

## PROSPECTANDO A BIODIVERSIDADE DE FUNGOS QUE PODEM BENEFICIAR O REFLORESTAMENTO DE APPS EM ÁREAS DE MATA ATLÂNTICA

Erika Cinthia da Silva<sup>1</sup>, Laury Cullen Junior<sup>2</sup>, Tatiane C. Rech-Fernandes<sup>3</sup>, Emerson Viveiros<sup>4</sup>, Pedro M. Pedro<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Bióloga, Mestranda, ESCAS - Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (erikamogi@hotmail.com); <sup>2</sup>Engenheiro Florestal, Ph.D., Pesquisador em Biodiversidade, Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (laurycullen@gmail.com); <sup>3</sup> Analista de Meio Ambiente, AES Tietê (tatiane.rech@aes.com); <sup>4</sup> Engenheiro de Meio Ambiente, AES Tietê (emerson.viveiros@aes.com); <sup>5</sup>Biólogo, Ph.D., Pesquisador em Biodiversidade, Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (pedrosquared@gmail.com)

APRESENTADO NO IV CBRA - CONGRESSO BRASILEIRO DE REFLORESTAMENTO AMBIENTAL – 19 A 21 DE OUTUBRO DE 2016, RIO DE JANEIRO/RJ.

**Resumo:** Durante as últimas décadas, a Mata Atlântica sofreu desmatamento intensivo devido à expansão urbana e práticas agrícolas intensivas. As consequências destas perturbações incluem assoreamento e lixiviação de nutrientes em corpos de água adjacentes. Estes são de particular interesse para empresas de geração de energia hidrelétrica, já que ambos contribuem para aumento do custo de geração de energia. A estratégia mais adotada para mitigar esses problemas é o plantio de matas ciliares ao longo dos córregos, rios e reservatórios. Como parte de um projeto que visa a utilização de tecnologias metagenéticas em benefício de várias questões relacionadas com a geração de energia hidrelétrica, estamos investigando o potencial dos fungos autóctonos no solo que possam indicar as áreas mais adequadas para o reflorestamento na região de Promissão, SP. Para testar isso, identificamos uma área de reflorestamento onde parte das mudas plantadas foram estabelecidas com sucesso, enquanto uma outra área exigiu um esforço e custo considerável para se estabelecer. Descreve-se aqui as espécies que se encontram no solo e identificamos uma significativa elevada quantidade de *Yarrowia lipolytica* que foi previamente identificada como um catalizador de crescimento em plantas.

**Palavras-chave:** Restauração ecológica, pasto, solo, sequenciamento de última geração

### Introdução

Operadores de hidrelétricas têm um interesse particularmente forte na restauração de Áreas de Preservação Permanente (APPs), já que essas faixas de proteção impedem acúmulo de sedimentos e nutrientes nos reservatórios (BROADMEADOW & NISBET, 2004). O acúmulo gradual de sedimentos em um reservatório, por exemplo, reduz significativamente a vida útil da hidrelétrica. Embora menos óbvio, os nutrientes também levam a custos operacionais substanciais, uma vez que favorecem a proliferação de macrófitas, que prejudicam o funcionamento das turbinas. Por estas razões, os operadores consideram a restauração de APPs uma prioridade. Nossa pesquisa informará quais as áreas que são mais adequadas para o plantio de APPs com baixo custo e perspectiva de maior sucesso no seu desenvolvimento.

O foco final e principal do projeto envolve a avaliação e o grande potencial de microrganismos do solo e sua função no desenvolvimento de plantios de espécies nativas em projetos de restauração florestal, particularmente APPs. Este estudo tem sido desenvolvido dentro de parcelas de reflorestamento com aproximadamente 10 meses de idade na região de Promissão, São Paulo. A coleta inicial para o sequenciamento de DNA do solo ocorreu em uma área peninsular em Mendonça, SP. Este plantio inicialmente atraiu a nossa atenção porque mostrou um padrão muito heterogêneo de crescimento de mudas, com algumas manchas de solo contendo árvores aparentemente saudáveis e bem desenvolvidas, enquanto outras tiveram plantios iniciais sem sucesso, mesmo depois de várias tentativas de replantios e manutenção. Embora este padrão pode ser devido a outras variáveis (química do solo, bactérias e outros agentes patogênicos, etc.), optamos por avaliar se a presença de certos fungos influencia padrões observados no desenvolvimento das plantas, porque estes organismos conferem benefícios extremamente importantes para as raízes de plantas, particularmente no início do desenvolvimento (MEDINA ET AL., 2004).

