

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

Tese de Doutorado

**DIVERSIDADE E TAXONOMIA DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A
FITOTELMOS EM ÁREAS DE CERRADO NOS ESTADOS DO TOCANTINS E
MINAS GERAIS**

Francisca Maria Pinheiro de Sousa

Belo Horizonte
2015

Francisca Maria Pinheiro de Sousa

**DIVERSIDADE E TAXONOMIA DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A
FITOTELMOS EM ÁREAS DE CERRADOS NOS ESTADOS DO TOCANTINS
E MINAS GERAIS**

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Carlos Augusto Rosa - Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG

Co-orientadora: Profa. Paula Benevides de Moraes – Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia – Universidade Federal do Tocantins (UFT)

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

2015

“Todos nós temos o direito de escolher o que vamos fazer com as lições que a vida nos oferece. Mas, sem dúvida, se recusarmos o desafio de compreendê-las e assimilá-las, essas mesmas lições voltarão revestidas em novas embalagens.”

(Hammed)

A minha mãe e irmãos, por todo o sempre!

AGRADECIMENTOS

Agradeço Deus por conceder o dom da Vida, e com tão grandiosa Bondade me concedeu também forças para seguir e concluir este trabalho;

À minha Mãe e irmãos por todo amor incondicional, por me ajudar a suportar e encarar meus problemas. A minha mãe por ser a melhor e fazer tão imenso sacrifício para realizações dos meus sonhos... sou grata a vocês;

Ao Prof. Carlos Rosa, por me receber e acreditar em mim, pela oportunidade de trabalho, e por todos os ensinamentos;

À Profa. Paula Benevides, pela co-orientação concedida, se fazendo presente sempre que gritei por 'socorro', obrigada bem especial por incentivar me na pesquisa;

À Dra Raquel Cadete e Profa. Fátima Gomes por todas as contribuições dadas a este trabalho, desde o exame de qualificação, e por aceitarem participar novamente como membros da banca examinadora. Aos demais membros da banca, professores Dr. Aristóteles Góes-Neto, Dra. Denise Scoaris, Dra. Vera Lúcia e Dra. Carla Pataro por aceitarem o convite para avaliar este trabalho;

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Microbiologia pelo apoio acadêmico e institucional, e ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro;

A Amaraína pela ajuda nas coletas e no Lambio e por sua amizade; e ao Sr. Alberico por me guiar e me ajudar bastante nas coletas do Tocantins;

Aos amigos do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, pelos companheirismo, amizades e ensinamentos. Em especial às 'carangues' (Luciana, Lela, Valéria, Bia, Carla Pataro, Vivi e Jandora) e as 'curicas' (Mari Zé, Camila Carvalho, Larissa, Alice, Ana Raquel, Bárbara, Isabel, Camila G., Camilinha, Denise, Iara, Jordana, Laura, Letícia, Lília, Maroca, Mona, Quel, Renatinha, Sil, Soraia), pois foram 'n' momentos que me socorreram por eu estar 'só' aqui; no entanto peço licença para citar: Lu, Lela, Carla, Valéria, Cãããmila, Vivi, Té, Zé, Bárbara e Cris, meninas vocês foram imprescindível para minha permanência, tanto no âmbito profissional como pessoal.

Aos amigos do Lambio, Cris, Fabrícia, Amaraína, Vivianny, Dayane, Deusiano, Laci, Camilla... a ajuda de vocês sempre que estive aí foram fundamentais;

A dona Filó e sua família, por inúmeras vezes ter feito este papel de viver em família. E também a Bruna e Luíza pelo convívio diário, muito obrigada;

Aos meus amigos Nayana, Weilan, Thiago G., Denise, Laci, Danilo, Amaraína, Anelise, Cris Coelho, Dayane, Fabrícia, Bruna, Ledice, Jú Porto, Roberta, Nati, Ritty e Jefferson, Letícia, Katyane (Djulli), Euklécio, Cleane, Adaíres, Winícius, Flávia e Franklin, que são imprescindível e além disso, souberam entender minha ausência, e sempre me deram forças para que eu continuasse nesta jornada;

Aos amigos, “metadinha do CIAMB” que foram inúmeras vezes que me socorreram nos momentos de desesperos: Jú Corgozinho, Gabi, Eduardo, Carlos Eduardo, meu muito obrigada sempre;

Agradeço a todos os professores do programa de Microbiologia, pelos conhecimentos passados;

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu muito obrigada.

“Hoje quero agradecer!

A você, que estive ao meu lado nas horas que chorei e nas horas que sorri, nas horas que me lamentei e nas horas e que de uma forma ou de outra demonstrei total alegria...

Agradecer pelo sorriso diário, sem mágoas nem rancores, agradecer de peito aberto, de alma explosiva...

Hoje quero parar e agradecer, porque você fez, faz e fará sempre parte de minha história!”

(Autor desconhecido)

SUMÁRIO

LISTAS DE TABELAS	i
LISTAS DE FIGURAS	ii
LISTA DE ANEXOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 – INTRODUÇÃO	8
1.1 - Leveduras	8
1.1.1 – Definição.....	8
1.1.2 – Identificação de Leveduras.....	9
1.1.3 – Ecologia de Leveduras	13
1.2 – Leveduras Associadas aos Fitotelmos	16
1.3 – A família Bromeliaceae	18
1.4 – A família Eriocaulaceae	19
2. – JUSTIFICATIVA	22
3 – OBJETIVOS	23
3.1 – Geral	23
3.2 – Específicos	23
4 – MATERIAIS e MÉTODOS	24
4.1 – Áreas de coletas.....	24
4.1.1 – Tocantins - Município de Aurora do Tocantins.....	24
4.1.2 – Minas Gerais – Serra do Cipó.....	25
4.2 – Coletas dos fitotelmos e isolamento das leveduras.....	26
4.3 – Identificação das leveduras	28
4.3.1 – Extração de DNA	28
4.3.2 – PCR <i>fingerprinting</i> com iniciador EI1	29
4.3.3 – Amplificação utilizando iniciadores NL1, NL4, ITS1 e ITS4.....	30
4.3.4 – Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento.....	31
4.3.5 – Análise das sequências	32
4.4 – Análise estatísticas	33
5 – RESULTADOS e DISCUSSÃO	34
5.1 – Identificação e diversidade das leveduras isoladas dos fitotelmos.....	34
5.2 – Densidade populacional das leveduras	48

5.3 – Espécies novas.....	50
6. – CONCLUSÕES	61
7. – REFERÊNCIAS.....	62
8. – ANEXOS	73

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1– Identificação e ocorrências das leveduras nos fitotelmos amostrados de *Bromelia karatas* e *Encholirium* sp. no estado do Tocantins e *Paepalanthus bromelioides* e *Vriesea minarum* no estado de Minas Gerais. 35
- Tabela 2. Número de espécies exclusivas e total de leveduras de cada comunidade de cada fitotelmo estudado e compartilhamento de espécies entre duas ou mais comunidades. 41
- Tabela 3 – Diversidade beta de Whittaker (B_w) para as comunidades encontradas nos quatro fitotelmos. 43

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1 – Localização do estado do Tocantins, com destaque para o município de Aurora do Tocantins, localizada no sudeste do estado. 24
- Figura 2 – Localização do estado de Minas Gerais, com destaque para a Serra do Cipó, localizado no centro do estado. 26
- Figura 3 – Imagens dos fitotelmos coletados. a) – *Bromelia karatas*; b) – *Encholirium* sp.; c) – *Paepalanthus bromelioides*; e d) *Vriesea minarum*. 27
- Figura 4 – Diagrama de Venn mostrando o número total de espécies de leveduras e o compartilhamento entre comunidades dos fitotelmos 42
- Figura 5. – Dendrograma a partir da (a) diversidade beta de Whittaker (Bw) com algoritmo de agrupamento UPGMA e (b) índice de similaridade de Bray-Curtis com algoritmo de agrupamento Paired Group. 44
- Figura 6. Padrão de distribuição da abundância das espécies de leveduras associadas com fitotelmos (*Bromelia karatas*, *Encholirium* sp., *Paepalanthus bromelioides*, e *Vriesea minarum*) 46
- Figura 7. Curva de acumulação de espécies usando a curva de rarefação de indivíduo e extrapolação de riqueza (S_p). 47
- Figura 8 – Densidade populacional, em log de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por volume (mL) de água dos fitotelmos, das espécies de leveduras identificadas em *B. karatas*, coletadas no Município de Aurora do Tocantins. 48
- Figura 9 – Densidade populacional, em log de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por volume (mL) de água dos fitotelmos, das espécies de leveduras identificadas em *Encholirium* sp., coletadas no Município de Aurora do Tocantins. 48
- Figura 10 – Densidade populacional, em log de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por volume (mL) de água dos fitotelmos, das espécies de leveduras identificadas nos fitotelmos de *Paepalanthus bromelioides*, coletadas na Serra do Cipó. 49
- Figura 11– Densidade populacional, em log de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por volume (mL) de água dos fitotelmos, das espécies de leveduras identificadas nos fitotelmos de *Vriesea minarum*, coletadas na Serra do Cipó 49

Figura 12 – Árvore filogenética da espécie *Candida* sp.1 construída pelo método de “neighbor-joining” baseado no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. Foi utilizado um bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergência na sequência. 51

Figura 13: Árvore filogenética da espécie *Candida* sp.2 construída pelo método de “neighbor-joining” baseado no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. Foi utilizado um bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergência na sequência. 52

Figura 14: Árvore filogenética da espécie *Candida* sp.3 construída pelo método de “neighbor-joining” baseado no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. Foi utilizado um bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergência na sequência. 53

Figura 15: Árvore filogenética da espécie *Cryptococcus* sp. 1 construída pelo método de “neighbor-joining” baseado no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. Foi utilizado um bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergência na sequência. 54

Figura 16: Árvore filogenética da espécie *Cryptococcus* sp. 2 construída pelo método de “neighbor-joining” baseado no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. Foi utilizado um bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergência na sequência. 56

Figura 17: Árvore filogenética da espécie *Pichia* sp. construída pelo método de “neighbor-joining” baseado no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. Foi utilizado um bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergência na sequência. 56

Figura 18: Árvore filogenética da espécie *Pseudozyma* sp. construída pelo método de “neighbor-joining” baseado no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. Foi utilizado um bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergência na sequência. 57

Figura 19: Árvore filogenética da espécie *Tremella* sp. construída pelo método de “neighbor-joining” baseado no sequenciamento da região D1/D2 no gene do Rrna. Foi utilizado um bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergência na sequência. 57

Figura 20 – Árvore filogenética usando o método Maximum Likelihood obtida das sequências combinadas da região SSU e domínio D1/D2 da LSU do gene

rRNA de *H. aurorensis* sp. nov. (SOUSA et al., 2014). Valores de bootstrap >50% ou mais são mostrados.

59

LISTA DE ANEXOS

Anexo I – *Hannaella pagnoccae* sp. nov., a tremellaceous yeast species isolated from plants and soil.

Anexo II – *Hagleromyces* gen. nov., a yeast genus in the Saccharomycetaceae, and description of *Hagleromyces aurorensis* sp. nov., isolated from water tanks of bromeliads.

RESUMO

Os fitotelmos são cavidades com água acumulada em alguma parte da planta e são usados por uma gama de organismos na busca por recursos alimentares ou como habitat e refúgio. As plantas que mais frequentemente formam fitotelmos pertencem principalmente à família Bromeliaceae. Contudo, outras plantas, como espécies do gênero *Paepalanthus*, também são capazes de formar estas estruturas. A ecologia de leveduras associadas aos fitotelmos é pouco estudada. Embora estudos de leveduras isoladas nos fitotelmos de bromélias já sejam desenvolvidos há mais de uma década, pesquisas que incluem a diversidade destes micro-organismos ainda são escassas. A maioria dos estudos acerca de leveduras associadas a estes ambientes é voltada para a descoberta de novas espécies. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a distribuição e a diversidade de leveduras associadas à fitotelmos em áreas de Cerrados nos estados de Tocantins (TO) e Minas Gerais (MG). Um total de 491 isolados de leveduras foi obtido, sendo 166 a partir de fitotelmos de *Bromelia karatas* e 94 isolados de *Encholirium* sp. em Aurora do Tocantins (TO); 137 isolados de *Paepalanthus bromelioides* e 94 isolados de *Vriesea minarum* na Serra do Cipó (MG). Quatro espécies de leveduras foram compartilhadas entre os quatros fitotelmos, sendo estas *Cryptococcus laurentii*, *Cr. nemorosus*, *Pseudozyma hubeiensis* e *Rhodotorula mucilaginosa*. As espécies *Anomalomyces yakirrae*, *Candida glabrata*, *C. orthopsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. pseudointermedia*, *Cr. heveanensis*, *Cr. laurentii*, *Cr. nemorosus*, *Meyrozyma guilliermondii* e *P. jejuensis* apresentaram maior frequência de ocorrência nos fitotelmos amostrados. No presente trabalho foram isoladas 13 possíveis espécies novas, sendo duas, *Hannaella pagnoccae* e *Hagleromyces aurorensis*, descritas durante a realização do estudo, sendo *Hagleromyces* um novo gênero descrito. Os resultados do presente trabalho mostraram que as comunidades de leveduras amostradas foram mais similares dentro de uma mesma região e, além disto, os fitotelmos representam uma rica fonte de novas espécies de leveduras.

Palavras chaves: Leveduras, fitotelmos, Bromeliaceae, *Paepalanthus*, espécies novas

ABSTRACT

Phytotelmata are water tanks accumulated in some part of the plant and are used by a range of organisms searching for food resources or as habitat and refuge. Plants that most often form phytotelmata mainly belong to *Bromeliaceae* family. However, other plants, such as *Paepalanthus* genus are also capable of forming such structures. The ecology of yeasts associated with phytotelmata is poorly studied. Although studies of yeasts isolated from bromeliad phytotelmata are already developed, researches that include diversity of these microorganisms are still scarce. Most of studies about yeasts associated with these environments are focused on discovery of new species. The aim of this study was to characterize the distribution and diversity of yeasts associated with phytotelmata, in areas of Cerrado in the states of Tocantins and Minas Gerais. A total of 491 yeast isolates were obtained, being 166 from *Bromelia karatas* phytotelmata and 94 isolates from *Encholirium* sp., in Aurora do Tocantins; 137 isolates from *Paepalanthus bromelioides* and 94 isolates from *Vriesea minarum* in Serra do Cipó. Four yeast species were shared among these phytotelmata, being *Cryptococcus laurentii*, *Cr. nemorosus*, *Pseudozyma hubeiensis* and *Rhodotorula mucilaginosa*. *Anomalomyces yakirrae*, *C. glabrata*, *C. orthopsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. pseudointermedia*, *Cr. heveanensis*, *Cr. laurentii*, *Cr. nemorosus*, *M. guilliermondii* and *P. jejuensis* presented higher frequency of isolation in the phytotelmata studied. Thirteen potential new species were found and two, *Hannaella pagnoccae* and *Hagleromyces aurorensis*, were described in this study, it is *Hagleromyces* a new descriptive genre. The present study showed that the yeast communities were more similar within the same region. The results showed that phytotelmata represent a rich source of new yeast species.

Key words: Yeasts, phytotelmata, Bromeliaceae, *Paepalanthus*, new species

1 – INTRODUÇÃO

8.3 – Leveduras

8.3.11 – Definição

As leveduras são micro-organismos pertencentes ao reino Fungi, presentes em dois filos caracterizados por diferentes modos de reprodução, que são os filos Ascomycota e Basidiomycota. As leveduras possuem características típicas de eucariotos, como presença de parede celular rígida, núcleo organizado com membrana nuclear, ausência de clorofila, nutrição heterotrófica por meio da absorção de nutrientes e ausência de motilidade (KURTZMAN et al., 2011).

As leveduras apresentam metabolismo aeróbio ou anaeróbio facultativo, o que as torna capazes de sobreviver em diferentes condições ambientais (AIDOO et al., 2006). O termo levedura está associado à capacidade fermentativa que este grupo de micro-organismo possui quando em contato com substratos ricos em açúcares (LOPES et al., 1998). Leveduras que possuem esta capacidade, como a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, são amplamente utilizadas em processos industriais na produção de diversos produtos (HIRASAWA et al., 2001).

Taxonomicamente, as leveduras são caracterizadas como fungos que se reproduzem principalmente assexuadamente, por fissão ou brotamento, e que não formam corpos de frutificação. Portanto, ocorre uma distinção imprecisa entre leveduras e fungos filamentosos dimórficos, que muitas vezes produzem abundantes células leveduriformes (KURTZMAN et al., 2011). Para leveduras ascomicéticas, estas distinções têm sido sustentadas por comparações moleculares, que mostram que as reproduções assexuadas por brotamento ou fissão são filogeneticamente distintas do ponto de vista evolutivo. A reprodução sexuada em leveduras ascomicéticas é caracterizada pela produção de ascósporos no interior das células em forma de saco (ascos) (BLACKWELL e SPATAFORA, 2004), que se desenvolve a partir da meiose de um núcleo diplóide (KURTZMAN et al., 2011). Tal estrutura não está contida em um corpo

de frutificação, ao contrário do que acontece com os fungos filamentosos (LACHANCE, 2011). O conhecimento do tipo de divisão celular, especialmente se bipolar ou por fissão, é um importante critério para a identificação das espécies (KURTZMAN et al., 2011). Para leveduras basidiomicéticas ocorre uma distinção semelhante, e estas são filogeneticamente separadas dos cogumelos e outros táxons que formam corpos de frutificação complexos. A reprodução sexuada em leveduras basidiomicéticas é caracterizada pela formação de basídios que produzem os basidiósporos (KURTZMAN et al., 2011).

1.1.2 – Identificação de Leveduras

Atualmente são conhecidos aproximadamente 153 gêneros e cerca de 1500 espécies de leveduras. A aplicação da análise de sequências dos genes ribossomais é a grande responsável pelo aumento do número de táxons (KURTZMAN et al., 2011). Estimativas indicam que apenas 1% das espécies de leveduras já foi descrita (KURTZMAN e FELL, 2006).

Anteriormente aos métodos moleculares, os isolados de leveduras provenientes de habitats naturais eram identificados por características morfológicas e fisiológicas (GOULIAMOVA et al., 2009; GARNER et al., 2010). Os métodos fisiológicos são importantes, pois podem caracterizar as propriedades metabólicas das espécies; essas propriedades metabólicas auxiliam, por exemplo, no entendimento de processos de uma infecção micótica, na compreensão das interações entre as leveduras nos diferentes habitats, no isolamento seletivo de grupos específicos de leveduras, e ainda com informações sobre possíveis aplicações biotecnológicas (KURTZMAN et al., 2011). No entanto, estes testes muitas vezes são inconclusivos, dificultando a identificação da espécie (SILVA et al., 2012). As características fenotípicas das espécies de leveduras são fundamentais e auxiliam a correlacioná-las com suas funcionalidades no ambiente (KURTZMAN et al., 2011).

As técnicas utilizadas na identificação de leveduras eram baseadas na morfologia da célula e nas diferentes reações por testes padronizados de fermentação e assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

Contudo, estes testes muitas vezes apresentavam resultados ambíguos devido à considerável variabilidade entre espécies e linhagens (FELL et al., 2000). Sendo assim, ocorreu uma busca por métodos que fornecessem identificações mais precisas, que representassem uma abordagem polifásica, incluindo análises fenotípicas e filogenéticas, para a obtenção de resultados de maior confiabilidade no estudo da ecologia e taxonomia de leveduras (KURTZMAN e ROBNETT, 2013).

O emprego de técnicas moleculares apresenta respostas mais adequadas para o estudo filogenético de leveduras (KURTZMAN et al., 2011). O advento de metodologias moleculares, mais rápidas e precisas, como o sequenciamento de regiões consideradas marcadoras filogenéticas, como por exemplo, a região dos domínios D1/D2 da subunidade maior (26S) do gene do rRNA presentes no genoma, vem permitindo a identificação de novas espécies de leveduras e uma melhor distinção, separação ou re-classificação das espécies existentes (KURTZMAN, 2006). Tais descobertas não invalidaram os estudos de ecologia de leveduras previamente realizados, no entanto, mostraram a necessidade de métodos mais precisos na identificação das espécies (LACHANCE, 2006). Torna-se necessária uma abordagem polifásica, incluindo análises fenotípicas e filogenéticas, para a obtenção de resultados de maior confiabilidade no estudo que envolva a identificação correta de leveduras (KURZTMAN e ROBNETT, 2013).

