UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA E CONSERVAÇÃO NOS TRÓPICOS

HECTOR MAURICIO CASANOVA NAVARRO

DIVERSIDADE E TAXONOMIA POLIFÁSICA DE LEVEDURAS ASSOCIADAS À FAMÍLIA BROMELIACEAE NA MATA ATLÂNTICA SETENTRIONAL

MACEIÓ - ALAGOAS
Fevereiro/2018

HECTOR MAURICIO CASANOVA NAVARRO

DIVERSIDADE E TAXONOMIA POLIFÁSICA DE LEVEDURAS ASSOCIADAS À FAMÍLIA BROMELIACEAE NA MATA ATLÂNTICA SETENTRIONAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Conservação da Biodiversidade Tropical.

Orientadora: Profª. Drª.Melissa Fontes Landell

MACEIÓ - ALAGOAS
Fevereiro/2018

Catalogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

C335d Casanova Navarro, Hector Mauricio.
Diversidade e taxonomia polifásica de leveduras associadas àfamília Bromeliaceae na Mata Atlântica Setentrional.
setentrional / Hector Mauricio Casanova Navarro. – 2018.
112 f. : il.

Orientadora: Melissa Fontes Landell.
Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2015.

Inclui bibliografias.
Anexos: f. 105-112.
1. Comunidade - Leveduras. 2. Neotrópico. 3. Fatores biogeográficos. 4. Bromélias. 5. Mata Atlântica – Nordeste (Brasil). I. Título.

CDU: 582.282.23

Folha de aprovação

Hectór Maurício Casanova Navarro

DIVERSIDADE E TAXONOMIA POLIFÁSICA DE LEVEDURAS ASSOCIADAS À FAMÍLIA BROMELIACEAE NA MATA ATLÂNTICA SETENTRIONAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Diversidade e ecologia de organismos tropicais.

Dissertação aprovada em 28 de fevereiro de 2018.

Profa. Dra. Melissa Fontes Landell/UFAL
Orientadora

Profa. Dra. Patrícia Valente da Silva/UFRGS
(membro titular)

Prof. Dr. André Rodrigues/UNESP
(membro titular)

Prof. Dr. Gilberto Costa Justino/UFAL
(membro titular)

MACEIÓ - AL
Fevereiro / 2018

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Blanca, por sere minha mentora, meu exemplo e minha vida.Meus irmãos Jaz, Johanna, Duwan e Andres por sempre ter uma palavra de apoio neste caminho, meus sobrinhos Juan, Aleja e Sarita “dream machine” por todo o amor desinteressado e sua inocência, a meu pãe, a minha noiva Ivon por seusacrifício, tolerância, força, o superego (sensus Freud) e pelo amor brindado nesta etapa de minha vida, a Simón por sua amistades, carinho e por compartilhar o amor de sua mãe para comigo. Aos meus demais familiares e amigos em especial ao Dr. Alfonso Pineda “Pocho” por toda sua colaboração e tempo acadêmico;

Agradeço a Dra. Melissa Fontes Landell por todos os ensinamentos nestes dois anose demias contribuições;

Os meus amigos do laboratório e colegas Ciro, Gustavo, James,Neilma e demais colegas que contribuíram neste processo;

Aos professores do PPG-DIBICT por terem me acolhido no programa;

Às entidades ambientais responsáveis pela emissão das autorizações para coletar o material no campo, o Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio), os representantes do Parque Memorial Quilombo dos Palmares, Fundação de Amparo Pesquisa de Alagoas (FAPEAL), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Federal de Alagoas;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela outorgação da bolsa através do programa PEC-PG e financiamento da pesquisa.