### Material e Métodos

Amostras de solo foram recuperadas de um homogeneizado de 8 sub-amostras colhidas em cada um dos 18 locais usando um trado (Figura 1). Para diminuir o impacto de insumos nas análises, coletas foram feitas entre

linhas plantadas e em áreas com mínima vegetação. As amostras foram conservadas em álcool até a extração de DNA utilizando o kit de isolamento de DNA PowerSoil (MO-BIO) de acordo com as instruções do fabricante.

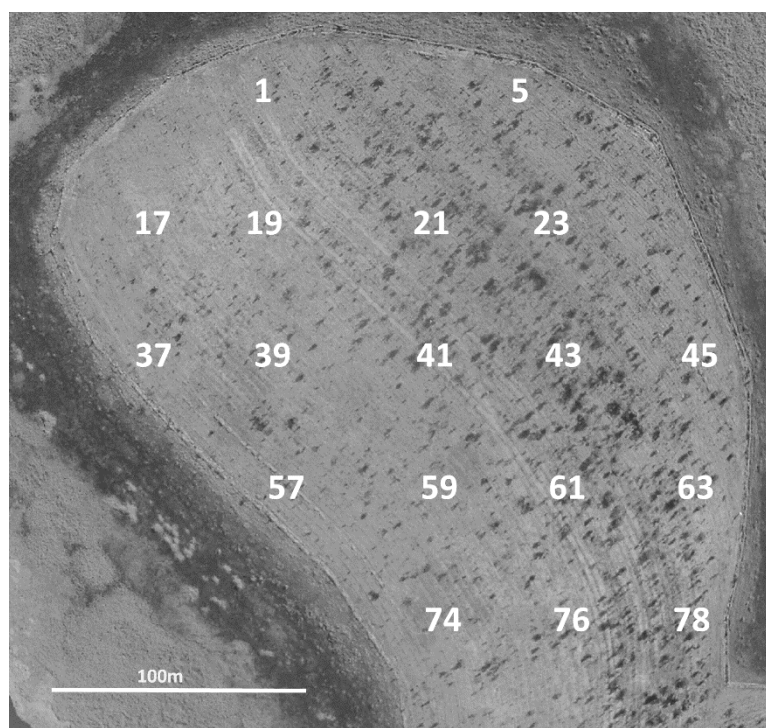


Figura 1: Local de coleta de solo em região de Promissão, SP. Note uma faixa longitudinal que atravessa pontos 1, 21, 43, e 63 e contém árvores mais desenvolvidas.

O DNA extraído foi utilizado em reações de PCRs “nested” realizadas utilizando o conjunto de primers específicos para fungos e seguindo os parâmetros de TOJU *ET AL.* (2012). O produto do PCR resultante foi purificado e sequenciado em plataforma 454 GS FLX (Macrogen, Coreia do Sul).

O programa USEARCH v.1861.01.08 (EDGAR, 2010) foi utilizado para identificar quimeras e agrupar seqüências filtradas por qualidade, como no *pipeline* genérico para 454 descrito pelo autor ([http://drive5.com/usearch/manual/upp\\_454.html](http://drive5.com/usearch/manual/upp_454.html)). Um corte de similaridade de *Operational Taxonomic Units* (OTUs) de 97% foi adotado para o agrupamento de seqüências. Os resultantes OTUs foram atribuídos a táxons fúngais utilizando o banco de dados Fasta do UNITE (sh\_general\_release\_dynamic\_s\_01.08.2015).

O conjunto de comandos no MOTHUR v.1.36.1 (SCHLOSS *ET AL.*, 2009) foi usado para derivar as estimativas de diversidade Beta; ambos *Community Membership* e *Community Structure*. Este último foi expresso como índices entre as 18 coleções com a função *dist.shared* para calcular Bray-Curtis (usando o comando *braycurtis* em MOTHUR) distância euclidiana (*structeuclidean*) e usando comparações entre OTUs à base de filogenia como UNIFRAC (*unifrac.weighted*). Os cálculos de *Community Membership* usaram o índice de Jaccard (*jclass*) e distância euclidiana (*memeuclidean*), bem como a UNIFRAC (*unifrac.unweighted*). Análises de autocorrelação entre as distâncias de diversidades Beta e distâncias geográficas entre pontos de coleta foram calculadas usando testes de Mantel, também com MOTHUR.