A análise de sequências dos genes do rRNA é hoje um dos métodos mais poderosos para a identificação de leveduras. Os grupos de pesquisadores pioneiros nesta área (KURTZMAN e ROBNETT, 1998; FELL et al. 2000) verificaram que a variação intra-específica da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA de leveduras ascomicéticas e basidiomicéticas eram, geralmente, de 0 a 2 nucleotídeos. Estes autores sugeriram que linhagens com três ou mais bases de diferença nesta região representavam espécies distintas. Kurtzman e Robnett (1998) verificaram que mais de três nucleotídeos diferentes nas sequencias desta região entre duas espécies de leveduras correspondia geralmente a uma homologia entre DNAs genômicos inferior a 30%, mostrando que tais espécies eram distintas. No entanto, são conhecidas algumas exceções, como por exemplo, a espécie *Clavispora lusitaniae*, cujos

isolados apresentaram até 32 diferenças na região D1/D2 (LACHANCE et al., 2003). Muitas vezes o sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA não é suficiente na identificação de algumas espécies. Assim, faz-se necessária a utilização do sequenciamento de outras regiões, como as regiões dos espaçadores transcritos internos (ITS e ITS2) do gene do rRNA, já que as sequências desta região podem ser úteis na separação das espécies (KURTZMAN, 2006), uma vez que a região ITS, separada pelo gene 5.8S, pode ser também utilizado para separar espécies de leveduras filogeneticamente relacionadas. Atualmente, as linhagens que apresentam seis ou mais substituições nucleotídicas não contínuas são consideradas espécies distintas (KURTZMAN e ROBNETT, 2013).

A existência de polimorfismos intraespecíficos nas sequências genéticas e as diferentes taxas de substituição de nucleotídeos entre as espécies podem dificultar a diferenciação de linhagens em diferentes espécies. Com isto, outras regiões também podem ser úteis na identificação de espécies, como a região do espaço intergênico (IGS) do rDNA, que possui um maior número de substituições, sendo utilizada com sucesso para separar espécies de *Cryptococcus*, *Xanthophyllomyces* e *Saccharomyces* (KURTZMAN, 2006). A região ITS é altamente homóloga entre espécies do gênero *Trichosporon*, sendo que a diferenciação dessas espécies requer a análise de outras regiões como a IGS (SUGITA et al., 2002). Belloch e colaboradores (2000) utilizaram as sequências do gene mitocondrial da citocromo-c oxidase II para identificar espécies do gênero *Kluyveromyces*; Daniel e colaboradores (2001) reportaram a utilização do gene da actina-1 para espécies do gênero *Candida*.

Com a evolução das técnicas moleculares, surgiram diferentes métodos na identificação de leveduras, entre eles, o DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), cariotipagem e sequenciamento de genes específicos. Os métodos que utilizam a reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio de iniciadores específicos são geralmente rápidos, simples e apresentam custo relativamente baixo (KURTZMAN et al., 2011).

Atualmente, além do sequenciamento dos domínios D1/D2 e região ITS, outras regiões também têm sido sequenciadas. Ao analisar as relações filogenéticas de leveduras do subfilo *Saccharomycotina*, Kurtzman e Robnett

(2013) utilizaram cinco genes: sequências completas do gene nuclear da subunidade maior do rRNA, subunidade menor do rRNA, fator de alongação 1 α , subunidades 1 e 2 da RNA polimerase II. A análise filogenética utilizando apenas sequências dos genes das subunidades maior e menor do rRNA e sequências do fator de alongação 1- α colocou as espécies *Wickerhamiella domercqiae*, *Starmerella bombicola*, *Yarrowia lipolytica*, *Phaffomyces opuntiae*, *Komagataella pastoris* e *Magnusiomyces magnusii* em um clado fracamente suportado, em que cada espécie está em um longo braço atípico na árvore filogenética. A inclusão das sequências de todos os cinco genes na análise resultou em uma redistribuição de *P. opuntiae*, *K. pastoris* e *M. magnussii* em outros clados (KURTZMAN e ROBNETT, 2013).

Assim, o uso de análises multigênicas pode ajudar na elucidação das relações filogenéticas de leveduras. Todavia, o principal impedimento para se usar outras sequências de genes é o desenvolvimento de iniciadores universais, que sejam efetivos para todas as espécies e a construção de bancos de dados com essas sequências para todas as espécies descritas (KURTZMAN, 2006).

Com relação à descrição de novas espécies a partir dos mais variados substratos e ambientes, nas últimas décadas a taxonomia de leveduras apresentou um grande avanço, As regras para a taxonomia de leveduras e outros fungos foram inicialmente regulamentadas pelo Código Internacional de Nomenclatura Botânica de 2005. Este Código definia que a descrição de uma espécie nova de levedura deveria incluir as características morfológicas e fisiológicas essenciais. Além disto, eram exigidos critérios que poderiam ser utilizados para diferenciar a nova espécie daquelas mais próximas filogeneticamente. Um diagnóstico em latim também deveria ser providenciado. Os nomes dos táxons também deveriam ser dados em latim ou modificados de maneira para seguir as regras de derivação da língua, incluindo apropriadas designações de gênero. Em julho de 2011, o Congresso Internacional de Botânica adotou uma alteração no artigo 59 do Código Internacional de Algas, Fungos e Plantas, que estabeleceu o princípio de “um nome, uma espécie”. Assim, eliminou-se a nomenclatura dupla usada em micologia para designar as

formas sexuais e assexuais de espécies de fungos, além da exigência para um diagnóstico em latim da nova espécie (NORVELL, 2011).

Outras exigências para uma publicação válida incluem o depósito da amostra tipo, original do espécime, em uma coleção de cultura acessível ao público, além da publicação no banco de dados internacional GenBank da sequência genética dos domínios D1/D2 e da região do ITS do gene do rRNA das leveduras (KURTZMAN et al., 2011). Lachance e colaboradores (2010) ressaltaram a importância da análise de múltiplos isolados para a descrição de novas espécies, principalmente aquelas que não apresentam reprodução sexuada conhecida. Um único isolado não reflete a variação genética que pode ser encontrada e pouco pode ser aprendido acerca da ecologia da espécie quando apenas este está disponível. No entanto, cerca de um terço das espécies de leveduras descritas são baseados em um único isolado. Kurtzman (2010) sugere que se essas espécies não tivessem sido descritas, um menor conhecimento a respeito da diversidade filogenética de leveduras seria constatado.

A exploração de novos ambientes e a utilização de metodologias mais precisas para a taxonomia de leveduras têm permitido que a descoberta de novas espécies se torne um evento cada vez mais frequente. A correta identificação desses micro-organismos auxilia no conhecimento das comunidades de leveduras existentes em diversos substratos, possibilitando o melhor entendimento do papel desses micro-organismos no meio ambiente.

1.1.3 – Ecologia de leveduras

As leveduras possuem uma ampla distribuição na natureza (KURTZMAN et al., 2011), e são isoladas principalmente de plantas e outras matérias orgânicas, além de insetos, água doce e salgada e solo (KURTZMAN et al. 2011). As plantas que servem de habitat para comunidades de leveduras são, muitas vezes, locais de interações ecológicas que envolvem outros organismos e o próprio substrato, e têm sido um modelo para estudos de ecologia microbiana (MORAIS et al., 2006). Estudos ecológicos visam conhecer a colonização e distribuição de leveduras em diferentes ecossistemas e

substratos, e têm mostrado que a maioria das espécies tem habitats especializados (MORAIS et al., 2006). Isto tem sido mostrado em pesquisas que empregam tecidos em decomposição, flores, nectários, frutos, seiva de árvores e larvas de insetos, entre outros (MORAIS et al., 2006).

As leveduras participam de diversos processos nos ecossistemas, sendo primeiramente decompositores da matéria orgânica, mas podem ser parasitas de plantas e animais, ou mesmo predadoras de outros micro-organismos (KURTZMAN et al., 2011; STARMER e LACHANCE, 2011). Entretanto, existe pouco conhecimento a respeito dos processos evolutivos que agem nas populações e espécies de leveduras que levam à adaptação desses organismos a diferentes ambientes, diferenças nos fenótipos e isolamento reprodutivo (LITI et al., 2009).

As características químicas, físicas e fisiológicas de um habitat determinam na maioria das vezes a capacidade de um organismo de colonizar aquele ambiente. Outros fatores limitantes na colonização de um habitat incluem, por exemplo, a presença espécies competidoras, produção de substâncias antagonistas e predadores compartilhando o mesmo ambiente; no entanto podem ocorrer relações benéficas, como produção de fatores de crescimento, que podem aumentar a capacidade de colonizar um determinado habitat por grupos de leveduras (STARMER e LACHANCE, 2011).

As plantas constituem um dos substratos mais abundantes para o desenvolvimento de uma gama de micro-organismos (FONSECA e INÁCIO, 2006), sendo a superfície das folhas, a maior área aérea colonizável. As plantas servem como fonte de carbono para a comunidade microbiana, que em troca fornece nutrientes que podem ser absorvidos pelas plantas principalmente pelas raízes (MORAES et al., 2007). As leveduras que colonizam a superfície de folhas (filoplano) podem estar relacionadas com o próprio processo de decomposição de matéria orgânica. Muitas espécies que ocorrem nestes substratos têm a capacidade de assimilar diversos compostos aromáticos presentes na folha (SAMPAIO e FONSECA, 1995). As leveduras, juntamente com os fungos filamentosos, constituem o maior grupo da microbiota nas folhas (ANDREWS e HARRIS, 2000; INÁCIO et al., 2005). Moléculas lixiviadas das folhas de plantas incluem uma variedade de

compostos orgânicos e inorgânicos, como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, metanol e vários sais (FONSECA e INÁCIO, 2006). As populações de leveduras se estabelecem nas plantas devido à presença de umidade e nutrientes secretados pela própria planta e por deposição por meio do vento ou carreamento por insetos e outros organismos (ANDREW e HARRIS, 2000). A alta especificidade entre algumas comunidades de leveduras e seus microhabitats pode ser influenciada pelas características químicas do habitat e vetores (STARMER e LACHANCE, 2011). A abundância destes nutrientes varia com a espécie de planta, tipo de folha e condições de crescimento (FONSECA e INÁCIO, 2006).

Algumas leveduras presentes nos filoplanos são consideradas saprófitas, outras podem atuar como mutualísticas, auxiliando na proteção contra agentes patógenos potenciais (STARMER e LACHANCE, 2011). Juntamente com o papel na transformação de nutrientes, as leveduras podem interagir com outros organismos, em relações mutualísticas, competidoras, parasitárias ou patógenas. Existem poucos relatos acerca de leveduras fitopatógenas (FELL et al. 2000), apesar de muitos outros fungos filogeneticamente próximos serem considerados fitopatógenos, como por exemplo, a maioria dos membros da classe dos ustilaginomicetos (BANDONI, 1995).

Alguns substratos a partir dos quais são isoladas leveduras podem não ser habitats específicos desses micro-organismos, mas habitats de transição onde as leveduras obtêm recursos para o seu desenvolvimento; por exemplo, as leveduras do filoplano podem ser transferidas ao solo, quando carreadas pela ação da chuva. As leveduras podem persistir no solo, mas não necessariamente vão interagir com outras leveduras especializadas na colonização deste ambiente (STARMER e LACHANCE, 2011). Em geral, a comunidade de leveduras do filoplano inclui espécies de *Bullera*, *Bensingtonia*, *Cystofilobasidium*, *Cryptococcus*, *Leucosporidium*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* (STARMER e LACHANCE, 2011).

As leveduras, principalmente as basidiomicéticas, possuem algumas características que favorecem a permanência na superfície da folha, como por exemplo, a produção de clamidósporos, estruturas resistentes à dissecação e

balistoconídeos (LANDELL et al., 2006). A maioria das espécies de leveduras basidiomicéticas possui um perfil assimilativo amplo de fontes de carbono quando comparadas com as leveduras ascomicéticas (KURTZMAN e FELL, 2006). Como exemplo, o gênero *Bullera* e *Tilletiopsis* são frequentemente isolados de superfície das folhas (NAKASE, 2000). *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula ingeniosa*, *R. graminis*, *R. mucilaginosa* e *Sporobolomyces roseus* são as espécies geralmente encontrada na superfícies aéreas de plantas (FONSECA e INÁCIO, 2006).

1.2 – Leveduras associadas à fitotelmos de bromélias

A água acumulada nos fitotelmos, que são tanques com água acumulada em cavidades nas superfícies das plantas, funciona como um microhabitat para organismos aquáticos, incluindo algas, invertebrados, pequenos vertebrados e micro-organismos (RUIVO et al., 2005). Estes microhabitats possuem uma alta concentração de nutrientes criando um ambiente adequado para o desenvolvimento de uma comunidade biológica complexa (ROCHA et al., 2004; RUIVO et al., 2005).

Marrero e colaboradores (1996) listam alguns insetos, como dípteros, coleópteros e odonatas, que utilizam bromélias para fins reprodutivos. No entanto, a polinização de bromélias pode ser realizada por uma ampla gama de agentes, nas quais beija-flores e outros vertebrados são predominantes (SAZIMA et al., 1989). Insetos são polinizadores menos comuns; quando ocorre a polinização, esta é realizada por abelhas e borboletas.

Pouco se sabe a respeito da interação entre leveduras e plantas da família Bromeliaceae. Poucos trabalhos foram feitos visando caracterizar as comunidades de leveduras associadas a estas plantas. Hagler e colaboradores (1993) observaram a dominância de leveduras basidiomicéticas, além do fungo leveduriforme *Aureobasidium pullulans*, no fitotelmo da bromélia *Neoregelia cruenta* em restinga do Rio de Janeiro. Já nas amostras de fitotelmos de *Quesnelia quesneliana*, coletadas em regiões de mangue do Rio de Janeiro, os mesmos autores obtiveram uma predominância de leveduras ascomicéticas. Araújo e colaboradores (1998) observaram que em água de tanques de

bromélias de manguezais existe uma predominância de espécies de leveduras com afinidade ascomicética. Landell e colaboradores (2006) reportam que em relação às leveduras isoladas de bromélias de Mata Atlântica no sul do Brasil, 13% eram de afinidade ascomicética e 87% foram de afinidade basidiomicética.

Duas espécies novas de leveduras, *Candida bromeliacearum* e *Candida ubatubensis*, foram isoladas em águas no fitotelmo da bromélia *Canistropsis seidelii*, no Parque Estadual Serra do Mar no estado de São Paulo (RUIVO et al., 2005). Landell e colaboradores (2009) isolaram uma nova espécie de levedura, *Cryptococcus bromeliarum*, de folhas da bromélia *Vriesea procera*, no Parque de Itapuã no estado do Rio Grande do Sul. Outras duas novas espécies, *C. aechmeae* e *C. vrieseae*, foram isoladas de bromélias também nesta localidade (LANDELL et al., 2010). *Kazatschania bromeliacearum*, uma espécie nova descrita por Araújo e colaboradores em 2012, foi isolada de amostras de fitotelmos das espécies de bromélias *Q. quesneliana*, *Nidularium procerum*, *N. cruenta*, *Aechmea nudicaulis* e *V. procera* no estado do Rio de Janeiro.

Valente e colaboradores (2012) descreveram a espécie nova *Bandoniozyma complexa* isolada de folha de *N. cruenta* coletada na Restinga de Maricá, estado do Rio de Janeiro, sendo que esta espécie forma um complexo com outras linhagens da mesma espécie, isoladas de diferentes substratos. Durante um estudo de comunidades de leveduras associadas com fitotelmos da bromélia *V. minarum*, foi descrita a espécie *Kazachistania rupicola*, isolada de fitotelmos desta planta na Serra da Piedade no estado de Minas Gerais (SAFAR et al., 2013). Gomes e colaboradores (2015) descreveram a espécie *Occultifur brasiliensis* no fitotemo da bromélia *V. minarum*, na Serra da Piedade. Landell e colaboradores (2015) descreveram a espécie nova *Bullera vrieseae* a partir de três isolados obtidos de fitotelmos da bromélia *V. minarum* (na Serra da Piedade – MG) e três isoladas de folhas das bromélias *Tillandsia gardneri* e *Vriesea friburgensis* (Parque Itapuã – RS).

Estes trabalhos mostram que os fitotelmos de bromélias podem representar ricas fontes de novas espécies de leveduras. Esses estudos também mostram que o conhecimento da microbiota associada às bromélias é

ainda escasso e requer mais estudos para a caracterização das populações de leveduras nos diferentes ecossistemas brasileiros (LANDELL et al., 2009).

1.3 – A família Bromeliaceae

A família Bromeliaceae é formada por uma gama de plantas endêmicas neotropicais e exibe uma alta riqueza de espécies (LANDELL et al., 2006). Esta família de monocotiledôneas consiste em aproximadamente 56 gêneros e cerca de 3 mil espécies (NUNES, 2003). A família Bromeliaceae compreende três subfamílias: Pitcairnoideae com espécies terrestres e sementes aladas dispersadas pelo vento; Bromelioideae, terrestres e epífitas, com frutos carnosos e sementes dispersadas por animais; e Tillandsioideae, predominantemente epífitas com sementes plumosas e dispersadas pelo vento (MARQUES e FILHO, 2008).

Baseando-se em análises filogenéticas, foi proposta uma nova divisão para a família Bromeliaceae, na qual diferentes clados referentes à *Pitcairnoideae* foram classificadas como novas subfamílias. Assim a família Bromeliaceae passou a obter oito subfamílias: *Brocchinioideae*, *Bromelioideae*, *Hechtioideae*, *Lindmanioideae*, *Navioideae*, *Pitcairnoideae*, *Puyoideae* e *Tillandsioideae* (GIVINISH et al., 2007).

As folhas das bromélias são espiraladas com bainhas amplas e flexíveis, que geralmente formam o fitotelmo no qual se acumula água e detritos orgânicos (LEME e MARIGO, 1993). O fitotelmo é formado por uma densa espiral de rosetas de folhas. Neste ambiente ocorrem interações complexas entre diversos organismos que são parcial ou totalmente dependentes deste microambiente aquático (SIQUEIRA-FILHO e LEME, 2006).

Quanto ao habitat, as bromélias podem ser terrestres, rupícolas ou epífitas. No Brasil, estas plantas são encontradas na Floresta Amazônica, na Caatinga, na Mata Atlântica e no Cerrado; apresentando grande diversidade e alta taxa de endemismo. A distribuição geográfica das bromélias se estende desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, sendo que somente uma espécie ocorre na África, *Pitcairnia feliciana* (AMORIM e LEME, 2009). No Brasil, estas plantas são encontradas em todas as regiões (PAULA, 2000),

porém, ocorrem principalmente no sudeste, que é considerado um dos centros de maior diversidade desta família, estimando-se a presença de 70% dos gêneros descritos (BENZING, 2000).

As bromélias geralmente são herbáceas e apresentam inflorescência vistosa, variando de plantas delicadas e de pequeno porte com alguns centímetros, até plantas de grande porte que pode atingir até 10 metros de altura, como *Puya raimondii* Harms, encontrada nos Andes (VERSIEUX e WENDT, 2006). A riqueza e abundancia de espécies de bromélias num determinado bioma podem ser utilizadas para estimar o estado de conservação e da capacidade de suporte deste ambiente (LEME e MARIGO, 1993). As bromélias fitotelmo-dependentes são caracterizadas como espécies-chaves para a manutenção da biodiversidade. Os ambientes de fitotelmos, notadamente os da família Bromeliaceae, são pouco estudados, no que se refere à composição de micro-organismos associados (ROCHA et al., 2004).

1.4 – A família Eriocaulaceae

As sempre-vivas fazem parte da família Eriocaulaceae. Este grupo de planta congrega cerca de 1200 espécies pertencentes a 10 gêneros. Destes gêneros, *Syngonanthus* e *Paepalanthus* possuem representantes na África e nas Américas (COSTA et al., 2008). Dois centros de diversidade e endemismo são reconhecidos, o mais rico, no leste do Brasil (na Cadeia do Espinhaço, nos estados de Minas Gerais e Bahia), e o segundo no escudo das Guianas (MIRANDA e GIULIETTI, 2001). São representantes das monocotiledôneas, e são perenes, raramente anuais, podendo apresentar desde poucos centímetros de altura até porte bem alto, cujo escapo chega a atingir até 2,50 metros. Estas plantas possuem hábito variado, verificando-se espécies com caules eretos e recobertos de folhas, ou caule reduzido com uma roseta basal de folhas, além de outras submersas.