RESUMO

As florestas tropicais são ecossistemas com uma elevada riqueza de biodiversidade e ocupam cerca de 7% da superfície terrestre. O bioma da Mata Atlântica é uma representação dessas florestas pluviais, contendo altas taxas de endemismo e considerado uma prioridade de conservação. As bromélias são plantas predominantemente neotropicais, reconhecidas como hotspots regionais de diversidade devido à sua capacidade de formar associações com diferentes táxons e portanto, usadas como sistemas modelo para a ecologia. O conhecimento que se tem sobre a diversidade de leveduras associadas ao filoplano (superfície das folhas) e o tanque de água (fitotelma) das bromélias tem sido relevante nos últimos 20 anos, mas ainda existem várias lacunas sobre os fatores estruturantes dessas comunidades e como elas são mantidas através das diferentes regiões. O objetivo deste trabalho foi descrever a diversidade taxonômica de leveduras, focando na descrição de espécies novas associadas ao filoplano (folhas) e antosfera (estruturas florais) de bromélias coletadas em quatro locais da Mata Atlântica do Norte de Alagoas - Brasil, como bem determinar seus possíveis padrões de distribuição geográfica. No total, identificamos 303 leveduras e relatamos uma riqueza de 114 espécies, cerca de 50% delas classificaram como possíveis espéciesnovas, e houve uma prevalência (86%) de filo Basidiomycota no filoplano. A análise da diversidade alfa da comunidade de leveduras no local de Maceió mostrou os maiores valores de riqueza de espécies S = 42 e índice de Shannon-Weaver H’ = 3,524, bem como uma menor dominância (0,03893) em comparação com os outros locais amostrados. Os quatro locais de amostragem apresentaram uma alta heterogeneidade que nãofoi explicada por nenhum dos fatores ambientais medidos, nem por fatores geográficos como a distância entre os pontos e sua distância ao equador. No entanto, observamos em todos os locais uma relação significativa entre a riqueza e a composição das espécies de leveduras e bromélias, sugerindo uma relação entre as leveduras e seus hospedeiros. As bromélias foram ratificadas como um modelo ecológico e um substrato preponderante para estudos com leveduras, em particular para o isolamento e descrição de novos taxa.

Palavra-chave: Comunidade de leveduras. Neotrópico. Fatores biogeográficos.

ABSTRACT

The tropical rain forests are ecosystems with a high biodiversity richness that occupy about 7% of the terrestrial surface. The Atlantic Forest biome is a representing of these pluvial forests, containing high rates of endemism and considered a conservation priority. Bromeliads are predominantly Neotropical plants, recognized as regional hotspots of diversity due to its capability to form associations with different taxa and therefore used as model systems for ecology. Knowledge about the diversity of yeasts associated with phylloplane (leaf surface) and bromeliad water tank (phytotelma) has been relevant in the last 20 years, but there are still several gaps left over the structuring factors of these communities and how these are maintained across different regions. The objective of this work was to describe the taxonomic yeast diversity, focusing on the description of new species associated with the phylloplane (leaves) and antosphere (floral structures) of bromeliads collected at four sites of the Northern Atlantic Forest of Alagoas - Brazil, as well as to determine their possible patterns of geographic distribution. In total, we identified 303 yeast and reported a richness of 114 species, about 50% of them classified as possible new species, and there was a prevalence (86%) of phylum Basidiomycota on phylloplane. Alpha diversity analysis of yeast community at Maceio site showed the highest values of species richness S = 42 and Shannon-Weaver index H '= 3.524, as well as a lower dominance (0.03893) compared to the other sites sampled. The four sampling sites showed a high heterogeneity was not explained by any of environmental factors measured nor by geographic factors such as the distance between the points and their distance to the equator. However, we observed in all sites a significant relationship between the richness and composition of yeast and bromeliad species, suggesting a relationship between the yeasts and their hosts. Bromeliads were ratified as an ecological model and a preponderant substrate for studies with yeasts, in particular for the isolation and description of new taxa.

Key-word: Yeasts community. Neotropic.Biogeographic factors.

Lista de Figuras

Figura 1: Fitofisionomias da Floresta Atlântica, Floresta Ombrófila Densa; Floresta Ombrófila Mista; Floresta Ombrófila Aberta; Floresta Estacional Semidecidual; Floresta Estacional Decidual; Campos de Altitude; Áreas das Formações Pioneiras, Restingas 19

Figura 2: Extensão da Floresta Atlântica Neotropical (Mata Atlântica) edos biomas associados (Caatinga, Cerrado, Chaco) 20

Figura 3: Alterações composicionais na cobertura vegetal na Mata Atlântica gerada pelos processos antrópicos de fragmentação e desflorestamento 21

Figura 4: Distribuição geográfica dos representantes da família Bromeliaceae 23

Figura 5: Estruturas morfológicas de bromélias: 1) Inflorescência, 2) Infrutescência, 3) Formação verticilada (roseta) das estruturas vegetativas 24

Figura 6: Classificação de eucariotas proposta por Adl e colaboradores (2005) ressaltandoo grupo que contém os fungos Opisthoconta.....26

Figura 7: Transições Trimórficas em *Candidaalbicans*. Na imagem da esquerda, descreve-se a transição de células de leveduras de *C. albicans* para pseudo-hifas(esquerda) e hifas (direita) como dois destinos diferentes no desenvolvimento. Para cada espécie, sofisticações nas transições têm evoluído individualmente, as quais devem ter surgido, como uma adaptação evolutiva para condições ambientais particulares. Adaptado de Heitman (2011) 28

Figura 8: Regiões utilizadas como *barcode* para leveduras (A) D1/D2 região LSU (subunidade maior) do rDNA (B) ITS, espaçador interno transcrito (ITS), localizado entre os genes SSR e LSR rDNA.....30