## Resultados e Discussão

Todos os índices de diversidade foram altamente correlacionados com distância entre os pontos exceto a diversidade *structeuclidean* (Tabela 1). Isto sugere que dentro do plantio estudado, com dimensões de aproximadamente 200-m x 160-m, existem agregações de comunidades fúngais. Ou seja, os fungos não são aleatoriamente distribuídos pela área do plantio.

A Tabela 2 descreve os 17 táxons de fungos encontrados com maior frequência nesta pesquisa. *Cladosporium halotolerans* foi o táxon encontrado na maioria dos pontos amostrados. A segunda espécie mais comum foi *Yarrowia lipolytica*, que foi encontrada em pontos 5, 21, 23, 41, 43, 45, e 61. Embora difícil de testar estatisticamente com o número limitado de amostras, existe uma aparente sobreposição entre a presença de *Y. lipolytica* a as áreas melhormente desenvolvidas na Figura 1.

Tabela 1: Significado estatístico de permutações de autocorrelação entre matrizes de distância espacial e de diversidade Beta entre os 18 quadrantes amostrados na pesquisa.

	<i>Correlation</i>	<i>p-value</i>
<i>Community membership</i>		
<i>jclass:</i>	0.247	<b>&lt;0.001</b>
<i>memeuclidean:</i>	0.237	<b>0.004</b>
<i>unweighted</i>	0.217	<b>0.002</b>
<i>Community structure</i>		
<i>Bray-Curtis:</i>	0.208	<b>0.007</b>
<i>strueteuclidean:</i>	0.077	0.157
<i>weighted</i>	0.146	<b>0.042</b>

Tabela 2: Táxons de fungos que foram amostrados com frequência de mais de 1%. As identidades foram derivadas por comparação com a base de dados da UNITE (<https://unite.ut.ee/repository.php>).

Espécie UNITE	Localização																	
	1	5	17	19	21	23	37	39	41	43	45	57	59	61	63	74	76	78
Cladosporium_halotolerans	316	1204	948	691	807	18	420	307	729	785	20	1057	0	842	504	0	62	9
Yarrowia_lipolytica	0	1849	0	0	330	25	0	0	2358	1993	29	0	0	1013	0	0	0	0
Candida_etchellsii	239	361	0	0	7	0	2033	17	0	189	5	0	0	85	0	0	0	0
Lophodermium_sp	265	76	0	0	0	44	0	21	0	0	609	0	0	1	494	336	532	227
Candida_parapsilosis	31	109	0	0	158	15	166	0	42	73	0	0	934	27	0	484	6	3
Penicillium_melinii	17	0	0	0	625	87	0	257	0	0	53	0	0	566	29	7	49	194
Aspergillus_sp_DY115_21_8_M4	7	0	90	76	0	430	161	308	34	26	0	369	211	42	0	62	26	3
Alternaria_sp	7	0	0	0	0	0	0	222	0	0	0	0	0	39	0	1407	12	2
Candida_galli	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1181	0	0
Walleimia_sebi	1	7	968	0	7	2	0	1	2	29	0	21	0	1	0	0	3	0
Candida_neustonensis	0	0	82	388	70	0	30	4	57	16	0	0	18	19	1	46	0	1
Monascella_botryosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	703
Candida_haemulonis	0	0	0	0	223	54	0	75	343	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Yamadazyma_triangularis	2	0	18	16	26	0	8	0	2	551	0	0	36	33	0	0	0	0
Rhodotorula_mucilaginoso	2	0	173	49	0	80	0	4	9	78	0	0	289	0	0	0	0	0
Chaetomium_sp	153	5	0	0	0	0	268	3	0	0	0	0	0	0	47	0	2	22
Stagonospora_sp_AX113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	470	0	0	0	0	0	0

Além dos táxons listados na Tabela 2, vários membros do filo Glomeromycota também foram encontrados, estes em quantidades significativamente menores (menos de 0.1 % do total das sequências; Tabela 3). Glomeromycota é principalmente composta por fungos micorrizas, que são associados a benefícios para plantas. Contudo, a distribuição destas espécies não foi correlacionada com áreas de bom desenvolvimento de mudas.

Tabela 3: Táxons identificados de amostras de solo pertencendo ao filo Glomeromycota.