Estudos filogenéticos revelam que a família é monofilética (ANDRADE et al., 2010) e sua sinapomorfia de mais fácil reconhecimento são as inflorescências em forma de capítulos. Representantes da família caracterizam-se pelo hábito herbáceo e inflorescência do tipo capítulo, protegido por uma

série de brácteas involucrais (MIRANDA e GIULIETTI, 2001). As inflorescências de muitas espécies são comercializadas como “sempre-vivas” por guardarem a aparência de estruturas vivas muitos anos depois de colhidas e secas, sendo utilizadas como plantas ornamentais e na fabricação de artesanato (MIRANDA e GIULIETTI, 2001).

Paepalanthus é o segundo maior gênero da família e o mais complexo do ponto de vista taxonômico. Atualmente conta com aproximadamente 380 espécies distribuídas na África, América Central e do Sul, agrupadas em diferentes categorias infragenéricas (COSTA et al., 2008). Dentre as 47 espécies pertencentes a *Paepalanthus* subg. *Platycaulon*, 24 estão no espinhaço. Apenas *P. rigidulus* ocorre na Chapada Diamantina; as demais são restritas à porção mineira da cadeia, ocorrendo desde a Serra do Cipó, onde há várias espécies endêmicas, como *P. bromelioides*, até o Planalto de Diamantina. O gênero *Paepalanthus* é, inquestionavelmente, o mais carente de informações e o que necessita de um maior esforço de pesquisas, inclusive em relação à sua circunscrição, uma vez que se trata de um táxon polifilético (COSTA et al., 2008; GIULIETTI et al., 2000).

A espécie *P. bromelioides* assemelha-se a uma bromélia por possuir arquitetura em roseta e acumular água da chuva, ou seja, possui um fitotelmo. As rosetas são frequentemente habitadas por insetos, aracnídeos e pequenos invertebrados e as raízes são envoltas por cupinzeiros construídos sob a planta. Portanto, estas plantas podem apresentar nutrientes tanto de processos de reciclagem de nutrientes por cupins, como de atividades de predadores nas rosetas (fezes e carcaças de presas), e até mesmo de insetos que eventualmente caem no fitotelmo. Bactérias presentes nestes fitotelmos podem acelerar a ciclagem de nutrientes derivados dos insetos, aracnídeos e pequenos invertebrados (NISHI et al., 2013), assim como fungos.

Estudos visando conhecer a associação de leveduras com fitotelmos de bromélias e sempre-vivas são importantes para uma melhor compreensão da riqueza microbiana destes habitats (SOININEN et al., 2007). Os fitotelmos permitem que diferentes questões sejam abordadas utilizando estes ecossistemas como modelos, como a distribuição da diversidade dos mais variados organismos, e também a importância relativa de fatores locais e

regionais na estruturação das comunidades microbianas (SRIVASTAVA et al., 2005).

2. –JUSTIFICATIVA

Os fitotelmos são tanques com água acumulada em cavidades nas superfícies das plantas, em folhas, flores ou buracos nas árvores, e são usados no estudo de vários processos ecológicos, especialmente processos de colonização e interação entre os organismos. As plantas que mais frequentemente formam fitotelmos pertencem principalmente à família Bromeliaceae. Contudo, outras plantas, como espécies do gênero *Paepalanthus*, também são capazes de formar estas estruturas.

No fitotelmo, os detritos são processados por fungos, bactérias e larvas de insetos e, os nutrientes resultantes da atividade metabólica desses organismos são absorvidos pela planta hospedeira por meio dos tricomas foliares. Contudo, os fitotelmos formam um habitat ideal para diversas formas de vida, desde micro-organismos até mamíferos, bem como diferentes grupos de invertebrados e vertebrados. Portanto, plantas que formam fitotelmo, tornam-se importantes habitats para uma grande diversidade de organismos.

A diversidade de leveduras associadas aos fitotelmos de bromélias é pouco estudada, até o momento. Em relação às sempre-vivas, não existe relatos da associação de leveduras com estas plantas. Muitas das interações ecológicas envolvendo micro-organismos destes micro-habitats são desconhecidas, assim como a riqueza e a distribuição de espécies microbianas. Os estudos de fitotelmos têm mostrado a ocorrência de novas espécies de leveduras, tais como *B. complexa*, *C. bromeliacearum*, *C. ubatubensis*, *C. aechmeae*, *C. vrieseae*, *Cr. bromeliarum*, *K. bromeliacearum*, *K. rupicola* e *O. brasiliensis*. Além disto, os ambientes nas quais estas plantas são encontradas vêm sofrendo degradações por atividades antrópicas, o que pode acarretar no desaparecimento das mesmas, e conseqüentemente das espécies microbianas associadas. Por fim, trabalhos que visem estudar a comunidade de leveduras em diferentes habitats tornam-se importantes na medida em que aumentam o conhecimento acerca da ecologia e filogenia de leveduras.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Geral

Caracterizar a distribuição e a diversidade de leveduras associadas à fitotelmos de três espécies de Bromeliaceae e uma espécie de Eriocaulaceae em áreas de Cerrado nos estados de Tocantins e Minas Gerais.

3.2 – Específicos

- Isolar e identificar por meio de testes fisiológicos e moleculares, as leveduras associadas aos fitotelmos de *Bromelia karatas* e *Encholirium* sp. coletadas no estado do Tocantins, e de *Paepalanthus bromelioides* e *Vriesea minarum* coletadas no Estado de Minas Gerais;
- Determinar a diversidade e riqueza das comunidades de leveduras isoladas dos fitotelmos estudados;
- Verificar a similaridade das comunidades de leveduras destes fitotelmos em cada uma das regiões e entre as diferentes regiões estudadas;
- Descrever novas espécies de leveduras.

4 – MATERIAIS e MÉTODOS

4.1 – Áreas de coletas

4.1.1 – Tocantins – Município de Aurora do Tocantins

O estado do Tocantins possui uma área de 278.420,7 km². Por estar em uma área de transição, apresenta características climáticas e físicas tanto da Amazônia quanto da região Centro-Oeste do Brasil. Tem duas estações distintas, uma seca e outra chuvosa.

Aurora do Tocantins é uma pequena cidade localizada na região sudeste do estado do Tocantins (Fig. 1), nas coordenadas 12°42'07" de latitude Sul e 46°25'04" de longitude oeste (Fig. 1). Possui uma área de 753 km² com população de 3.446 habitantes (IBGE, 2010). Localiza-se a 535 km da capital Palmas, e está situada a 482 metros de altitude.



Figura 1 – Localização do estado do Tocantins, com destaque para o município de Aurora do Tocantins, localizada no sudeste do estado (em amarelo à direita). Fonte: Google Earth.

O clima da região é considerado sub-úmido seco com moderada deficiência hídrica no inverno. As precipitações médias anuais oscilam entre

1.400 e 1.600mm com temperatura média anual variando entre 25 e 27 °C (SEPLAN, 2008). No que diz respeito à geologia, a área de estudo situa-se nos domínios da Bacia Sedimentar Sanfranciscana, composto de rochas do Grupo Bambuí (Subgrupo Paraopebas) (MORAIS, 2009) e Área Cárstica de Aurora do Tocantins com unidades típicas deste relevo, como os lapiás (*karren*), as dolinas, os poljes e os maciços calcários (MORAIS, 2013). Os calcários da região de Aurora do Tocantins são parte da Província Espeleológica do Grupo Bambuí, onde o maior número das cavernas brasileiras é registrado (ZAMPAULO e FERREIRA, 2009).

4.1.2 – Minas Gerais – Serra do Cipó

A Serra do Cipó se localiza na região central do estado de Minas Gerais (Fig. 2), na porção sul da cadeia do Espinhaço. O clima é classificado de forma genérica como tropical de altitude (Cwb de acordo com Köppen), com verões muito chuvosos e invernos secos, com precipitação concentrada entre os meses de novembro e março, e média anual em torno de 1.500 mm (MADEIRA e FERNANDES, 1999), apresentando temperatura média anual entre 17 e 25° C. Está situada entre os paralelos 19 e 20° S e 43 e 44° W, no divisor de águas das bacias hidrográficas dos rios São Francisco e Doce. A cobertura vegetal na Serra do Cipó é muito diversificada, variando principalmente conforme o solo e a altitude. Em sua parte mais baixa predomina a vegetação de cerrado, já na região mais alta são encontrados principalmente campos rupestres, de elevadíssima diversidade florística. Os campos rupestres ocorrem na maior parte do Parque e nas adjacências deste, constituindo a fitofisionomia predominante da região (GIULIETTI et al. 2000; MADEIRA et al. 2009). A vegetação possui adaptações para o armazenamento de água (como por exemplo, as bainhas foliares nas espécies do gênero *Vellozia*), um ciclo de vida adaptado às condições da região (por exemplo, inúmeras espécies de Eriocaulaceae), ou então estruturas para minimizar a perda de água (como, por exemplo, algumas espécies de Melastomataceae e Asteraceae) (JOLY 1970).

Apesar da importância da região, a Serra do Cipó vem experimentando nas últimas décadas um aumento evidente de atividades impactantes. A

construção de condomínios residenciais, casas de veraneio e pousadas tem se consolidado na região, levando a uma ocupação desordenada, responsável pela perda de extensas áreas naturais. Atividades turísticas também têm se expandido (FERREIRA 2010), trazendo outros problemas como a produção de resíduos sólidos e erosão de trilhas.

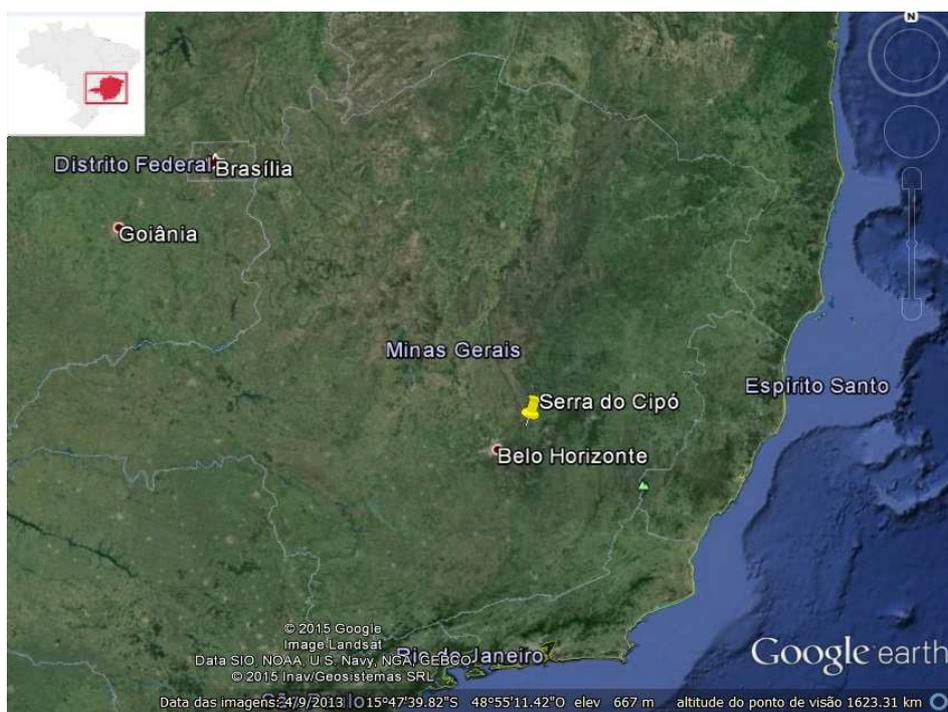


Figura 2 – Localização do estado de Minas Gerais, com destaque para a Serra do Cipó, localizado no centro do estado (em amarelo). Fonte Google Earth.

4.2 – Coletas dos fitotelmos e isolamento das leveduras

Para cada região foram realizadas duas coletas de amostras de águas de fitotelmos, compreendendo 60 fitotelmos de cada espécie das bromélias *Bromelia karatas* (Fig. 3a) e *Encholirium* sp. (Fig. 3b) no Tocantins; e 60 fitotelmos de cada espécie das bromélias *Vriesea minarum* (Fig. 3d) e *Paepalanthus bromelioides* (Fig. 3c) na Serra do Cipó. As coletas foram realizadas respeitando uma distância mínima de 5m entre as amostras. Em Aurora do Tocantins as coletas foram realizadas em Dezembro/2011 e Fevereiro/2012. Já na Serra do Cipó, as coletas foram realizadas em Novembro/2013 e Março/2014.

a)



b)



c)



d)



Figura 3 – Imagens dos fitotelmos coletados. a) – *Bromelia karatas*; b) – *Encholirium* sp.; c) – *Paepalanthus bromelioides*; e d) *Vriesea minarum*.

As águas dos fitotelmos foram coletadas assepticamente em frascos esterilizados, com o auxílio de pipetas previamente esterilizadas. As amostras foram diluídas em solução salina (0,9% NaCl) em escala decimal e alíquotas de 200 μ L das diluições seriadas (10^{-1} e 10^{-2}) foram semeadas em meio agar YM (agar 2,0%, extrato de levedura 0,3%, peptona 0,5%, glicose 2,0%, extrato de malte 0,3%, adicionado de 100 mg de cloranfenicol) para o isolamento de leveduras. As placas foram incubadas em estufa, à temperatura de 25° C por 7 a 15 dias.

Os diferentes morfotipos de leveduras foram contados e representantes de cada morfotipo foram purificados por esgotamento em placa contendo agar

YM para posterior identificação. Colônias purificadas tiveram a morfologia descrita. Para preservação, uma alçada de cada colônia purificada foi inoculada em tubos contendo caldo GYMP (glicose 2%, extrato de leveduras 0,5%, extrato de malte 1%, Na₂P0₄ 0,2%) e incubadas a 25°C por 24 horas. Após este período foram transferidos 0,8 ml da cultura para criotubos de 2 ml esterilizados, aos quais adicionaram-se 0,2 ml de glicerol esterilizado. Os criotubos foram estocadas em freezer a -80°C. As leveduras isoladas foram depositadas na Coleção de Micro-organismos, DNA e Células da UFMG.

4.3 – Identificação das leveduras

Todas as leveduras isoladas foram submetidas a agrupamentos com base na metodologia padrão (morfologia e características fisiológicas) conforme descrito em Kurtzman e colaboradores (2011). Posteriormente, os isolados de leveduras com características morfológicas e fisiológicas similares foram submetidos à análise molecular, por meio de PCR *fingerprinting* utilizando-se o iniciador EI1, conforme descrito por de Barros Lopes e colaboradores (1996). Com base no perfil da eletroforese dos produtos amplificados pela PCR, os isolados que apresentaram padrões de banda idênticos foram agrupados, e considerados como pertencentes à mesma espécie (de BARROS LOPES et al., 1996). Isolados representativos de cada grupo molecular formado pelo PCR-*fingerprinting* tiveram os domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA sequenciados. Linhagens fisiologicamente distintas e com padrões únicos (apenas um isolado com determinado perfil molecular) após a análise do PCR-*fingerprinting* também foram selecionadas para a identificação direta pelo seqüenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA. Quando necessário, a região espaçadora transcrita interna (ITS) do gene do rRNA também foi sequenciada.

4.3.1 – Extração de DNA

Para extração do DNA total, os isolados de leveduras foram crescidos em ágar YM por 24 a 48 horas à 25°C. Após crescimento, as colônias foram ressuspensas em tubos contendo 100 µL de tampão de lise e incubadas à 65 °C por um tempo mínimo de 30 minutos. Após este período, foram adicionado 100 µL de clorofórmio:alcool isoamílico (24:1) seguida de agitação em vórtex por 3 – 4 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para tubos aos quais adicionou-se isopropanol (v/v). Os tubos foram deixados a temperatura ambiente por 15 minutos, para a precipitação do DNA. Decorrido o tempo, foram acrescentados 200 µL de etanol 70% gelado seguida de uma centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão e ao *pellet* formado foram acrescentados 200 µL de etanol 70%. Efetuou-se novamente uma centrifugação a 13.200 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado por inversão. Os tubos foram colocados para secar *overnight* à temperatura ambiente para total evaporação do álcool. Após essa etapa, o *pellet* foi ressuspendido em 100 µL de tampão TE (Tris-HCL 10 Mm, EDTA 1 Mm, pH 8) e incubado em estufa a 37°C por aproximadamente uma hora. O DNA obtido foi então dosado em Nano Drop ND 1000 (NanoDrop Thechnologies), diluído para atingir a concentração de aproximadamente 200 ng/µL e estocado a – 20 °C.

4.3.2 – PCR *fingerprinting* com iniciador EI1

A reação de PCR com o iniciador EI1 (5`- CTGGCTTGGTGTATG – 3') foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão 10X (MBI Fermentas, EUA), 1,5 µl de MgCl₂ 1,5M (MBI Fermentas), 1 µL de dNTPs 0,05Mm (Invitrogen, EUA), 2 µL do iniciador (EI1) 10 pmol/µL (Invitrogen, EUA), 1 µL de DNA (200 ng/µL), 0,2 µL de Taq DNA Polimerase 1,25 U/ µL (MBI Fermentas) e o volume final completado com água deionizada esterilizada. A reação foi realizada utilizando-se termociclador Mastercycler (Eppendorf). O programa de ciclagem consistiu em uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 95°C, 1minuto de anelamento do iniciador a 50°C e 1 minuto de extensão a 72°C, e

uma extensão final por 6 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X (TBE – 54g de Tris Base, 27,5g de ácido bórico, 20 µL de EDTA 0,5M, pH 8,0) durante aproximadamente uma hora e meia a 80V. Os géis foram corados com GelRed™ (Biotium, USA), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados por sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat, França).

4.3.3 – Amplificação utilizando os iniciadores NL1, NL4, ITS1 e ITS4

A partir dos agrupamentos das leveduras em perfis moleculares, um isolado de cada perfil molecular diferente teve a região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA sequenciada, conforme descrito por Lachance e colaboradores (1999). Para a reação de PCR utilizou-se os iniciadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão de PCR 10X (MBI Fermentas), 3 µL de MgCl₂ 1,5M (MBI Fermentas), 2 µL de dNTPs 0,05 Mm (Invitrogen, EUA), 1 µL dos iniciadores NL1 e NL4 a 10 pmol/µL (Invitrogen, EUA), 1 µL de DNA (200 ng/µL) e 0,2 µL de Taq DNA Polimerase 1,25 U/µL (MBI Fermentas), sendo o restante do volume completado com água deionizada esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador Mastercycler (Eppendorf). O programa de ciclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 95°C, 25 segundos de anelamento do iniciador a 54°C e 20 segundos de extensão a 72°C, e uma extensão final por 10 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X durante aproximadamente 30 minutos a 120V. Os géis foram corados com GelRed™, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados por sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat).

Para a confirmação de potenciais novas espécies foram utilizados, adicionalmente, os iniciadores ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), para amplificação e

sequenciamento da região espaçadora transcrita interna (ITS1-5.85-ITS2) do gene do rRNA, conforme descrito por White e colaboradores (1990). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão de PCR 10X (MBI Fermentas), 3 µL de MgCl₂ 1,5M (MBI Fermentas), 2 µL de dNTPs 0,05 Mm (Invitrogen, EUA), 1 µL dos iniciadores ITS1 e ITS4 a 10 pmol (Invitrogen, EUA), 1 µL de DNA (200 ng/µL) e 0,2 µL de Taq DNA Polimerase 1,25 U/µL (MBI Fermentas), sendo o restante do volume completado com água deionizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador Mastercycler (Eppendorf). O programa de ciclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento a 55°C, 1 minuto de extensão a 72°C, e uma extensão final por 5 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X durante aproximadamente 30 minutos a 120V. Os géis foram corados com GelRed™, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados por sistema de fotodocumentação (Vilber Lourmat).

4.3.4 – Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento

Os amplicons gerados pela reação de PCR com os iniciadores NL1/NL4 e ITS1/ITS4 foram purificados adicionando-se ao produto de PCR, 11,75 µL de EDTA e 141 µL de etanol absoluto. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado e os mesmos então centrifugados a 13.000 rpm por 25 minutos. O sobrenadante foi retirado e descartado com auxílio de pipeta. A seguir, foram adicionados 120 µL de etanol 70% gelado aos tubos, e os mesmos foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos; o etanol foi retirado e descartado com auxílio da pipeta. Os tubos foram deixados *overnight* à temperatura ambiente para total evaporação do etanol e após, 10 µL de água deionizada esterilizada foram adicionados para ressuspender o DNA.