Figura 9: Dados geográficos das aproximadamente 7000 linhagensde leveduras disponíveis publicamente na coleção doCBS-KNAW - Westerdijk Fungal Biodiversity Institute.....32

Figura 10: Principais clados do filo Ascomycota, incluindo as três classes Archiascomycetes, Saccharomycetes e Euascomycetes.....34

Figura 11: Principais clados do filo Basidiomycota, incluindo os 4 subfilos Pucciniomycotina, Ustilaginomycotina, Agaricomycotina e Wallemiomycotina.....36

Figura 12: Atributos estruturais e função da filosfera. A filosfera se estende da superfície até os tecidos internos da folha e é o habitat de uma microbiota complexa que usam os açúcares e os nutrientes inorgânicos exsudados para a superfície da folha através da lixiviação. Os microorganismos colonizam os tecidos foliares internos a traves dos estomas e estruturas celulares em forma de canales. Adaptado de TAIZ;ZEIGER, (2010).....41

Lista de Tabelas e Gráficos

Tabela 1:Pontos de amostragem e datas de cada coleta na Mata Atlântica Setentrional.....46

Tabela 2: Distribuição taxonômica das espécies de levedurase suas respetivas frequênciasisoladas da antosfera de Bromélias e suas respectivas frequênciasobtidas nos 4 locais amostrados na Mata Atlântica Setentrional.....56

Tabela 3: Distribuição taxonômica das espécies de levedurase suas respetivas frequências isoladas do filoplano de bromélias obtidas nos 4 locais amostrados na Mata Atlântica Setentrional.....61

Tabela 4: Distribuição taxonômica das espécies novas de leveduras isoladas do filoplano de Bromélias e suas respectivas frecuências, obtidas nos 4 locais amostrados na Mata Atlântica Setentrional.....71

Tabela 5: Valores de índices de diversidade, baseados na estrutura das comunidades...78

Tabela 6: Matriz de diversidade beta obtida pelo índice de Whittaker.....83

Tabela suplementar 1: Lista das espécies de leveduras isoladas com suas frecuencias e a espécie de hospedeiros (bromélias) de onde foram isoladas. (As letras correspondem aotipo de substrato de isolamento, a = antosfera; f = fitotelma e as que apresentam só número correspondem ao filoplano) 111

Tabela suplementar 2: Lista das espécies de leveduras isoladas e seus respectivos códigos e número de deposito nas coleções de cultura e banco de dados do GenBank.....115

Gráfico 1: Proporções de leveduras isoladas de Bromélias com afinidade Ascomicética e Basidiomicética em relação ao substrato do isolamento (Antosfera e Filoplano) 54

Gráfico 2: Distribuição dos isolados de leveduras em relação ao substrato de isolamento em cada um dos locaisde coleta.....55

Gráfico 3: Grupos taxonômicos presentes nos quatro locaisamostrados.....64

Gráfico 4: Relação da composição deespécies de leveduras para os locais amostrados na porção setentrional do Bioma Mata Atlântica.....66

Gráfico 5: Grupos taxonômicos presentes nos quatrolocaisamostrados. A porcentagem indica afrequênciasde leveduras relacionadas a cada subfilo de Basidiomycota.....69

Gráfico 6: Composição e relação de bromélias (A) e leveduras (B), nos locais amostrados.....75

Gráfico 7: Dendrograma representando a composição de espécies de bromélias (A) e leveduras (B), para os 4 pontos de coleta, na Mata Atlântica Setentrional.....75

Gráfico 8: Espécies de leveduras encontradas nos quatro locais amostrados e suas respectivas frequências.....77

Gráfico 9: Curva de acumulação de espécies de leveduras associadas ao filoplano de Bromélias da Mata Atlântica Setentrional.....77

Gráfico 10: Proporção dos gêneros de leveduras pertencentes ao filo Ascomycota em cada local de amostragem na Mata Atlântica Setentrional.....81

Gráfico 11: Proporção dos gêneros de leveduras pertencentes ao filo Basidiomycota em cada local de amostragem na Mata Atlântica Setentrional.....82

Gráfico 12: Análises de regressão linear mostrando a dispersão entre a diversidade beta e a distância geográfica dos pontos de amostragem p= valor alfa; Cor= valor da correlação de Pearson; R2= Coeficiente de determinação.....84

Gráfico 13: Análises de regressão linear mostrando: (A) relação entre a diversidade beta de levedura e bromélias; (B) Relação entre riqueza de leveduras e nos pontos de amostragem p= valor alfa; Cor= valor da correlação de Pearson; R2= Coeficiente de determinação.....85

