

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DIVERSIDADE E TAXONOMIA DE LEVEDURAS
EM FLORES DE *HELICONIA PSITTACORUM***



Anne Caroline Barbosa

Belo Horizonte
2010

Anne Caroline Barbosa

**DIVERSIDADE E TAXONOMIA DE LEVEDURAS
EM FLORES DE *HELICONIA PSITTACORUM***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciência Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa – ICB/UFMG

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

2010

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado, me guiando e me iluminando;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro;

Ao meu orientador Carlos Rosa, quem eu tanto admiro, pela confiança de sempre. Sua orientação foi fundamental para a concretização deste trabalho e para meu crescimento pessoal. Sou imensamente grata a você;

Aos professores Allen Hagler e Fernanda Badotti, por terem aceitado compor a banca examinadora;

Ao professor Luiz Rosa, revisor da minha dissertação, por ter aceitado o convite e pelas sugestões propostas;

Aos professores Paula e Rafael, da Universidade Federal do Tocantins, pela ajuda fundamental durante a coleta do material para esse estudo;

Ao pessoal do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular, pela paciência, ajuda e por permitirem a realização dos sequenciamentos;

Aos meus amigos queridos do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia, Aline, Alice, Camila, Cibele, César, Cris, Débora, Fátima, Gabriella, Iara, Inayara, Larissa, Lili, Lindiane, Lorena, Lu, Mari Costa, Mari Vieira, Maria, Michelle, Monaliza, Nati, Piló, Quel, Rê, Sil, Valéria e Vivi, pela convivência, ensinamentos e ajuda;

À Monica que não faz mais parte do nosso lab., mas sempre será uma grande amiga;

À Camila Gontijo, um agradecimento especial, pela ajuda incomensurável;

Ao Douglas e Fatinha, da secretaria de Pós-Graduação e à Gina, pela atenção;

Aos meus pais, minhas irmãs, pelo carinho, preocupação, apoio e paciência incondicionais;

Às minhas sobrinhas, pela alegria que trazem para a minha vida;

Às queridas amigas Fê, Cris, Elisa e Marininha por continuarem sempre próximas de mim, mesmo com a distância;

À Rose, à Fátima pela ajuda e apoio que foram essenciais nessa fase final...

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Taxonomia de Leveduras	3
2.2 Ecologia de Leveduras	10
2.3 Ocorrência de Leveduras em Flores	16
2.4 O Bioma Cerrado	18
2.5 Flores de <i>Heliconia</i> como Habitat para Leveduras	21
3 OBJETIVOS	
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1 Área de coleta	24
4.2 Coleta e processamento das amostras	25
4.3 Purificação e manutenção das leveduras	25
4.4 Identificação das leveduras	
4.4.1 Agrupamento das leveduras	26
4.4.2 Extração do DNA	26
4.4.3 PCR fingerprint	27
4.4.4 Amplificação utilizando os iniciadores NL1 NL4	27
4.4.5 Purificação dos amplicons	28
4.4.6 Reação de sequenciamento	29
4.4.7 Análise das seqüências	29
4.5 Análise da diversidade das leveduras	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1 Distribuição das espécies	31
5.2 Espécies novas de leveduras	33