O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730. A reação de

sequenciamento foi realizada em microplacas de 96 poços (Applied Biosystems, EUA) preparada para um volume final de 10 μL , os quais foram colocados: 1 μL do iniciador a 5 μmol^{-1} , 1 μL de tampão (presente no kit de sequenciamento), 1 μL de *Big Dye*, 1 a 5 μL de DNA (de modo que a reação final contivesse entre 5 e 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$) e o restante de água deionizada esterilizada para completar o volume, se necessário. O programa de ciclagem utilizado consistiu de uma desnaturação inicial a 36°C por 1 minuto, 36 ciclos de anelamento a 96°C por 15 segundos, seguido por 15 segundos de extensão a 50 °C e 4 minutos de extensão final a 60 °C.

Os produtos do sequenciamento foram submetidos ao processo de precipitação com o acréscimo de 1 μL de EDTA a 125 Mm, 1 μL de acetato de amônio e 50 μL de etanol 96% (Merck) em cada poço. A placa foi centrifugada em vórtex brevemente e então incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 3.700 rpm à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado por inversão. Em seguida, foram acrescentados 100 μL de etanol 70% (Merck) e as amostras novamente centrifugadas por 15 minutos a 3.700 rpm à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado por inversão e em cada poço foram acrescentado 10 μL de Formamida HI DI (Applied Biosystems, EUA). A placa foi armazenada a 4°C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3730.

4.3.5 – Análise das sequências

As sequências de DNA foram analisadas utilizando-se o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool – versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) desenvolvido pelo National Center For Biotechnology (ALTSCHUL et al., 1997). Para o alinhamento das seqüências nucleotídicas foi utilizado o programa CLUSTALW software package (EMBL-EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). A análise filogenética foi conduzida utilizando o programa Mega – Molecular Evolutionary Genetic Analysis versão 6 (TAMURA et al., 2013).

4.4 – Análises estatísticas

As análises de agrupamento foram conduzidas utilizando-se o índice de diversidade beta de WHITTAKER (1960), que mede a mudança ou taxa de substituições na composição de espécies de um substrato ao outro, com algoritmo de agrupamento UPGMA (método hierárquico das médias da dissimilaridade ponderada) e índice de similaridade de Bray-Curtis com algoritmo de agrupamento Paired Group. Em ambos os casos 999 aleatorizações foram empregadas. O ajuste entre as matrizes β de Whittaker e de Bray-Curtis e seus respectivos dendrogramas foram estimados pelo coeficiente de correlação cofenética. A correlação cofenética é uma análise que estabelece uma correlação entre a matriz de similaridade com o dendrograma gerado através desta, ou seja, compara as reais distâncias obtidas entre os acessos com as distâncias representadas graficamente. Os valores de β variam de 0 a 1, e nesse caso, números tendendo a zero indicam maior semelhança na composição de espécies (MAGURRAN, 2004).

O índice de Simpson ($E1/D$) foi utilizado para estimar a equitabilidade (MAGURRAN, 2004). A dominância de espécies (WHITTAKER 1965) foi usada para obter a distribuição da abundância e para selecionar o melhor modelo de critérios de informação Bayesiano de Schwarz (BIC) de acordo com a probabilidade. O esforço amostral foi avaliado utilizando-se curvas de acumulação de espécies. Além disso, os índices Jackknife 1 e Bootstrap foram empregados para estimar a riqueza de espécies (KINDT et al. 2006). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote R “vegan” (OKSANEN et al. 2012).

5 – RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 – Identificação e diversidade das leveduras isoladas dos fitotelmos

Um total de 491 isolados de leveduras foi obtido, sendo 166 a partir de fitotelmos de *B. karatas* e 94 isolados de *Encholirium* sp. em Aurora do Tocantins; e 137 isolados de fitotelmos de *P. bromelioides* e 94 isolados de fitotelmos de *V. minarum* na Serra do Cipó. Oitenta e oito espécies de leveduras foram identificadas, sendo que representantes de 45 espécies foram encontradas nos fitotelmos de *B. karatas*, 29 espécies nos fitotelmos de *Encholirium* sp., 40 espécies nos fitotelmos de *P. bromelioides* e 24 espécies em fitotelmos de *V. minarum* (Tab. 1). O elevado número de espécies de leveduras encontrado no presente trabalho pode estar associado a um ambiente rico em nutrientes, além da presença de vetores (BENZING, 2000).

Landell e colaboradores (2009) obtiveram 174 leveduras a partir do filoplano, água e flores de diferentes espécies de bromélias no Parque Estadual de Itapuã/Viamão – RS. Gomes e colaboradores (2015) obtiveram 359 isolados de leveduras coletadas de fitotelmos da bromélia *V. minarum* na Serra da Piedade – MG.

Algumas espécies de leveduras, no presente trabalho, ocorreram somente em um tipo de fitotelmo (Tab. 2). Os fitotelmos de *B. karatas* apresentaram maior número de isolados (33,80%), e 19 espécies das 45 encontradas ocorreram somente nos fitotelmos desta bromélia, incluindo seis espécies novas. As espécies que ocorreram apenas nesta bromélia foram *B. complexa*, *Bullera dendrophila*, *C. albicans*, *C. duobushaemulonii*, *C. leandrae*, *Candida* sp. 1, *Candida* sp. 2, *Candida* sp. 3, *Hagleromyces aurorensis*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *H. opuntiae*, *Microbotryozyma collariae*, *O. brasiliensis*, *Pichia* sp., *Sporisorium elionuri*, *S. everhartii*, *Torulaspota delbueckii*, *Tremella* sp. e *Ustilago sparsa*. Já as espécies *C. buenavistaensis*, *Erythrobasidium hasegawianum*, *Pseudozyma brasiliensis*, *Rhodosporeidium toruloides*, *Rhodotorula calyptogeneae* e *Sporidiobolus ruineniae* foram observadas somente nos fitotelmos de *Encholirium* sp.

Tabela 1 – Identificação e ocorrência das leveduras nos fitotelmos amostrados de *Bromelia karatas* e *Encholirium* sp. no estado do Tocantins e *Paepalanthus bromelioides* e *Vriesea minarum* no estado de Minas Gerais.

Leveduras	<i>B. karatas</i> n=60 ^a	<i>Encholirium</i> sp. n=60	<i>P. bromelioides</i> n=60	<i>V. minarum</i> n=60	Classificação
<i>Anomalomyces panici</i>	0	0	5 ^b	11	B ^c
<i>Anomalomyces yakirrae</i>	0	0	19	3	B
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	0	1	0	A ^d
<i>Bandoniozyma complexa</i>	1	0	0	0	B
<i>Bullera dendrophila</i>	1	0	0	0	B
<i>Candida albicans</i> (Clado <i>Lodderomyces</i>)	1	0	0	0	A
<i>C. buenavistaensis</i> (Clado <i>Lodderomyces</i>)	0	1	0	0	A
<i>C. duobushaemulonii</i> (Clado <i>Metschnikowia</i>)	3	0	0	0	A
<i>C. edaphicus</i> (<i>Saccharomycetales</i>)	1	1	0	0	A
<i>C. glabrata</i> (clado <i>Nakaseomyces</i>)	10	11	0	0	A
<i>C. heveicola</i> (clado <i>Metschnikowia</i>)	0	0	1	1	A
<i>C. intermedia</i> (clado <i>Metschnikowia</i>)	8	3	0	0	A
<i>C. leandrae</i> (clado <i>Kodamae</i>)	1	0	0	0	A
<i>C. melibiosica</i> (clado <i>Metschnikowia</i>)	0	0	1	0	A
<i>C. nivariensis</i> (clado <i>Lodderomyces</i>)	1	2	0	0	A
<i>C. orthopsilosis</i> (clado <i>Lodderomyces</i>)	17	6	1	0	A
<i>C. parapsilosis</i> (clado <i>Lodderomyces</i>)	5	1	0	0	A
<i>C. pseudointermedia</i> (clado <i>Metschnikowia</i>)	19	5	0	0	A
<i>Candida</i> sp.1 (clado <i>Phaffomyces</i>) ^e	3	0	0	0	A
<i>Candida</i> sp.2 (clado <i>Metschnikowia</i>) ^e	1	0	0	0	A
<i>Candida</i> sp.3 (clado <i>Barnettozyma</i>) ^e	1	0	0	0	A
<i>C. ubatubensis</i> (clado <i>Metschnikowia</i>)	0	0	1	4	A
<i>Cryptococcus flavescens</i>	1	2	0	1	B
<i>Cr. Flavus</i>	0	0	1	3	B

<i>Cr. Heveanensis</i>	16	21	0	1	B
<i>Cr. Laurentii</i>	8	7	9	2	B
<i>Cr. Nemorosus</i>	5	2	12	14	B
<i>Cr. Podzolicus</i>	1	0	4	0	B
<i>Cr. Rajasthanensis</i>	1	1	1	0	B
<i>Cryptococcus</i> sp.1 ^e	0	0	3	0	B
<i>Cryptococcus</i> sp. 2 ^e	0	0	0	2	B
<i>Cr. Terrestris</i>	5	3	0	0	B
<i>Endosporium aviarium</i>	0	0	0	1	A
<i>Erythrobasidium hasegawianum</i>	0	1	0	0	B
<i>Exophiala alcalophila</i>	0	0	2	0	A
<i>E. nigra</i>	0	0	2	0	A
<i>E. placitae</i>	0	0	0	1	A
<i>Gymnocintractia samanensis</i>	0	0	1	1	B
<i>Hagleromyces aurorensis</i> ^{ef}	3	0	0	0	A
<i>Hannaella luteola</i>	6	5	0	0	B
<i>Hannaella pagnoccae</i> ^e	1	4	0	0	B
<i>Hannaella zeae</i>	1	3	0	0	B
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	1	0	0	0	A
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	1	0	0	0	A
<i>Kwoniella mangroviensis</i>	3	2	0	0	B
<i>Meira geulakonigii</i>	0	0	5	0	B
<i>Meira</i> sp.1 ^e	0	0	2	0	B
<i>Meyerozyma caribbica</i>	7	2	0	0	A
<i>M. guilliermondii</i>	19	7	0	0	A
<i>Microbotryozyma collariae</i>	1	0	0	0	B
<i>Myriangium</i> sp.1 ^e	0	0	1	0	A
<i>Neobulgaria pura</i>	0	0	2	0	A

<i>Occultifur brasiliensis</i>	1	0	0	0	B
<i>O. externus</i>	1	1	0	1	B
<i>Pichia</i> sp. ^e	1	0	0	0	A
<i>Pseudozyma aphidis</i>	1	0	3	0	B
<i>P. brasiliensis</i>	0	1	0	0	B
<i>P. graminicola</i>	0	0	1	0	B
<i>P. hubeiensis</i>	7	3	4	2	B
<i>P. jejuensis</i>	0	0	19	35	B
<i>P. rugulosa</i>	0	0	1	0	B
<i>Pseudozyma</i> sp.1 ^e	0	0	0	2	B
<i>P. vetiver</i>	0	0	1	0	B
<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	0	0	0	1	B
<i>R. toruloides</i>	0	4	0	0	B
<i>Rhodotorula calyptogenae</i>	0	1	0	0	B
<i>Rh. dairenensis</i>	0	0	1	0	B
<i>Rh. foliorum</i>	0	0	1	0	B
<i>Rh. Lactosa</i>	0	0	1	0	B
<i>Rh. Marina</i>	0	0	0	1	B
<i>Rh. Mucilaginoso</i>	1	2	7	2	B
<i>Rh. Nothofagi</i>	0	1	1	0	B
<i>Rhodotorula</i> sp.1 ^e	0	0	1	1	B
<i>Rh. taiwanensis</i>	0	0	0	1	B
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	0	2	0	0	B
<i>Sporisorium andropogonis</i>	0	0	2	0	B
<i>S. elionuri</i>	1	0	0	0	B
<i>S. everhartii</i>	3	0	0	0	B
<i>S. trachypogonis-plumosi</i>	0	0	1	0	B
<i>Sporobolomyces elongatus</i>	0	0	3	0	B

<i>Sp. Japonicus</i>	0	0	1	0	B
<i>Tilletiopsis minor</i>	0	0	4	1	B
<i>T. oryzaicola</i>	0	0	2	0	B
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	2	0	0	0	A
<i>Tremella globispora</i>	2	0	5	1	B
<i>Tremella sp.1</i> ^e	1	0	0	0	B
<i>Ustilago sparsa</i>	1	0	0	0	B
<i>U. spermophora</i>	0	0	1	0	B

Legenda:

a – número da quantidade de fitotelmos coletados por espécies de bromélias;

b – frequência da ocorrência das leveduras isoladas nas amostras;

c – B = espécies classificadas no filo Basidiomycota;

d – A = espécies classificadas no filo Ascomycota.

e – novas espécies encontradas

f – novo gênero encontrado

As espécies de leveduras *Cryptococcus* sp.1, *Exophiala alcalophila*, *E. nigra*, *E. placitae*, *Meira geulakonigii*, *Meira* sp., *Myriangium* sp., *Neobugaria pura*, *P. graminicola*, *P. rugulosa*, *P. vetiver*, *Rh. dairenensis*, *Rh. foliorum*, *Rh. lactosa*, *S. andropogonis*, *S. trachypogonis-plumosi*, *Sporobolomyces elongatus*, *Sp. japonicus*, *Tilletiopsis oryzicola* e *U. spermophora* foram encontradas somente nos fitotelmos de *P. bromelioides*. Apenas seis espécies de leveduras ocorreram somente nos fitotelmos de *V. minarum*: *Cryptococcus* sp. 2, *Endosporidium aviarium*, *Pseudozyma* sp., *Rhodospiridium paludigenum*, *Rh. marina* e *Rh. taiwanensis*.

Dentre as 88 espécies encontradas no presente trabalho, somente quatro foram compartilhadas entre os quatro fitotelmos: *Cryptococcus laurentii*, *Cr. nemorosus*, *P. hubeiensis* e *Rh. mucilaginoso* (Fig. 4). Estas espécies já foram registradas associadas a fitotelmos de *V. minarum* coletados na Serra da Piedade em Minas Gerais (GOMES et al., 2015).

A levedura *Cr. laurentii* tem sido relatada como capaz de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos (ROBIGLIO et al., 2011), sendo utilizada como agente de controle biológico na agricultura (SILVA-BEDOYA et al., 2014). Esta levedura é generalista, podendo ser encontrada associada ao solo (CLOETE et al., 2009; BOTHA, 2011), água do mar (KUTTY et al., 2013), vinhedos, madeira em decomposição, excrementos de pombos, plantas, entre outros (FONSECA et al., 2011, CADETE et al., 2012). Landell e colaboradores (2006) isolaram *Cr. laurentii* associado a folhas das bromélias *B. antiacantha*, *Tillandsia crocata*, *T. germiniflora*, *V. friburgensis*, *V. gigantea* e *V. procera*, além de flor de *T. crocata*, em trabalho realizado no Parque Itapuã (RS). A espécie *Cr. nemorosus* é descrita como ocorrendo associada à plantas herbáceas em floresta de carvalho na Rússia (FONSECA et al., 2011). Gomes e colaboradores (2015) também isolaram *Cr. nemorosus* associada ao fitotelmo da bromélia *V. minarum* nos período chuvoso e seco, no ecossistema de campo rupestre da Serra da Piedade em Minas Gerais.

A espécie *P. hubeiensis* foi descrita inicialmente como isolada em folhas de *Quercus mongolica* na China (WANG et al., 2006). Esta espécie de levedura também já foi isolada em fitotelmos de bromélia (GOMES et al., 2015), o que também ocorreu no presente trabalho. Já a espécie *Rh. mucilaginoso*, isolada

no presente trabalho, possui uma distribuição cosmopolita, sendo encontrada tanto em ambientes terrestres quanto de água doce e marinhos (NAGAHAMA, 2006; KURTZMAN et al., 2011; SAMPAIO, 2011).

Nos fitotelmos de *B. karatas* e *P. bromelioides* foram encontrados os maiores números de espécies de leveduras (Tab 2). Durante as coletas, visualmente estes fitotelmos continham uma maior quantidade de água, e maior presença de insetos e outros organismos (aranhas, gafanhotos e rãs). As bromélias *Encholirium* sp. e *V. minarum* são rupícolas, ou sejam, são fixas às rochas. Uma hipótese seria que estas bromélias acumulariam menor quantidade de matéria orgânica nos fitotelmos devido ao habitat rupícola, que é mais inóspito. Já as plantas terrestres (*B. karatas* e *P. bromelioides*) apresentariam uma quantidade maior de nutrientes, possivelmente proveniente de partículas do solo, o que favorece uma maior ocorrência de leveduras. Contudo, outros estudos devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

No presente trabalho, 19% das espécies foram identificadas como pertencentes ao gênero *Candida*. Dentre estas, foram encontradas espécies reconhecidas como oportunistas, como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* (KURTZMAN et al., 2011). A espécie *C. albicans* é um patógeno oportunista presentes nas fezes, no entanto, pode ser encontrada em águas naturais (MEDEIROS et al., 2008). *Candida glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* têm sido relatadas como agentes etiológicos de candidíases (KURTZMAN et al., 2011). A ocorrência destas espécies nos fitotelmos estudados pode estar vinculada a utilização destes ambientes por pequenos animais de sangue quente (como pequenos roedores), que deixariam ali fezes contaminadas por estas leveduras.

Cryptococcus foi o segundo gênero com maior ocorrência de espécies (12%). Espécies deste gênero estão distribuídas em quatro ordens: *Tremellales*, *Thichosporonales*, *Filobasidiales* e *Cystofilobasidiales* (KURTZMAN et al. 2011). Representantes dessas ordens são encontrados nos mais variados ambientes (FONSECA et al., 2011). Na superfície foliar existe uma predominância de espécie não pigmentas de *Cryptotoccus* (principalmente *Cr. laurentii*) (FONSECA e INÁCIO, 2006). Espécies dos gêneros *Rhodotorula* (11%) e *Pseudozyma* (9%) também foram representativas neste trabalho,

sendo que espécies desses gêneros são facilmente isoladas como associadas ao filoplano (FONSECA e INÁCIO, 2006).

Aproximadamente 65% das leveduras identificadas neste trabalho são de afinidade basidiomicética e 35% de afinidade ascomicética. Gomes e colaboradores (2015) também encontraram predominância de leveduras basidiomicéticas associadas com fitotelmo de *V. minarum* na Serra da Piedade. Outros trabalhos também relatam que as populações de leveduras do fitotelmos de bromélias são dominadas por basidiomicetos (HAGLER et al., 1993; AZEVEDO, 1998; LANDELL, et al., 2006). Fonseca e Inácio (2006) descrevem que comunidades obtidas de superfície de plantas como folhas, flores, frutos imaturos ou intactos foram dominadas por leveduras basidiomicéticas. Landell e colaboradores (2009) observaram que 94% dos isolados de leveduras de bromélias do Parque do Itapuã, Rio Grande do Sul apresentaram afinidade basidiomicética. Uma hipótese para a maior ocorrência de leveduras basidiomicéticas em fitotelmos seria a maior resistência destes micro-organismos à radiação solar (HAGLER, 1993). Araújo e colaboradores (1998) verificaram que as comunidades de leveduras nos fitotelmos expostos à luz solar intensa foram dominadas por espécies de basidiomicetos, enquanto que as bromélias localizadas em habitats sombreados apresentavam predominantemente leveduras ascomicéticas. As leveduras basidiomicéticas geralmente produzem polissacarídeos extracelulares em abundância o que as protegeria contra a dissecação e radiação solar (STARMER e LACHANCE, 2011). Outra hipótese seria o perfil nutricional destas leveduras, muito mais amplo do que de leveduras ascomicéticas, o que facilitaria a utilização dos nutrientes disponíveis nos fitotelmos, muitos deles polissacarídeos complexos.

Tabela 2. Número de espécies exclusivas e total de leveduras de cada comunidade de cada fitotelmo estudado e compartilhamento de espécies entre duas ou mais comunidades.