Glomus_sp_10_SUN_2011 c_Glomeromycetes;o_Glomerales;f_Glomeraceae;g_Glomus;s_Glomus_sp_10_SUN_201	N. de sequências	4
Entrophospora_sp c_Glomeromycetes;o_Diversisporales;f_Acaulosporaceae;g_Entrophospora;s_Entrophospora_sp		4
Rhizophagus_intraradices c_Glomeromycetes;o_Glomerales;f_Glomeraceae;g_Rhizophagus;s_Rhizophagus_intraradi		3
Funneliformis_sp c_Glomeromycetes;o_Glomerales;f_Glomeraceae;g_Funneliformis;s_Funneliformis_sp		2
Entrophospora_sp c_Glomeromycetes;o_Diversisporales;f_Acaulosporaceae;g_Entrophospora;s_Entrophospora_sp		31
Entrophospora_sp c_Glomeromycetes;o_Diversisporales;f_Acaulosporaceae;g_Entrophospora;s_Entrophospora_sp		46

## Conclusão

Embora a maioria dos esforços para melhorar o desenvolvimento da planta vis-à-vis fungos tem sido através da inoculação com fungos exógenos (principalmente micorrizas vendidas comercialmente), procuramos avaliar

a possibilidade de que outros táxons (naturalmente presentes no solo) também podem contribuir para plantas em desenvolvimento.

Nossos resultados mostram uma elevada correlação entre a diversidade Beta de amostras de solo e a distância da amostragem. Este fato não só é um importante indicador que sugere que há agregação de comunidades de fungos em distâncias intermédias (entre ~ 35 e 150 metros). Esta pode ser uma consideração importante na amostragem de projetos de trabalhos futuros com as comunidades de fungos em pastagens.

Este estudo aumenta consideravelmente o conhecimento das espécies de fungos presentes em pastos neotropicais dominadas por *Brachiaria* spp. Embora se saiba que o solo é um ambiente microbiano extremamente diversificado (VITAL ET AL., 2002), acreditamos que exista um padrão que ocorre amplamente no Brasil em pastos incultos, onde ocorre a maioria dos esforços de reflorestamento. Além disso, as contribuições adicionais a nossos trabalhos por outros pesquisadores delinearão ainda mais os táxons pertinentes que se correlacionam com o eventual sucesso dos plantios. Esta pode tornar-se uma importante ferramenta para a identificação dos locais mais viáveis para a implantação de APPs.

Uma espécie (*Yarrowia lipolytica*) mostrou um potencial bastante promissor como um catalizador do bom desenvolvimento das mudas plantadas. Curiosamente, esta espécie de fungo foi previamente descrita na literatura como um co-fator no desenvolvimento de plantas, principalmente porque solubiliza fósforo mineral. Em estudos recentes, *Y. lipolytica* foi descrita como um organismo auxiliar no desempenho do fungo micorrízico arbuscular, resultando no aumento do crescimento vegetal e na absorção de fósforo (VASSILEV ET AL., 2001).

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem o generoso patrocínio da pesquisa pela AES Tietê Energia S/A através do programa P&D da ANEEL- Agência Nacional de Energia Elétrica (projeto número 0064-1035/2014). Gostaríamos também de citar o apoio incondicional da equipe de campo da AES-Tietê, particularmente Alan Labos. Finalmente agradecemos a colaboração e interminável paciência da Maria Helena Matté, Miriam Silva e Milena Dropa, do laboratório de Saúde Pública-USP.

### **Referências Bibliográficas**

BROADMEADOW S.; NISBET T. The effects of riparian forest management on the freshwater environment: a literature review of best management practice. *Hydrology and Earth System Sciences*. V.8(3) p.286-305, 2004.

EDGAR, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, *Bioinformatics* v.26(19), p.2460-2461, 2010.

MEDINA, A. ET AL. Increase plant growth 'nutrient uptake' and soil enzymatic activities in a desertified Mediterranean soil amended with treated residues and inoculated with native mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting yeast. *Soil Science* 169, p.260-270, 2004.

OLIVEIRA, P.H.S. Análise fisiológica e cinética do crescimento da levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em diferentes fontes de carbono. São Paulo, 2014. 123p.

SCHLOSS, P.D., ET AL. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. v.75(23), p.7537-41, 2009.

TOJU, H.; TANABE, A. S.; YAMAMOTO, S. & SATO, H. High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. v.7(7), 2012.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; AZCON, R.; MEDINA, A. Application of free and Ca-alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil-plant system. *Journal of Biotechnology*. 91, p.237-242, 2001.

VITAL, M.J.S. ET AL. Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá Ecological Station, Roraima- Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33, p.230-235, 2002.

ZINJARDE S.; APTE M.; MOHITE P.; KUMAR A. *Yarrowia lipolytica* and pollutants: Interactions and applications. *Biotechnology Advances*. v.32 (5), p.920-933, 2014.