5.3 Caracterização fisiológica da comunidade de leveduras	38
5.4 Diversidade	39
6 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO I Características Morfológicas e Fisiológicas das Espécie de Leveduras Isoladas	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Distribuição das espécies de leveduras por amostra de flor de <i>Heliconia psittacorum</i>	42
Tabela 2 Perfil fisiológico das espécies de leveduras isoladas de flores de <i>Heliconia psittacorum</i>	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Localização do Parque Estadual do Jalapão, Tocantins	20
Figura 2	Cachoeira da Formiga, Parque Estadual do Jalapão – TO	24
Figura 3	Flor de <i>Heliconia psittacorum</i>	25
Figura 4	Filogenia de <i>Candida</i> sp. 1 baseada no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. A árvore foi construída pelo método “neighbour-joining”, com bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergências na seqüência.	35
Figura 5	Filogenia de <i>Candida</i> sp. 2 e <i>Candida</i> sp. 3 baseada no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. A árvore foi construída pelo método “neighbour-joining”, com bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergências na seqüência.	36
Figura 6	Filogenia de <i>Candida</i> sp. 4 baseada no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. A árvore foi construída pelo método “neighbour-joining”, com bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergências na seqüência.	37
Figura 7	Filogenia de <i>Cryptococcus</i> sp. 1 baseada no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. A árvore foi construída pelo método “neighbour-joining”, com bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergências na seqüência.	38
Figura 8	Colônias de <i>Pseudozyma hubeiensis</i> após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	63
Figura 9	Células de <i>Pseudozyma hubeiensis</i> após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	63
Figura 10	Colônias de <i>Pseudozyma</i> sp. (JCC 207) após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	65
Figura 11	Células de <i>Pseudozyma</i> sp. (JCC 207) após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	65
Figura 12	Colônias de <i>Pseudozyma antarctica</i> após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	67
Figura 13	Células de <i>Pseudozyma antarctica</i> após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	67
Figura 14	Colônias de <i>Cryptococcus laurentii</i> após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	69
Figura 15	Células de <i>Cryptococcus laurentii</i> após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	69
Figura 16	Colônias de <i>Cryptococcus flavescens</i> após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	71
Figura 17	Células de <i>Cryptococcus flavescens</i> após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	71
Figura 18	Colônias de <i>Cryptococcus</i> sp. após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	73
Figura 19	Células de <i>Cryptococcus</i> sp. após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	73
Figura 20	Colônias de <i>Aureobasidium pullulans</i> após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	75
Figura 21	Células de <i>Aureobasidium pullulans</i> após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	75
Figura 22	Colônias de <i>Hyponectria</i> sp. após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20° C	77
Figura 23	Células de <i>Hyponectria</i> sp. após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20° C	77
Figura 24	Colônias de <i>Candida floscolorum</i> após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	79
Figura 25	Células de <i>Candida floscolorum</i> após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	79
Figura 26	Colônias de <i>Candida intermedia</i> após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	81
Figura 27	Células de <i>Candida intermedia</i> após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	81

Figura 28	Colônias de “ <i>Candida nymphaea</i> ” após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	83
Figura 29	Células de “ <i>Candida nymphaea</i> ” após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	83
Figura 30	Colônias de <i>Cryptococcus</i> sp.1 após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	85
Figura 31	Células de <i>Cryptococcus</i> sp.1 após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	85
Figura 32	Colônias de <i>Candida</i> sp.1 após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	87
Figura 33	Células isoladas e conjugadas de <i>Candida</i> sp. 1 após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	87
Figura 34	Impressão digital (PCR fingerprinting) com o iniciador (GTG) ₅ de sete isolados de <i>Candida</i> sp. 1.	87
Figura 35	Colônias de <i>Candida</i> sp.2 após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	89
Figura 36	Células de <i>Candida</i> sp.2 após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	89
Figura 37	Impressão digital (PCR fingerprinting) com o iniciador (GTG) ₅ de cinco isolados de <i>Candida</i> sp. 2.	89
Figura 38	Colônias de <i>Candida</i> sp.3 após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	91
Figura 39	Células de <i>Candida</i> sp.3 após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	91
Figura 40	Impressão digital (PCR fingerprinting) com o iniciador (GTG) ₅ de três isolados de <i>Candida</i> sp. 3.	91
Figura 41	Colônias de <i>Candida</i> sp. 4 após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	93
Figura 42	Células de <i>Candida</i> sp. 4 após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	93
Figura 43	Colônias de <i>Pichia fermentans</i> após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	95
Figura 44	Células de <i>Pichia fermentans</i> após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	95
Figura 45	Colônias de <i>Sporisorium</i> spp. 1, em agar YM, após 5 dias de crescimento, à 20°C	97
Figura 46	Células de <i>Sporisorium</i> spp. 1, em agar YM, após 5 dias de crescimento, à 20°C	97
Figura 47	Colônias de <i>Sporisorium</i> spp. 2 após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	99
Figura 48	Células de <i>Sporisorium</i> spp. 2 após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	99
Figura 49	Colônias de <i>Sporisorium</i> spp. 3 após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	101
Figura 50	Células de <i>Sporisorium</i> spp. 3 após 5 dias de crescimento em agar YM, à 20°C	101