	<i>Bromelia karatas</i>	<i>Paepalanthus bromelioides</i>	<i>Encholirium</i> sp.	<i>Vriesea minarum</i>
Exclusivas	19	20	6	7
Total	45	40	29	24
%Compartilhamento	57.8	50.0	79.3	70.8

As espécies *C. edaphicus*, *C. glabrata*, *C. intermedia*, *C. nivariensis*, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis*, *C. pseudointermedia*, *Cr. flavescens*, *Cr. heveanensis*, *Cr. laurentii*, *Cr. nemorosus*, *Cr. rajasthanensis*, *Cr. terrestris*, *H. luteola*, *H. pagnoccae*, *H. zaeae*, *K. mangroviensis*, *M. caribbica*, *M. guilliermondii*, *O. externus*, *P. hubeiensis* e *Rh. mucilaginoso* ocorreram em ambos os fitotelmos das brômeliadas coletadas no Tocantins. As espécies de leveduras que ocorreram em ambos fitotelmos em Minas Gerais foram: *Anomalomyces panici*, *An. yakirrae*, *C. heveicola*, *C. ubatubensis*, *Cr. flavus*, *Cr. laurentii*, *Cr. nemorosus*, *Gymnocinctria samanensis*, *P. hubeiensis*, *P. jejuensis*, *Rh. mucilaginoso*, *Rhodotorula* sp., *Tilletiopsis minor* e *T. globispora*. Análise de diversidade beta de Whittaker (β_w) mostrou que ocorreu uma relação significativa entre localidade e plantas amostradas que podem ser melhor visualizadas na tabela 3 e figura 5. Este índice mostra o quão similares ou diferentes são duas comunidades, variando de 0, para comunidades similares, a 1, para comunidades bastante heterogêneas.

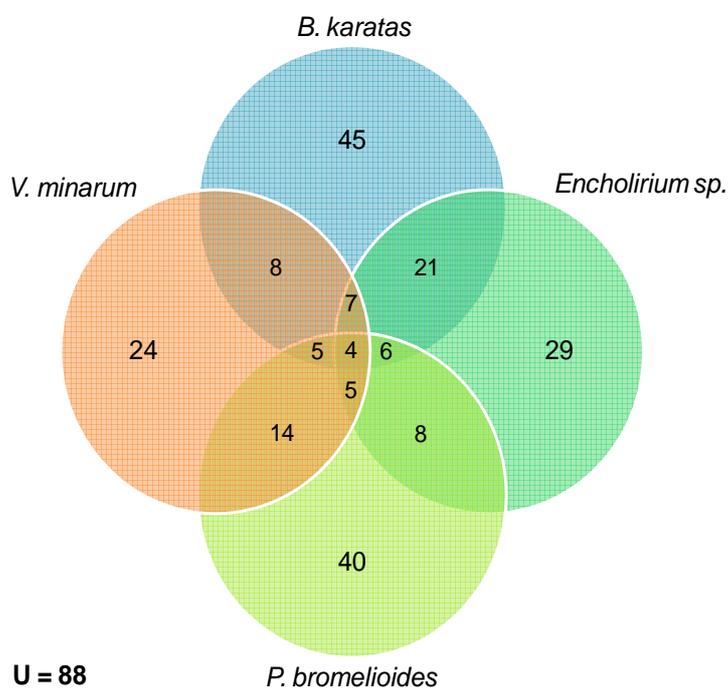


Figura 4. Diagrama de Venn mostrando o número total de espécies de leveduras e o compartilhamento de espécies entre comunidades de leveduras dos fitotelmos estudados.

No presente trabalho, os resultados mostraram que houve um compartilhamento maior de espécies de leveduras entre os fitotelmos coletados na mesma região do que em regiões diferentes (Fig. 5). Esta similaridade entre ambientes mais próximos pode estar relacionada à maior probabilidade de colonização dos fitotelmos pelas leveduras por meio de vetores que utilizem ambos os substratos (RECHE et al., 2005). No geral, fatores locais ou pontuais têm grande influência na riqueza e composição da comunidade (RECHE et al., 2005). Fatores regionais (exemplo, distância entre os ambientes) também podem influenciar na estruturação de diferentes comunidades microbianas (MARTINY et al., 2006). Fatores locais como características do solo, ou a vegetação local próxima aos fitotelmos podem também estar influenciando as comunidades de leveduras nestes ambientes.

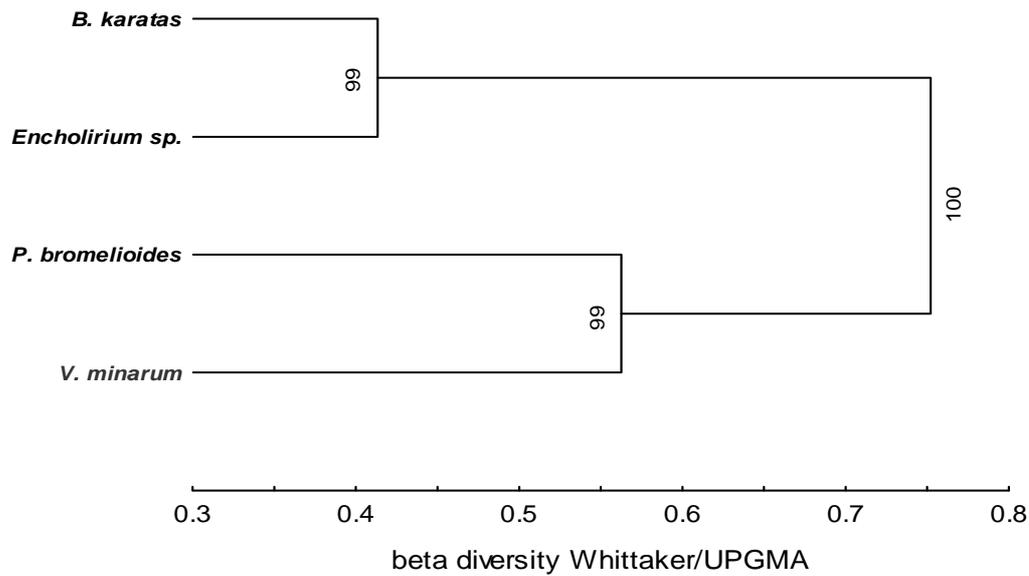
Tabela 3 – Diversidade beta de Whittaker (B_w) para as comunidades encontradas nos quatros fitotelmos.

	<i>Bromelia karatas</i>	<i>Encholirium sp.</i>	<i>Paepalanthus bromelioides</i>	<i>Vriesea minarum</i>
<i>B. karatas</i>	0			
<i>Encholirium sp.</i>	0.413	0		
<i>P. bromelioides</i>	0.765	0.771	0	
<i>V. minarum</i>	0.768	0.704	0.563	0

Valores variam de 0 a 1 e representam compartilhamento de espécies. Quanto maior o valor de B_w , menor o número de espécies compartilhadas entre duas comunidades, analisadas par a par.

*A medida de Whittaker (β_w) é obtida pela equação: $\beta_w = (S/\alpha) - 1$, em que S= número total de espécies; α = número médio de espécies.

a)



b)

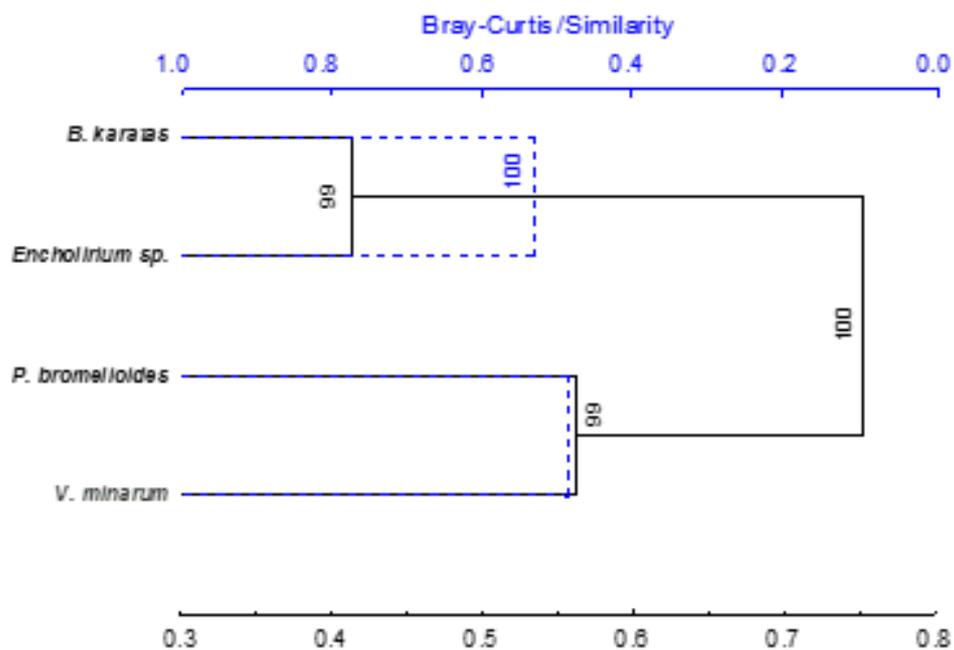


Figura 5. Dendrograma a partir da (a): diversidade beta de Whittaker (β) com algoritmo de agrupamento UPGMA (Correlação cofenética* = 0.933; $P < 0.001$; ver Tabela 3 para valores par-a-par) e (b): índice de similaridade de Bray-Curtis com algoritmo de agrupamento Paired Group (Correlação cofenética* = 0.995; $P < 0.001$). Em ambos os casos 999 aleatorizações foram empregadas.

*O ajuste entre as matrizes β de Whittaker e de abundância e seus respectivos dendrogramas foram estimados pelo coeficiente de correlação cofenética.

No presente trabalho foram analisados os índices de Dominância (D) e Simpson (1-D) que expressam a diversidade das comunidades levando em consideração a riqueza e equitabilidade (Fig. 6). A distribuição das espécies nos fitotelmos amostrados foi similar com relação a diversidade, pois estes apresentaram valores muito próximos, não havendo diferenças significativas no padrão de distribuição das espécies. Os valores do índice de equitabilidade de Simpson ($E_{1/D}$) foram muito similares, $1/D=0,943$, $1/D=0,934$, $1/D=0,921$ para os fitotelmos de *B. karatas*, *P. bromelioides*, *Encholirium* sp., respectivamente. Este resultado sugere que ocorreu uma distribuição similar das comunidades de leveduras nestes fitotelmos. Já no fitotelmo de *V. minarum*, o valor do índice de equitabilidade foi de $1/D=0,814$. Neste fitotelmo ocorreu uma dominância da espécie de levedura *P. jejuensis* (35 isolados), sendo este o valor mais baixo encontrado mostra que quanto maior a dominância, menor será a equitabilidade. A espécie *P. jejuensis* foi isolada inicialmente de folhas de laranja na Coréia do Sul (SEO et al., 2007), e foi isolada em alta frequência, no presente trabalho, tanto em fitotelmo de *V. minarum* quanto de *P. bromelioides*. Algumas espécies do gênero *Pseudozyma* são relatas por serem usadas na indústria farmacêutica e médica (WANG et al., 2006), e como produtores de biosurfactantes (MORITA et al., 2006). As espécies *M. guilliermondii* (19 isolados), *C. pseudointermedia* (19), *C. orthopsilosis* (17 isolados) e *Cr. heveanensis* (16 isolados) apresentaram a maior taxa de dominância nos fitotelmos de *B. karatas*; já as espécies *Cr. heveanensis* (21 isolados) e *C. glabrata* (11 isolados) foram dominantes nos fitotelmos da bromélia *Encholirium* sp. Em *P. bromelioides*, as espécies que apresentaram uma maior dominância foram *Anomalomyces yakirrae* (19 isolados), *P. jejuensis* (19) e *Cr. nemorosus* (12 isolados).

A heterogeneidade ambiental pode exercer uma grande influência na diversidade e composição das comunidades, no entanto, ambientes muito similares podem apresentar comunidades microbianas mais homogêneas (RECHE et al., 2005; SHADE et al., 2008). Este fato pode explicar a maior similaridade observada no presente trabalho entre as comunidades de leveduras de uma mesma região. A importância da heterogeneidade ambiental

em promover o aumento da riqueza de espécies é conhecida, entretanto a observação deste padrão em micro-organismos ainda é pouco estudada.

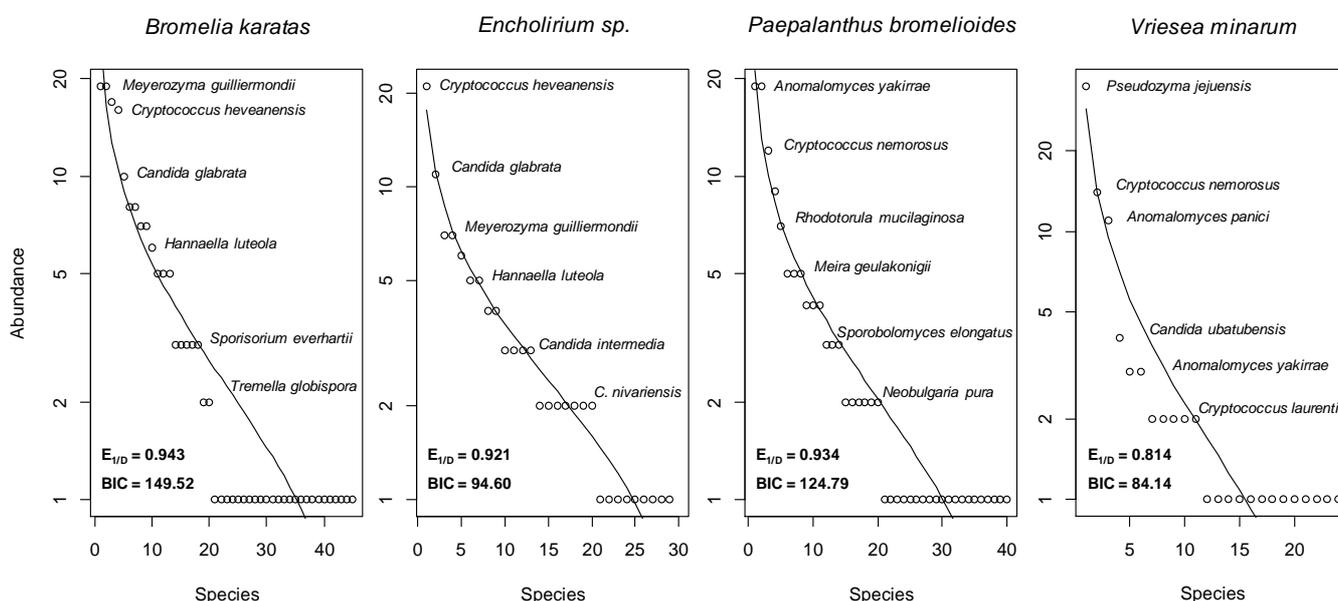
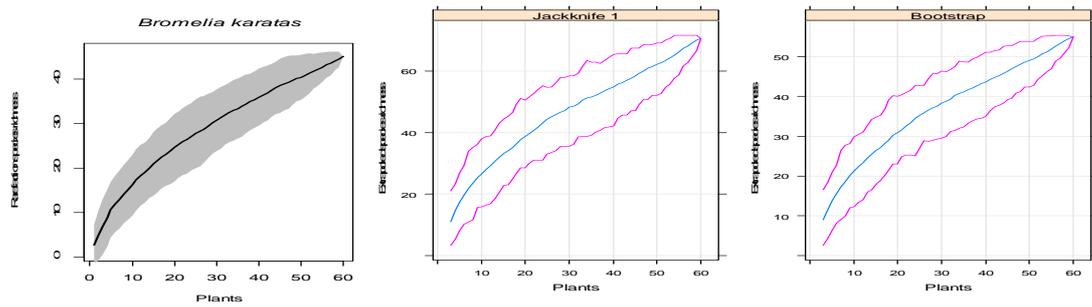


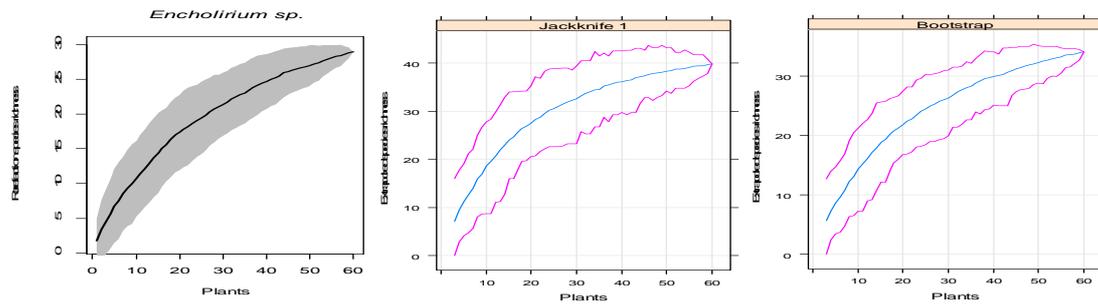
Figura 6. Padrão de distribuição da abundância das espécies de leveduras associadas com fitotelmos (*Bromelia karatas*, *Encholirium sp.*, *Paepalanthus bromelioides*, e *Vriesea minarum*). Em cada caso, os valores do índice de equitabilidade de Simpson ($E_{1/D}$), os valores do critério de informação bayesiana (BIC) do modelo com melhor ajuste, e alguns táxons de leveduras foram representados. Em todos os casos, o padrão de distribuição da abundância foi log-normal.

Neste trabalho também foram analisadas as curvas de acumulação de espécies, que permitem comparar os dados obtidos com métodos e esforços de coletas diferentes. Tais medidas possibilitam estimar o número total de espécies numa determinada comunidade a partir dos dados amostrados. As curvas de acumulação das espécies de leveduras mostram que em todas as comunidades de fitotelmos, a estabilização das curvas não foi obtida. Além disso, a riqueza de espécies, baseada nas estimativas de incidência, reforça que o esforço amostral ou método de isolamento empregado não foi suficiente para conhecer toda a diversidade de leveduras presente nestes substratos. Em síntese, os resultados sugerem que outras espécies de leveduras poderiam ser encontradas com o aumento do número amostral (Fig. 7).

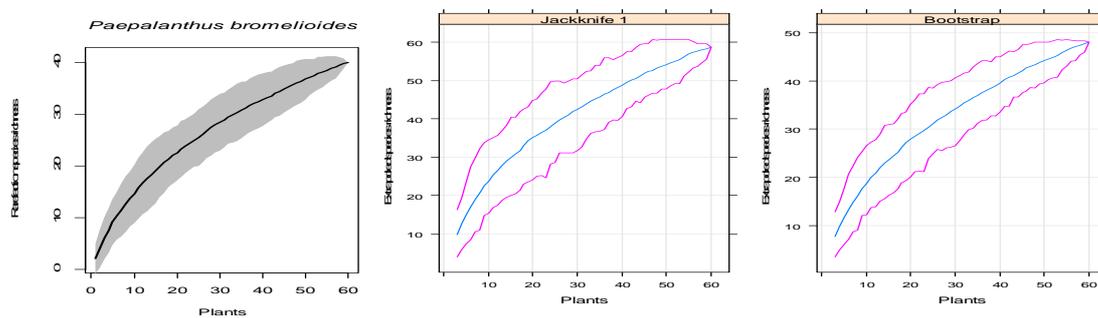
a:



b:



c:



d:

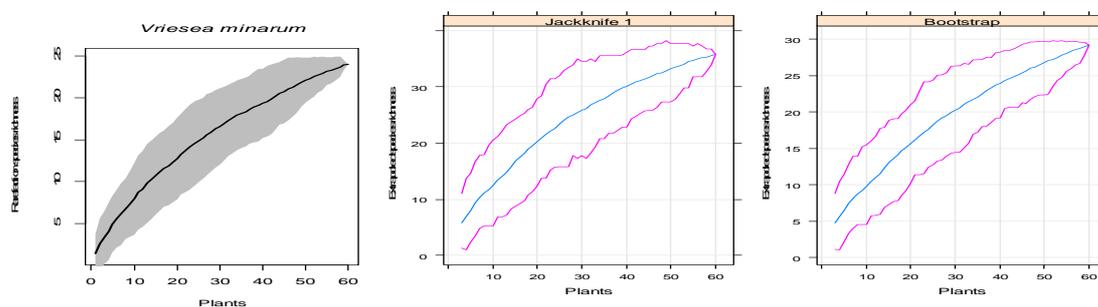


Figura 7. Curva de acumulação de espécies usando a curva de rarefação de indivíduo (à esquerda) e extrapolação de riqueza (S_p) com erros-padrão de espécies, com base em dois estimadores: primeiro jackknife ($S_{p_{jack1}}$) e de bootstrap ($S_{p_{Boot}}$) (direita). (a) – comunidades de *Bromelia karatas*, (b) – *Encholirium sp.*, (c) – *Paepalanthus bromelioides* e (d) – *Vriesea minarum*.

5.2 – Densidade populacional das leveduras

As densidades das espécies de leveduras nos fitotelmos amostrados variaram de 0,70 a 4,03 Log.UFC/mL em fitotelmos de *B. karatas* (Fig. 8); de 0,70 a 3,73 Log.UFC/mL em fitotelmo de *Encholirium* sp. (Fig. 9). Para os fitotelmos de *P. bromelioides*, as densidades variaram de 0,70 a 4,25 Log.UFC/mL (Fig. 10); e nos fitotelmos de *V. minarum* variaram de 0,70 a 3,82 Log.UFC/mL (Fig. 11).

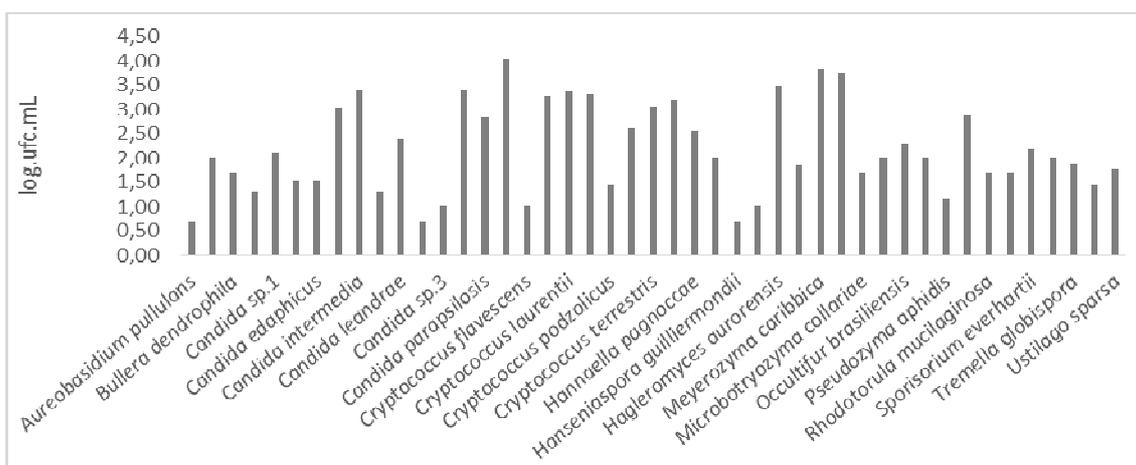


Figura 8 – Densidade populacional, em log de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por volume (mL) de água dos fitotelmos, das espécies de leveduras identificadas em *Bromelia karatas*, coletadas no Município de Aurora do Tocantins.

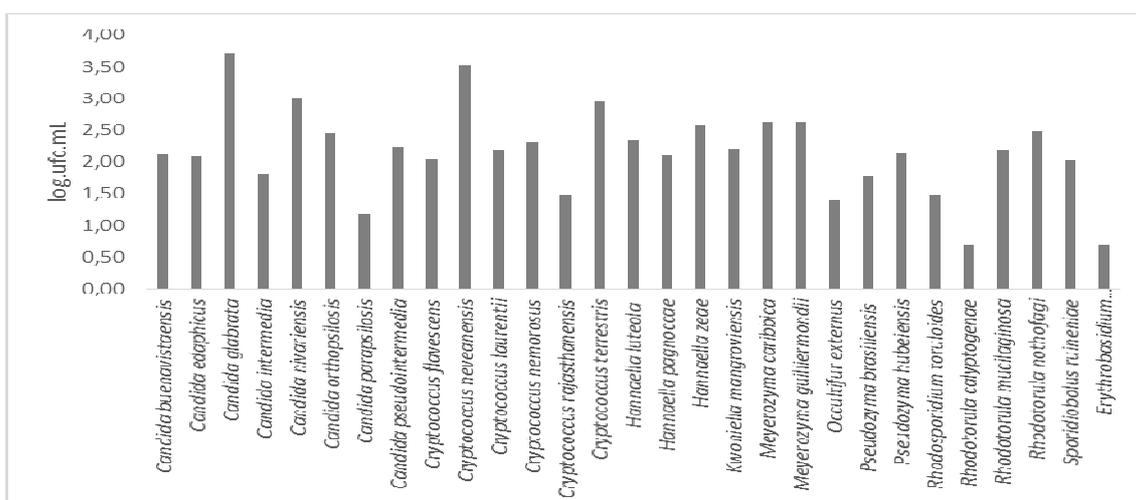


Figura 9 – Densidade populacional, em log de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por volume (mL) de água dos fitotelmos, das espécies de leveduras identificadas em *Encholirium* sp., coletadas no Município de Aurora do Tocantins.

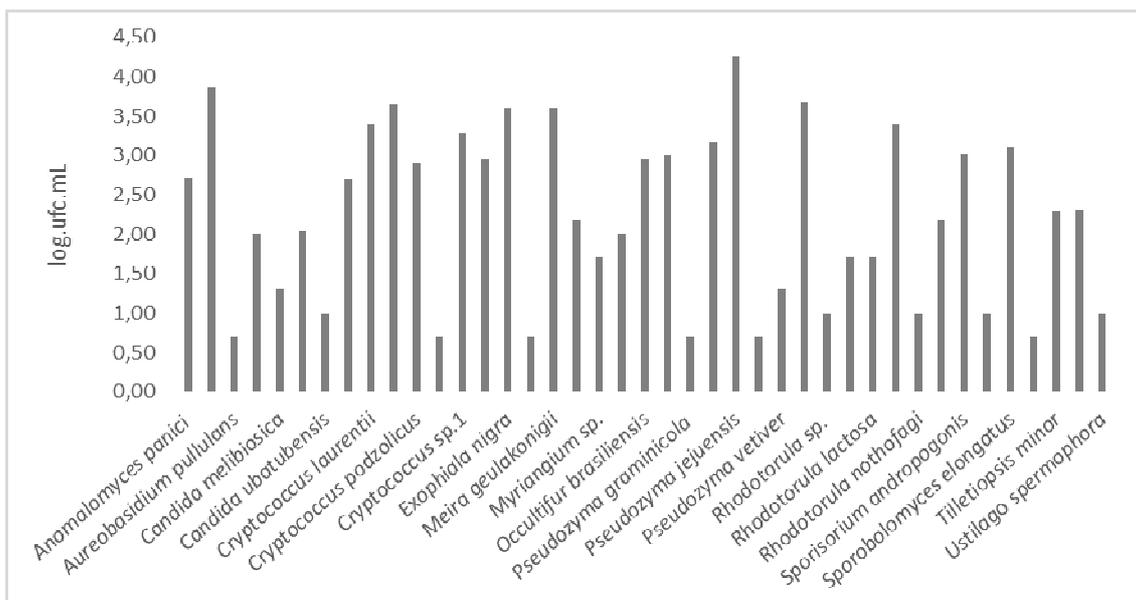


Figura 10 – Densidade populacional, em log de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por volume (mL) de água dos fitotelmos, das espécies de leveduras identificadas nos fitotelmos de *Paepalanthus bromelioides*, coletadas na Serra do Cipó.

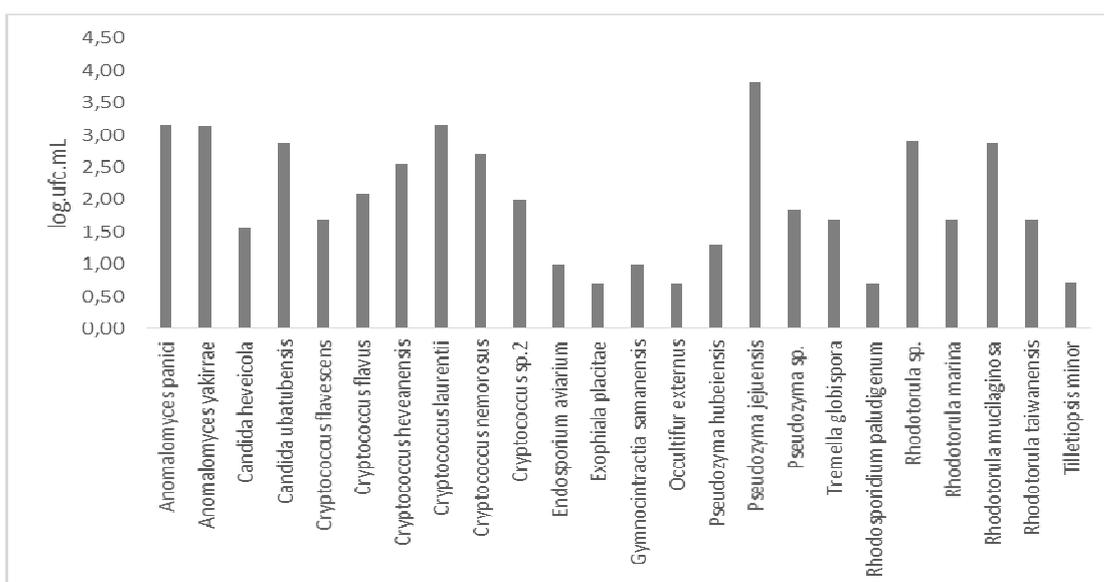


Figura 11 – Densidade populacional, em log de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por volume (mL) de água dos fitotelmos, das espécies de leveduras identificadas nos fitotelmos de *Vriesea minarum*, coletadas na Serra do Cipó.

Nos fitotelmos de *B. karatas*, a espécie *C. pseudointermedia* apresentou a maior contagem populacional, e as espécies *A. pullulans*, *C. nivariensis* e *Hanseniaspora guilliermondii* apresentaram as menores densidades. Nos fitotelmos de *Encholirium* sp. a espécie que apresentou maior densidade foi *C.*

glabrata e as menores densidades foram de *Rh. calyptogenae* e *E. hasegawianum*. A espécie *P. jejuensis* apresentou maiores densidades nos fitotelmos de *P. bromelioides* e *V. minarum*. Nos fitotelmos de *P. bromelioides* as espécies de leveduras com menores densidades foram *A. pullulans*, *Cr. rajasthanensis*, *G. samanensis*, *P. graminicola*, *P. rugulosa* e *Sp. japonicus*. Já nos fitotelmos de *V. minarum*, as espécies de leveduras que ocorreram em menor densidade *E. placitae*, *O. externus*, *R. paludigenum* e *T. minor*.

5.3 – Espécies novas

Algumas espécies de leveduras identificadas não apresentaram sequências dos domínios D1/D2, identidades igual ou acima de 99% com as espécies depositadas no GenBank, podendo representar possíveis novas espécies. No presente trabalho foram isoladas 13 possíveis espécies novas, sendo duas já descritas formalmente, *Hannaella pagnoccae* (Anexo I) e *Hagleromyces aurorensis* (Anexo II).

5.3.1 – *Candida* sp.1

A espécie *Candida* sp.1 (número de acesso no GenBank KM527112) apresentou diferença de 33 pares de bases na região D1/D2 do gene do rRNA e 32 pares de bases na região ITS-5.8S em relação a *C. bromeliacearum* (Fig. 12). Três isolados desta espécie foram obtidos dos fitotelmo de *B. karatas*, e um de flor desta espécie de bromélia (dado não mostrado). Possivelmente esta levedura pertence ao clado *Metschnikowia*, no entanto, outros genes devem ser seqüenciados para confirmar a posição filogenética desta espécie.

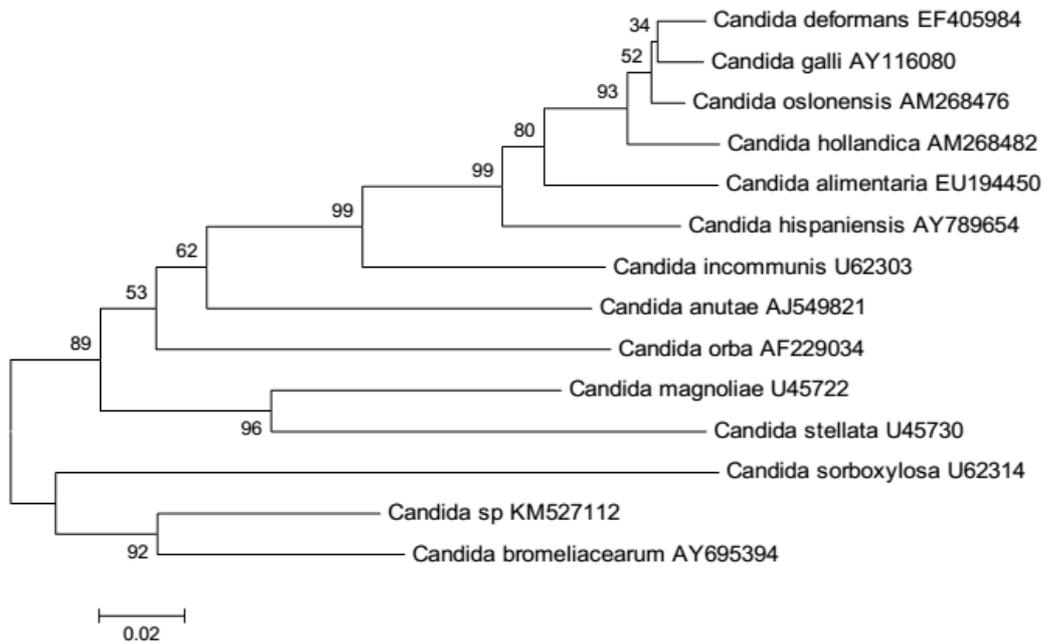


Figura 12: Árvore filogenética da espécie *Candida* sp.1 construída pelo método de “neighbor-joining” baseado no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. Foi utilizado um bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergência na sequência.

5.3.2 – *Candida* sp.2

Candida sp.2 (GenBank KF678435.1) apresentou diferença de 27 pares de bases na região D1/D2 do gene do rRNA com *Candida* sp. BCC 7771 e 40 ou mais pares de bases na região ITS-5.8S com as espécies *C. intermedia*, *C. pseudointermedia* e *C. flosculorum* (Fig.13). Esta espécie foi representada por apenas um isolado obtido de *B. karatas*. Esta nova espécie também pertence ao clado *Metschnikowia*.

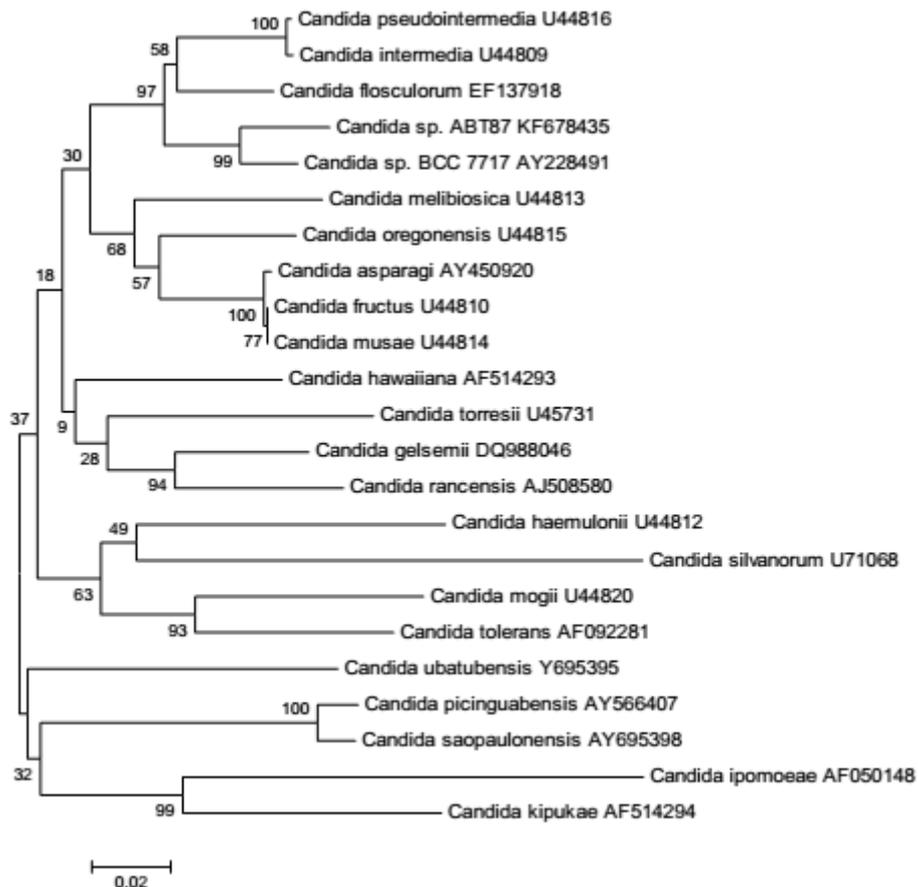


Figura 13: Árvore filogenética da espécie *Candida* sp.2 construída pelo método de “neighbor-joining” baseado no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. Foi utilizado um bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergência na sequência.

5.3.3 – *Candida* sp.3

A espécie *Candida* sp.3 (GenBank KF678436) apresentou 97 pares de bases diferentes nos domínios D1/D2 com a espécie *C. stellimalicola* (Fig. 14). No entanto, o valor de bootstrap é muito baixo, e a posição filogenética esta espécie ainda precisa ser melhor estudada. Esta espécie, representada por um isolado, foi obtida do fitotelmo de *B. karatas*. Possivelmente esta nova espécie pertence ao clado *Barnettomyza*

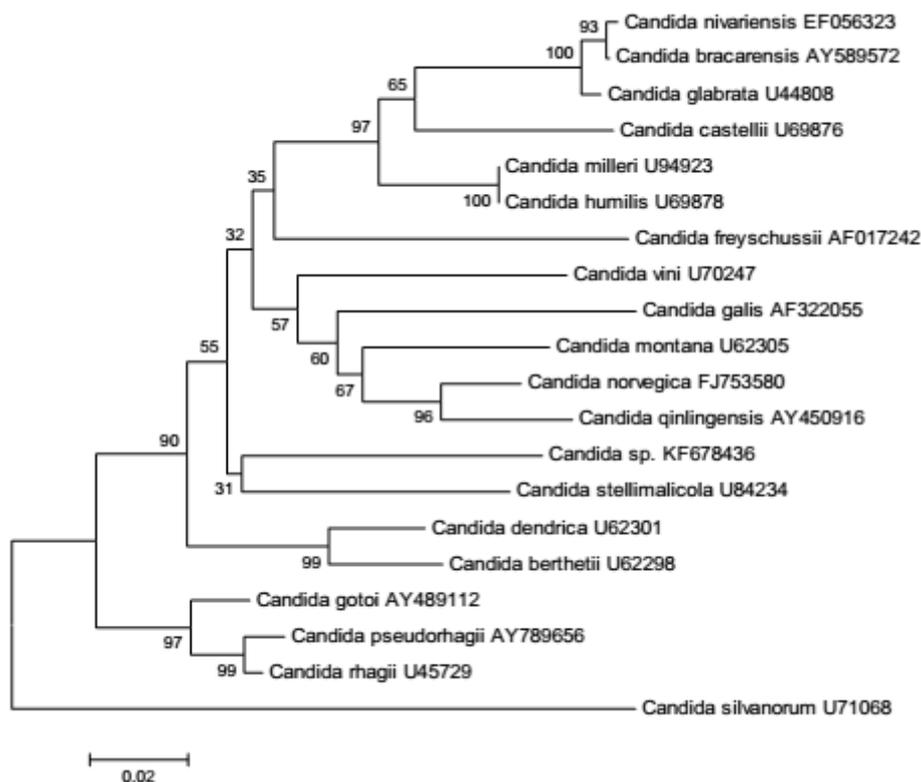


Figura 14: Árvore filogenética da espécie *Candida* sp.3 construída pelo método de “neighbor-joining” baseado no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. Foi utilizado um bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergência na sequência.