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo caracterizar a comunidade de leveduras que coloniza as flores de *Heliconia psittacorum* (Heliconiaceae). As flores foram coletadas próximas a Cachoeira da Formiga, que se localiza no Parque Estadual do Jalapão (estado do Tocantins), uma das maiores reservas do bioma Cerrado no Brasil. Vinte e cinco flores de *H. psittacorum* foram coletadas, sendo obtidos 229 isolados de leveduras. Os isolados foram agrupados de acordo com o perfil fisiológico e molecular. Um isolado de cada grupo foi submetido ao sequenciamento da região gênica D1/D2 do gene do rRNA. As leveduras foram identificadas como pertencentes a 20 espécies, sendo nove espécies de ascomicetos e onze de basidiomicetos. O gênero mais freqüente foi *Candida*, com 50,64% do total de isolados, sendo *Candida flosculorum* a espécie com o maior número de isolados. Essa espécie parece estar intimamente relacionada com flores de *Heliconia*, uma vez que já foi isolada em estudos com outras duas espécies desse gênero de planta. Quatro espécies novas de leveduras foram encontradas. *Candida* sp. 1 pertence ao clado *Wickerhamiella*, sendo filogeneticamente próxima de *C. drosophilae* e de *C. japonensis*. *Candida* sp. 2 é uma espécie basal no clado *Metchnikowia*, sendo filogeneticamente próxima de *C. saopaulonensis*. *Candida* sp. 3 é filogeneticamente próxima de *C. asparagi* com a qual forma um clado juntamente com *C. fructus*. *Candida* sp. 4 pertence ao clado das *Wickerhamomyces*, sendo filogeneticamente próxima de *Wickerhamomyces pijperi*. Duas outras espécies, *Cryptococcus* sp. (sequencia das regiões D1/D2 e ITS do rRNA idênticas a linhagem CBS 8369, número de acesso no Genbank AF444705) e "*Candida nymphaea*" (sequencia das regiões D1/D2 e ITS do rRNA idênticas a linhagem 05-7-186T, número de acesso no GenBank FJ537069), já foram isoladas de outras plantas, porém ainda não foram descritas. A comunidade de leveduras isolada de flores de *H. psittacorum* apresenta um amplo perfil fisiológico, com a assimilação de uma grande variedade de fontes de carbono e com a predominância de espécies osmotolerantes, o que pode estar relacionado com a alta concentração de açúcares nos nectários. Muitas espécies dessa comunidade de leveduras

utilizam nitrato e nitrito como única fonte de nitrogênio e poucas são capazes de fermentar glicose e crescer à 37°C. A comunidade de leveduras associada com *H. psittacorum* apresentou alto índice de diversidade, com um valor muito parecido com aquele encontrado para a comunidade de leveduras de flores de *H. velloziana* provenientes de fragmentos de Mata Atlântica. O presente trabalho mostra que flores do bioma Cerrado podem constituir uma rica fonte de novas espécies de leveduras. Mais estudos são necessários para a melhor caracterização das comunidades que colonizam esses habitats efêmeros.

ABSTRACT

This study aimed to characterize the yeast community colonizing *Heliconia psittacorum* (Heliconiaceae) flowers. These flowers were collected near Formiga waterfall, located at the Parque Estadual do Jalapão (state of Tocantins), one of the largest Cerrado reserves in Brazil. Twenty-five flowers of *H. psittacorum* were collected and 229 yeast isolates were obtained. These isolates were grouped according to physiological and molecular profile. One isolate from each group was subjected to gene sequencing of the D1/D2 region of rRNA gene. The yeasts were identified as belonging to 20 species, nine ascomycetes species and eleven basidiomycetes. The genus *Candida* was the most frequent, with 50.64% of total isolates and *Candida floscolorum* was the specie with the largest number of isolates. This specie seems to be closely related to flowers of *Heliconia*, as has already been isolated in studies with two other species of this plant genus. Four new species of yeasts were found. *Candida* sp. belongs to *Wickerhamiella* clade, being phylogenetically close to *C. drosophilae* and *C. jalaponensis*. *Candida* sp. 2 is a basal species in *Metchnikowia* clade and is phylogenetically close to *C. saopaulonensis*. *Candida* sp. 3 is phylogenetically close to *C. asparagi* and forms a clade together with *C. fructus*. *Candida* sp. 4 belongs to *Wickerhamomyces* clade and is phylogenetically close to *Wickerhamomyces piperi*. Two other species, *Cryptococcus* sp. (Sequence of the D1/D2 and ITS regions of rRNA identical strain CBS 8369, in Genbank access number AF444705) and "*Candida nymphea*" (sequence of the D1/D2 and ITS regions of rRNA identical 05-7 llinhagem-186T, GenBank access number FJ537069) have been isolated from other plants, but have not been described yet. The yeast community isolated from *H. psittacorum* flowers presents a comprehensive physiological profile, with the assimilation of a wide variety of carbon sources and with the predominance of osmotolerant species, which may be related to the high concentration of sugars in the nectaries. Many species of yeast community use nitrate and nitrite as sole nitrogen source and few are able to ferment glucose and grow at 37°C. The yeast community associated with *H. psittacorum* showed

high diversity index, with a very similar value to that found for the yeast community of *H. velloziana* flowers from Mata Atlântica fragments. This study shows that flowers of Cerrado biome can be a rich source of new yeast species. More studies are needed to better characterize the communities colonizing these ephemeral habitats.