5.3.4 – *Cryptococcus* sp.1

A espécie *Cryptococcus* sp.1 (GenBank KM527122) apresentou diferença de 1 par de base na região D1/D2 do gene do rRNA para a linhagem *Cryptococcus* sp. CBS 11770 (Fig. 15), e 17 pares de bases na região ITS-5.8S com *Cryptococcus* sp. SN-82. Esta nova espécie pertence ao grupo Filobasidiales. Três isolados desta espécie foram obtidos dos fitotelmos de *P. bromelioides*.

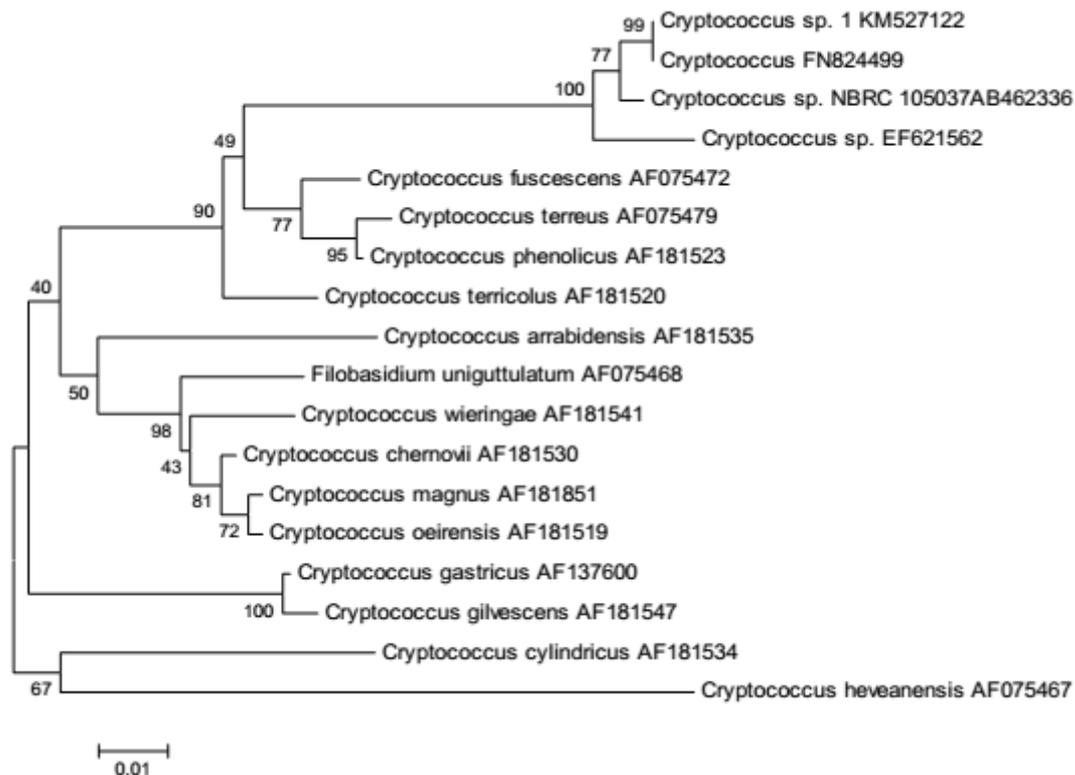


Figura 15: Árvore filogenética da espécie *Cryptococcus* sp. 1 construída pelo método de “neighbor-joining” baseado no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. Foi utilizado um bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergência na sequência.

5.3.5 – *Cryptococcus* sp. 2

Cryptococcus sp.2 apresentou 66 pares de bases diferentes nos domínios D1/D2 em relação a espécie *Cryptococcus flavus*, mas também foi próxima de *Cr. skinneri* (Fig. 16). Esta espécie pertence ao grupo Tremellales e foi representada por um isolado obtido do fitotelmo da bromélia *V. minarum*.

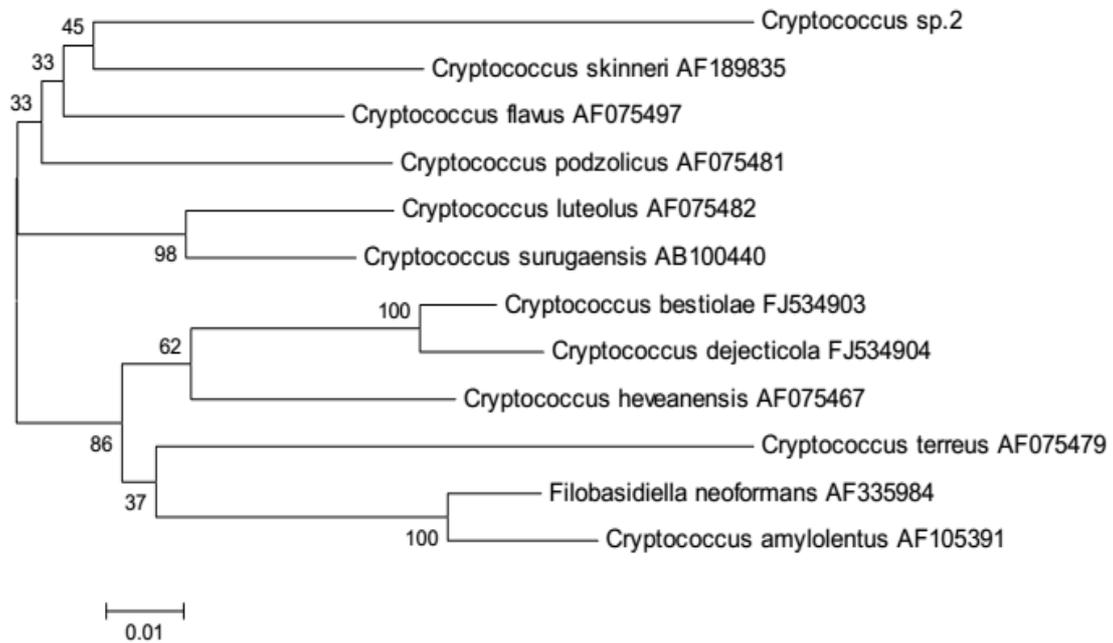


Figura 16: Árvore filogenética da espécie *Cryptococcus sp. 2* construída pelo método de “neighbor-joining” baseado no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. Foi utilizado um bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergência na sequência.

5.3.6 – *Pichia sp.1*

A espécie *Pichia sp.* apresentou 100% de identidade com a espécie *Pichia cf. insulana* TO4.2.1 (Fig.17), coletada de tecidos necrosados dos cactos *Cereus saddianus* e de *Micranthocereus dolichospermaticus* em Aurora do Tocantins. Esta nova espécie apresentou nove diferenças na região D1/D2 em relação a linhagem tipo de *P. insulana*. No presente trabalho, um isolado desta espécie foi obtido de *B. karatas*.

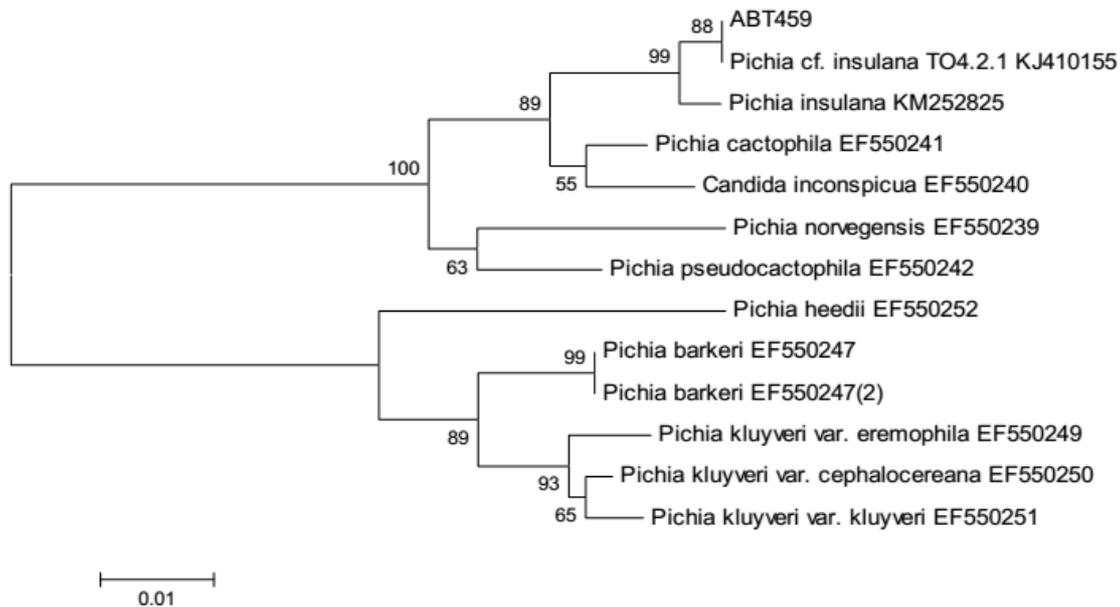


Figura 17: Árvore filogenética da espécie *Pichia* sp. construída pelo método de “neighbor-joining” baseado no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. Foi utilizado um bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergência na sequência.

5.3.7 – *Pseudozyma* sp1.

Para a espécie *Pseudozyma* sp. foram obtidos dois isolados do fitotelmo de *V. minarum*, e esta espécie apresentou 100% de identidade nas regiões D1/D2 e ITS com a espécie *Pseudozyma* sp. UFMG-BRO110B (Fig. 18), também obtida de fitotelmo de bromélia *V. minarum*. Esta espécie possivelmente representa o estágio leveduriforme de um fungo Ustilaginales parasita de planta.

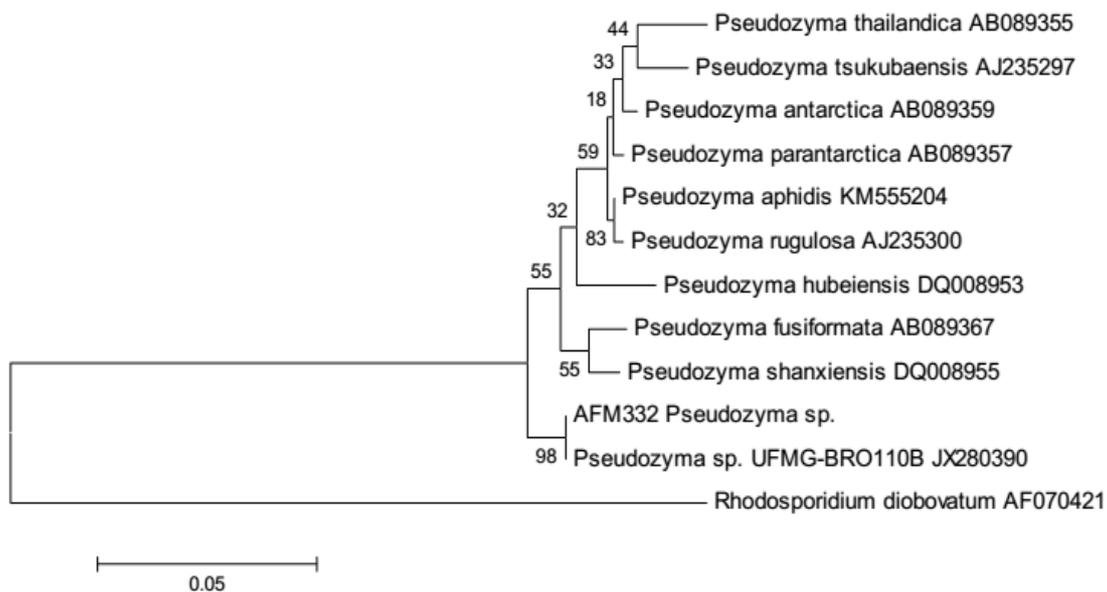


Figura 18: Árvore filogenética da espécie *Pseudozyma* sp. construída pelo método de “neighbor-joining” baseado no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. Foi utilizado um bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergência na sequência.

5.3.8 – *Tremella* sp.

A *Tremella* sp. (GenBank KM527118.1) apresentou 11 pares de bases diferentes na região do gene D1/D2 e 44 pares de bases diferente na região ITS com a espécie *Tremella globispora* (Fig. 19). Esta espécie foi representada por apenas um isolado obtido do fitotelmo de *B. karatas*.

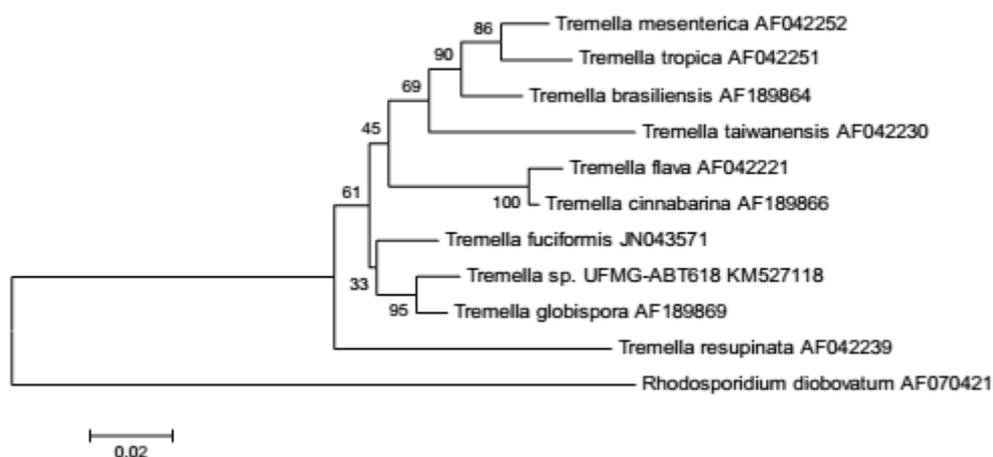


Figura 19: Árvore filogenética da espécie *Tremella* sp. construída pelo método de “neighbor-joining” baseado no sequenciamento da região D1/D2 no gene do rRNA. Foi

utilizado um bootstrap de 1000 interações e a barra de escala mostra a proporção de divergência na sequência.

5.3.9 – *Hannaella pagnoccae*

Uma espécie nova do gênero *Hannaella* foi obtida nos fitotelmos de *B. karatas* e *Encholirium* sp. Descrita como *Hannaella pagnoccae* sp. nov. (LANDELL et al., 2014). Isolados da espécie *Hannaella pagnoccae* (Anexo I) foram obtidos a partir de estudos independentes de leveduras associadas com diferentes materiais vegetais e solo em diferentes partes do mundo. A descrição da espécie foi baseada nos resultados obtidos para 32 isolados obtidos nos estados de Tocantins, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Rio de Janeiro, no Brasil, e ainda em Oklahoma (EUA), Hsinchu (Taiwan) e Bangkok (Tailândia). No Tocantins foram obtidos sete isolados pertencentes à esta espécie, sendo três isolados de fitotelmos da bromélia *Encholirium* sp., um isolado do fitotelmo de *B. karatas* e três isolados de água acumulada em rocha (dados não mostrados). O gênero compreende sete espécies reconhecidas: *H. coprosmaensis*, *H. kunmingensis*, *H. luteola*, *H. oryzae*, *H. sinensis*, *H. surugaensis* e *H. zaeae*. Espécies deste gênero ocorrem na superfície das folhas das plantas e são consideradas habitantes do filoplano (BOEKHOUT et al., 2011, LANDELL et al., 2014).

5.3.10 – *Hagleromyces* gen, nov.

Um novo gênero foi identificado, *Hagleromyces* gen. nov., a partir do fitotelmo de *B. karatas* (SOUSA et al., 2014). Este gênero foi descrito a partir de três isolados obtidos de *B. karatas*, e que apresentaram contagens populacionais de aproximadamente 2,28 Log.UFC.mL. Análises das sequências combinadas da região SSU (subunidade menor do gene do rRNA) e dos domínios D1/D2 do gene do rRNA mostraram que os isolados obtidos pertencem ao clado *Saccharomycetaceae* (Fig. 20), porém estes não apresentaram nenhuma relação próxima com quaisquer espécies descritas em

Saccharomycotina. Sendo assim, foi proposto o gênero *Hagleromyces* gen. nov., descrição com a espécie *Hagleromyces aurorensis* sp. nov. (SOUSA et al., 2014) (Anexo II). A nova espécie tem um perfil fisiológico restrito, somente assimilando sete fontes de carbono dos 41 testados, o que é típico de algumas leveduras do clado *Saccharomycetaceae*. Este resultado sugere que a nova espécie é provavelmente copiotrófica e reside em habitats com altas concentrações de fontes de carbono simples.

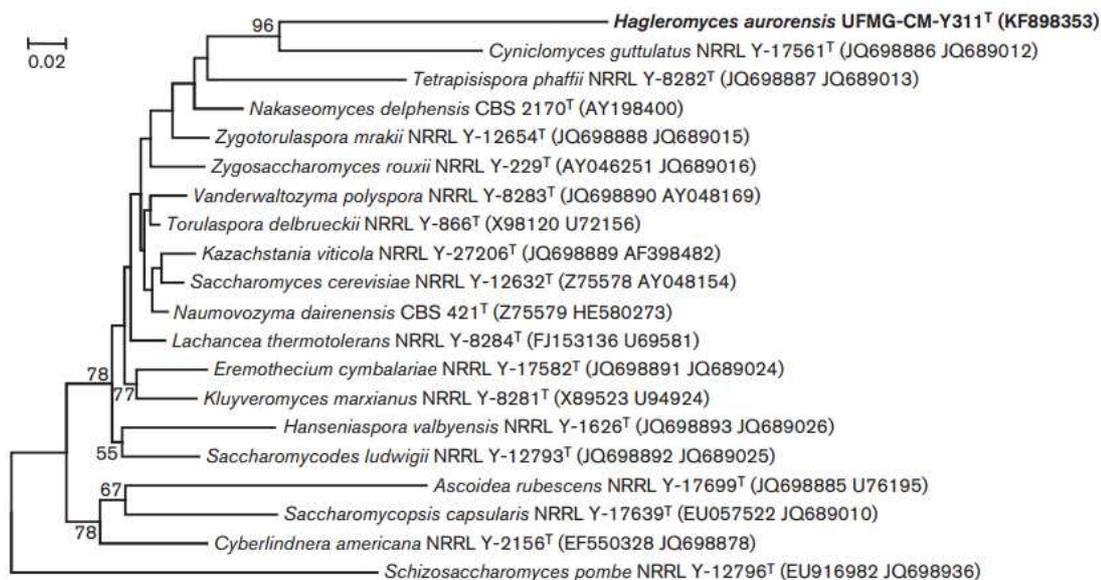


Figura 20 – Árvore filogenética usando o método Maximum Likelihood obtida das sequências combinadas da região SSU e domínio D1/D2 da LSU do gene rRNA de *H. aurorensis* sp. nov. (SOUSA et al., 2014). O modelo Kimura 2-parâmetros com distribuição Gama foi usado para calcular a distância filogenética. Valores bootstrap são de >50% são mostrados.

5.3.11 – Outras possíveis novas espécies

A espécie *Meira* sp.1 apresentou 15 pares de bases diferentes na região D1/D2 e 51 pares de bases diferentes para a região ITS com a espécie *Meira* sp. UFMG-BRO-101B, também isolada de fitotelmos da bromélia *V. minarum* (GOMES et al., 2015). Dois isolados desta nova espécie foram obtidos dos fitotelmos de *P. bromelioides*. A espécie *Myriangium* sp. apresentou 14 pares de bases diferentes em relação à *Myriangium* sp. UFMG-BRO197, outra linhagem também isolada de fitotelmos de bromélias (GOMES et al., 2015).

Apenas um isolado desta espécie foi obtido a partir de amostras de *P. bromelioides*. A espécie *Rhodotorula* sp. apresentou 24 pares de bases diferentes em relação à *Rhodotorula cycloclastica*. Dois isolados desta nova espécie de *Rhodotorula* foram obtidos no presente trabalho, sendo um *P. bromelioides* e outro de *V. minarum*.

6. – CONCLUSÕES

- Os fitotelmos de *B. karatas* apresentaram a maior diversidade de leveduras dentre os substratos pesquisados. Isto pode estar relacionado a uma maior disponibilidade de matéria orgânica e nutrientes disponíveis neste substrato, em relação aos outros fitotelmos estudados;
- Fitotelmos das plantas estudadas apresentaram uma alta riqueza de espécies de leveduras, sendo algumas espécies consistentemente isoladas destes substratos. Portanto, sugere-se que estas comunidades de leveduras sejam típicas destes habitats. Estas comunidades seriam compostas em sua maioria por espécies generalistas.
- Espécies de leveduras capazes de causar infecções oportunistas no homem também foram encontradas, como *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. albicans*. Estas espécies podem estar associadas com animais de sangue quente que visitam estes substratos;
- Além das setenta e cinco espécies de leveduras identificadas já conhecidas na literatura, foram identificadas treze possíveis novas espécies de leveduras, indicando que os fitotelmos representam uma fonte potencial para a descoberta de novas espécies destes micro-organismos. Destas espécies, duas já tiveram a descrição publicada, *Hannaella pagnoccae* sp. nov., que foi isolada dos fitotelmos de *B. karatas* e de *Encholirium* sp.; e *Hagleromyces aurorensis* gen. nov., que foi isolada somente do fitotelmo de *B. karatas*;
- A composição de espécies de leveduras das comunidades dos fitotelmos de bromélias foi mais similar entre as bromélias da mesma localidade, sugerindo que a heterogeneidade regional pode influenciar na composição das espécies; e que vetores similares poderiam estar carreando as leveduras entre os diferentes fitotelmos na mesma região.

7. – REFERÊNCIAS

AIDOO, K.K.; ROB NOUT, M.J.; SAKAR, P.K. 2006. Occurrence and function of yeast in Asian indigenous fermented foods. *FEMS Yeast Res.* 6: 30-39.

AMORIM, A.M.; LEME, E.M.C. 2009. Two new species of *Quesnelia* (Bromeliaceae: Bromelioideae) from the Atlantic rainforest of Bahia, Brazil. *Brittonia*, 61: 14-21.

ANDRADE, M. J. G.; GIULIETTI, A. M.; RAPINI, A. QUEIROZ, L. P.; CONCEIÇÃO, A. S.; ALMEIDA, P. R. M.; VAN DEN BERG, C. 2010. A comprehensive molecular phylogenetic analysis of Eriocaulaceae: evidence from nuclear (ITS) and plastid (*psbA-trnH* and *trnLtrnF*) DNA sequences. *Taxon* 59: 379–388.

ANDREWS, J.H.; HARRIS, R. F. 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Ann. Rev. Phytop.*, 38: 145-180.

ARAÚJO, F. V.; MEDEIROS, R. J.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. 1998. A preliminary note on yeast communities of bromeliad-tank waters of Rio de Janeiro. *Brazil. Rev Microbiol.* 29:118–121.

ARAÚJO, F.V.; ROSA, C.A.; FREITAS, L.F.D.; LACHANCE, M.A.; VAUGHAN-MARTINI, A.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; HAGLER, A.N. 2012. *Kazachstania bromeliacearum* sp. nov., a yeast species from water tanks of bromeliads. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1002-1006.

BANDONI, R. J. 1995. Dimorphic Heterobasidiomycetes: taxonomy and parasitism. *Stud Mycol* 39, 13-28.

BARNET, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. 2000. *Yeasts: characteristics and identification.* (3rd edition). Cambridge University Press, Cambridge.

BELLOCH, C.; QUEROL, A.; GARCIA, M.; D.; BARRIO, E. 2000. Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *Inter. J. Syst. and Evol. Microbiol.* v.50, p.405-416.

BENZING, D.H. 2000. *Bromeliaceae: Profile an Adaptive Radiation*. Cambridge, Cambridge University Press.

BLACKWELL, M.; SPATAFORA, J.W.S. 2004. Fungi and their allies. In: *Biodiversity of fungi: Standard Methods for Inventory and Monitoring*. Ed. G. M. Mueller, G. F. Bills, and M. Foster. New York: Academic.

BOTHA, A. 2011. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biol. Biochem.* 43:1-8.

CADETE, R. M.; MELO, M. A.; DUSSAN, K. J.; RODRIGUES, R. C.; SILVA, S. S.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J. S.; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. 2012. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian forest. *PLoS One*, 7(8), e43135.

CLOETE, K.J.; VALENTINE, A.J.; STANDER, M.A.; BLOMERUS, L.M.; BOTHA, A. 2009. Evidence of symbiosis between the soil yeast *Cryptococcus laurentii* and a Sclerophyllous Medicinal Shrub, *Agathosma betulina* (Berg) Pillans. *Microb. Ecol.* 57: 624-632.

COSTA, F. N.; TROVÓ, M.; SANO, P. T. 2008. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. *Megadiversidade*. 4 (1-2): 98-97.

DANIEL, H-M.; SORRELL, T. C.; MEYER, W. 2001. Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs. *Inter. J. Syst. and Evol. Microbiol.* v.51, p.1593 -1606.

FELL, J.W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as

determined by large-subunit Rdna D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1351-1371.

FONSECA, A.; BOEKHOUT, T.; FELL, J. W. *Cryptococcus* Vuillemin (1901). In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W. & Boekhout, T. *The Yeasts a Taxonomic Study*. 5^a ed. Elsevier, v.3, p.1661-1738, 2011.

FONSECA, A.; INACIO, J. Phylloplane yeasts. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. The Yeast Handbook. C. A. Rosa; G. Peter (Eds.). Springer-Verlag, Heidelberg, Alemanha, pp. 263-301. 2006.

GARNER, C.D.; STAR, J.R.; McDONOUGH, P.L.; ALTIER, C. 2010. Molecular identification of veterinary yeast isolates by use of sequence-base analyses of the D1/D2 region of the large ribosomal subunit. *J. Clin. Microbiol.* 48: 2140-2146.

GIULIETTI, A. M.; SCATENA V. L.; SANO, P. T.; PARRA, L. R.; QUEIROZ, L. P.; HARLEY, R. M.; MENEZES, N. L.; YSEPON, A. M. B.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; RICCI, C. V.; BONFIM, M.C.P.; MIRANDA, E.B. 2000. Multidisciplinary studies on neotropical Eriocaulaceae. In: K. L. Wilson & D. A. Morrison (eds). *Monocots: Syst. and Evol.* CSIRO, Melbourne, Austrália. pp 580-589.

GIVNISH, T.J.; K. C. MILLAM; P. E. BERRY; K. J. SYTSMA. 2007. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from ndh F sequence data. In J. T. Columbus, E. A. Friar, J. M. Porter, L. M. Prince, and M. G. Simpson [eds.]. *Monocots: Comparative biology and evolution — Poales*, 3 – 26. California, USA.

GOMES, F. C. O.; SAFAR, S. V. B.; MARQUES, A. R.; MEDEIROS, A. O.; SANTOS, A. R. O.; CARVALHO, C.; LACHANCE, M. A.; SAMPAIO, J. P.; ROSA, C. A. 2015. The diversity and extracellular enzymatic of yeasts isolated from water tanks of *Vriesea minarum*, an endangered bromeliad species in

Brazil, and the description of *Occultifur brasiliensis* f.a., sp. nov. *Ant. van Leeuwenhoek*. 107: 597-611.

GOULIAMOVA, D.; DIMITROV, R.; PETROVA, R.; STOYANCHEVA, G.; PETROV, K. 2009. Genomic approaches to yeast taxonomy. *Biot. Biotechnol. Equip.* (Special edition/on-line), 519-523.

HAGLER, A.N.; ROSA, C.A.; MORAIS, P.B.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; FRANCO, G. M.; ARAÚLO, F.V.; SOARES, C.A.C. 1993. Yeasts and coliform bacteria of water accumulated in bromeliads of mangrove and sand dune ecosystems of southeast Brazil. *Can. J. Microbiol.* 39: 973-977.

HIRASAWA, R.; YOKOIGAWA, K.; ISOBE, Y.; KAWAIM H. 2001. Improving the freeze tolerance of bakers yeast by loading with trehalose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 522-526.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em julho de 2014

INÁCIO, J.; RODRIGUES, M.G.; SOBRAL, P.; FONSECA, A. 2005. Characterisation and classification of phylloplane yeasts from Portugal related to the genus *Taphrina* and description of five novel *Lalaria* species. *FEMS Yeast Res.* 4: 541-555.

KINDT, R.; VAN, D. P.; SIMONS, A. J. 2006. Patterns of species richness at varying scales in western Kenya: planning for agroecosystem diversification. *Biodivers. Conserv.* 15: 3235–3248.

KURTZMAN, C.P. 2006. New species and new combinations in the yeast genera *Kregervanrija* gen. nov., *Saturnispora* and *Candida*. *FEMS Yeast Res.* 6: 288-297.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. 2006. Yeast systematics and phylogeny: Implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: Rosa,

C. A. & Peter, G. (Ed.). Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. *The Yeast Handbook*. Heidelberg, Springer, p. 11-30.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T (Ed.). *The Yeasts: a taxonomic study*. 5th edition. Elsevier, 2011.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Ant. van Leeuwenhoek*, v. 73, p. 331-371.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. 2013. Relationships among genera of the *Saccharomycotina* (*Ascomycota*) from multigene phylogenetic analysis of type species. *FEMS Yeast Res.* 13: 23-33.

KUTTY, S. N.; PHILIP, R.; DAMODARAN, R. 2013. Marine yeasts in the slope sediments of Arabian sea and bay of Bengal. *Europ. J. Exper. Biol.* 3 (3): 311-27.

LOPES, M.B.; SODEN, A.; MARTENS, A.L.; HENSCHKE, P.A.; LANGRIDGE, P. 1998. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 279-286.

LACHANCE, M. A. Yeast diversity: how many and how much? In: Rosa, C. A. & Peter, G. (Ed.) Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. *The Yeast Handbook*. Heidelberg, Springer, p. 1-10, 2006.

LACHANCE, M. A. 2011. Yeasts. In: Els Chichesler, South-East England. John Willey e Sons. p. 1-12.

LACHANCE, M. A.; BOWLES, J.M.; STARMER, W.T. 2003. Geography and niche occupancy as determinants of yeast biodiversity: the yeast-insect-morning glory ecosystem of Kīpuka Puaulu, Hawaii. *FEMS Yeast Res.* 4: 105-111.

LACHANCE, M. A.; DOBSON, J.; WIJAYANAYAKA, D. N.; SMITH, A. M. E. 2010. The use of parsimony network analysis for the formal delineation of phylogenetic species of yeasts: *Candida apicola*, *Candida azyma*, and *Candida parazyma* sp. nov., cosmopolitan yeasts associated with floricolous insects. *Ant. van Leewenhoek*, v. 97, p.155-170.

LACHANCE, M. A.; STARMER, W. T. 2011. Ecology and Yeasts. In: Kurtzman, C.P.; Fell, J.W.; Boekhout, T. *The Yeasts a Taxonomic Study*. 5 ed. Elsevier. v. 1, p. 65-83, 2011.

LANDELL, M.F.; BILLODRE, R.; RAMOS, F.P.; LEONCINI, O.; VAINTEIN, M.H.; VALENTE, P. 2010. *Candida aechmeae* sp. nov. and *Candida vrieseae* sp. nov., novel, yeast species isolated from the phylloplane of bromeliads in Southern Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 244-248.

LANDELL, M. F.; BRANDÃO, L. R.; SAFAR, S. V.; GOMES, F. C. O.; FELIX, C. R.; SANTOS, A. R. O.; PAGANI, D. M.; RAMOS, J. P. BROETTO, L.; MOTT, T.; VAINSTEIN, M. H.; VALENTE, P.; ROSA, C. A. 2015. *Bullera vrieseae* sp. nov., a new tremellaceous yeast species isolated from bromeliads. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*

LANDELL, M.F.; INÁCIO, J.; FONSECA, A.; VAINSTEIN, M.H. VALENTE, P. 2009. *Cryptococcus bromeliarum* sp. nov. na orange-coloured basidiomycetous yeast isolated from bromeliads in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 910-913.

LANDELL, M.F.; MAUTONE, J.N.; VALENTE, P. 2006. Biodiversity of yeasts associated to bromeliads in Itapuã Park, Viamão/PS. *Biociências*, Porto Alegre, 14: 144-149.

LEME, E.M.; MARIGO, L. C. 1993. Bromeliads in the Brazilian from Bahia, Brazil. *J Brom. Soc.* 55: 13-22.

LITI, G.; CARTER, D.M.; MOSES, A.M. 2009. Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*, v.458, p.337-341.

LOPES, M.B.; SODEN, A.; MARTENS, A.L.; HENSCHKE, P.A.; LANGRIDGE, P. 1998. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 279-286.

MADEIRA, B. G.; ESPÍRITO-SANTO, M. M.; NETO, S.D.; NUNES, Y. R. F.; AZOFEIFA, A. S.; FERNANDES, G. W.; QUESADA, M. 2009. Changes in tree and liana communities along a successional gradient in a tropical dry forest in south-eastern Brazil. *Plant Ecol.* 291: 291-304.

MAGURRAN, A. E. (2004). *Measuring Biological Diversity*. Blackwell. Malden, MA, USA. 256 pp

MARQUES, A.R.; FILHO, J.P.L. 2008. Fenologia reprodutiva de espécies de bromélias na Serra da Piedade, MG, Brasil. *Acta. Bot. Bras.* 22(2):417-424.

MARRERO, C.; GARCIA, J.E.; FARRERA, J.; MENDONZA, M.; STAMBURY, N.; BATISTA, R.; SCHARGEL, W. 1996. Invertebrados asociados a las bromélias en el Parque Nacional General Cruz Carrillo. Guaramacal ed. Trujillo, Venezuela. v. 12.

MEDEIROS, A. O.; ROCHA, P.; ROSA, C. A.; GRAÇA, M. A. S. 2008. Litter breakdown in a stream affected by drainage from a gold mine. *Arch. Hydrobiol.* 172: 59 – 70.

MIRANDA, E. B.; GIULIETTI, A. M. 2001. Eriocaulaceae no Morro do Pai Inácio (Palmeiras) e Serra da Chapadinha (Lençóis), Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Sitientibus série Ciências Biológicas.* 1(1): 15-32.

MORAES, L.F.D.; CAMPELO, E.F.C.; CORREIA, M.E.F.; PEREIRA, M.G. 2007. Biomassa microbiana em áreas em processo de restauração na reserva biológico de Poço das Antas, RJ. *Rev. Caatinga*, 20: 54-63.

MORAIS, P.B.; ROSA, C.A.; PAGNOCCA, F. Yeast Communities in Tropical Rain Forests in Brazil and other South America Ecosystems. In Rosa, C. A. & Peter, G. (Ed.) Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. *The Yeast Handbook. Heidelberg*, Springer, p. 461-500, 2006.

MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. 2006. Analysis of expressed sequence tags from the anamorphic basidiomycetous yeast, *Pseudozyma antarctica*, which produces glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. *Yeast*. 23: 661–671.

NAGAHAMA, T. 2006. Yeast biodiversity in freshwater, marine and deep-sea environments. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp. 241-262). Springer Berlin Heidelberg.

NAKASE, T. 2000. Expanding world of ballistospore yeasts: distribution in the phyllosphere systematics and phylogeny. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46:189-216.

NORVELL, L. L. Fungal nomenclature. 2011. Melbourne approves a new code. *Mycotaxon*, v.116, p.481-490.

NUNES, J.V.C. Bromélias. In: *Sustentável Mata Atlântica*. Simões, L.L.; Lino, C.F. (Eds). SENAC, São Paulo, 2003, PP. 117-130.

OKSANEN, J.; BLANCHETT, F.G., KINDT, R., LEGENDRE, P., MINCHIN, P.R., O'HARA, R.B., et al. 2012. Vegan: community ecology package. R Package 2.0.3 Available from <http://CRAN.R-project.org/package=vegan> [accessed 20 May 2012]

PAULA, C.C. Cultivo de bromélias. Viçosa: Aprenda Fácil. 2000. 139p.

RECHE, I.; PULIDO-VILLENA, E.; MORALES-BAQUERO, R.; CASAMAYOR, E. 2005. Does ecosystem size determine aquatic bacterial richness? *Ecology*. 86:1715–1722.

ROBIGLIO, A. 2011. Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. *Int. J. Food Microbiol.*, 147, 3:211-216.

ROCHA, C.F.D.; COGLIATTI-CARVALHO, L.; NUNES-FREITAS, A.F.; ROCHA-PESSOA, T.C.; DIAS, A. S.; ARIANI, C.V.; MORGADO, L.N. 2004. Conservando uma larga proporção da diversidade biológica através da conservação de *Bromeliaceae*. *Vidalia*, Viçosa, MG, 2: 52-68.

RUIVO, C.C.C.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A.; BACCI Jr., M.; PAGNOCCA, F.C. 2005. *Candida bromeliacerum* sp. nov. and *Candida ubatubensis* sp. nov., two yeast species isolated from the water tanks of *Canistropsis seidelii* (*Bromeliaceae*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 2213-2217.

SAFAR, S.V.B.; GOMES, F.C.O.; MARQUES, A.R.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. 2013. *Kazachstania rupicula* sp. nov., a yeast species isolated from water tanks of a bromeliad in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63:1165-1168.

SAMPAIO, J. P. 2011. *Rhodotorula* Harrison (1928). In: Kurtzman CP, Fell J, Boekhout T (eds) *The yeasts: a taxonomic study*. 5th edn. Elsevier, Amsterdam, pp 1873–1927.

SAMPAIO, J.P.; FONSECA, A. 1995. Physiological aspects in the systematics of heterobasidiomycetous yeasts. *Stud. Mycol.* 38: 29-46.

SAZIMA, I.; VOGEL, S.; SAZIMA M. 1989. Bat pollination of *Encholirium glaziovii*, a terrestrial bromeliad. *Plant Syst. Evol.* 168:167–179.

SEO, H. S.; UM, H. J.; MIN, J.; RHEE, S. K.; CHO, T. J.; KIM, Y. H.; LEE, J. 2007. *Pseudozyma jejuensis* sp. nov., a novel cutinolytic ustilaginomycetous yeast species that is able to degrade plastic waste. *FEMS yeast research*, 7(6): 1035-1045.

SILVA-BEDOYA, L.M.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; OSORIO-CADAVID, E. 2014. Yeast diversity associated to sediments and water from two Colombian artificial lakes. *Brazil. J. Microbiol.* 45 (1): 135-142.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol. Reviews*, v. 36, n. 2, p. 288 – 305.

SIQUEIRA-FILHO, J.A.; LEME, E.M. 2006. Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste: biodiversidade, conservação e suas bromélias. Andrea Jackbsson Estúdio Editorial, Rio de Janeiro.

SRIVASTAVA, D. S.; VELLEND, M. 2005. Biodiversity ecosystem function research: is it relevant to conservation? *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 36:267-294.

SUGITA, T.; NAKAJIMA, M.; IKEDA, R.; MATSUSHIMA, T.; Shinoda, T. 2002. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichisporon* species. *J. of Clin. Microbiol.* p.1826-1830.

STARMER, W. T.; LACHANCE, M. A. 2011. Yeast Ecology. In.: Kurtzman, C.P.; Fell, J.W.; Boekhout, T. *The Yeasts a Taxonomic Study*. 5 ed. Elsevier. v. 1, p. 65-83, 2011.

VALENTE, P.; BOEKHOUT, T.; LANDELL, M.F.; CRESTANI, J.; PAGNOCCA, F.C.; et al. 2012. *Bandoniozyma* gen. nov., a genus fermentative and non-fermentative tremellaceous yeast species. *PLOS One*. 7(10): e46060.

VERSIEUX, L. M.; WENDT, T. 2006. Checklist of *Bromeliaceae* of Minas Gerais, Brazil, with notes on taxonomy and endemismo. *Selbyana*, 27: 107-146.

WANG, Q. M.; JIA, J. H.; BAI, F. Y. 2006. *Pseudozyma hubeiensis* sp. nov. and *Pseudozyma shanxiensis* sp. nov., novel ustilaginomycetous anamorphic yeast species from plant leaves. *Inter. J. Syst. and Evol. Microbiol.*, 56(1), 289-293.

WHITTAKER, R. H. 1960. Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs*, 30, p. 279–338.

WHITTAKER, R.H. 1965. Dominance and diversity in land plant communities: numerical relations of species express the importance of competition in community function and evolution. *Science*, 147(3655): 250–260.

8. – ANEXOS

Anexo I

Anexo I – *Hannaella pagnoccae* sp. nov., a tremellaceous yeast species
isolated from plants and soil

Anexo II

Hagleromyces gen. nov., a yeast genus in the *Saccharomycetaceae*, and description of *Hagleromyces aurorensis* sp. nov., isolated from water tanks of bromeliads.