Sumário

Seção 1:Texto principal.....14
1. Introdução 15
2. Objetivos 18
3. Revisão de literatura 19
3.1 Mata Atlântica 19
3.2 Bromeliaceae.....22
3.3 Diversidade de Fungos.....25
3.4 Leveduras..... 28
3.4.1 Taxonomia de Leveduras 29
3.4.2 Filo Ascomycota 32
3.4.3 Filo Basidomycota.....34
3.5 Ecologia e Biodiversidade de Leveduras.....36
3.6 Associação Planta Micro-organismo.....38
3.6.1 Micro-organismos Associados a Filosfera de Plantas 39
3.6.2 Leveduras no Filoplano 42
4 Metodologia 45
4.1 Locais de amostragem 45
4.2 Coleta de dados, processamento e manutenção dos isolados.....45
4.3 Identificação taxonômica das bromélias.....47
4.4 Caracterização e Identificação das Leveduras 47
4.4.1 Descrição Fenotípica das leveduras 47
4.5 Extração de DNA genômico total 49
4.6 Sequenciamento das regiões ITS e D1/D2 do LSU gene 26SrDNA.49
4.7 Análises de diversidade.....51
5 Resultados 52
5.1Ás bromélias como modelo ecológico para leveduras na Mata Atlântica Setentrional região Nordeste de Brasil.....52
5.2Representatividade Taxonômica de Leveduras.....53
5.2.1 Representatividade dos filosBasidiomycota e Ascomycota.....53

5.2.1.1 Basidiomycota e Ascomycota na Antosfera 56
5.2.1.2Basidiomycota e Ascomycota no Filoplano.....60
5.2.2 Espécies Novas na Mata Atlântica Setentrional.....71
5.3 Relação entre a composição de bromélias e composição de leveduras nos locaisamostrados.....74
5.4 Diversidade de Leveduras 76
5.4.1 Diversidade alfa (α) 76
5.4.2 Diversidade beta (β) 82
6 Conclusões 87
7 Referências Bibliográficas.....88
8 Anexos (Tabelas suplementares 1 e 2) 100
Seção 2: Artigos.......107

Seção1: Texto Principal

1. Introdução

O Brasil temuma grande variedade de Biomas, entre estes a Mata Atlânticapresente em grande parte da região litorânea e é catalogada como uma das florestas úmidas tropicais mais biodiversas ecatalogadas como (*hotspot*). Porém, é fortemente ameaçado pelas ocupações do espaço geográfico gerados por atividades antrópicas (MYERS et al.2000; ROSADO et al.2012), assim como um dos que mais câmbios tem apresentado ao longo tempo evolutivo (SOBRAL-SOUZA, LIMA-RIBEIRO, SOLFERINI, 2015).

Análises contínuas dos remanescentes florestais e projeções da coberturavegetal do BiomaMata Atlântica evidenciam uma perda de mais de 90% de seus 1,5 milhões de quilômetros quadrados (Km²) originais.O restante (10%) apresentaum alto grau de fragmentação, afetando de maneira crítica os atributos biológicos, funcionais e ecossistêmicos das comunidades ali estabelecidas (BELLOet al. 2015; MAGNAGO et al. 2014; RIBEIRO et al. 2009; SOBRAL-SOUZA; LIMA-RIBEIRO; SOLFERINI, 2015).

A porção setentrional do Biomada Mata Atlântica (sensu Velloso et al. 1991) é considerada “corredor central biológico” associado ao centro de endemismo denominado “Pernambuco”, quejunta as florestas costeiras e os brejos de altitude dos estados de Alagoas, Paraíba e Pernambuco, apresentando uma diversa gama de serviços ecossistêmicos e suportando a maior biodiversidade deste Bioma(THOMAS et al. 1998, LIMAet al. 2015).

As bromélias são umas dasplantas vasculares com flores mais diversas nos ecossistemas brasileiros e a quarta mais importante no neotrópico, apresentando um alto grau de endemismo(BASÍLIO et al. 2015a; GIVNISH et al. 2011, 2014; MYERS et al. 2000). Esta família temcaracterísticas morfofisiológicas que favorecem as interrelações com macro e micro-organismos (LINDOW; BRANDL, 2003; GOFFREDI; JANG; HAROON, 2015), constituindo-se assim em *hotspots*regionais de biodiversidade econsideradasum modelo em miniatura para a ecologia por apresentar uma alta

sensibilidade a mudanças ambientais, assim como ter funções de biondicadores no ecossistema (HOELTGEBAUM, 2003; LOUCA et al. 2016).

Uns dos táxons associados a bromélias são as leveduras, que correspondem a uma categoria taxonômica artificial associado ao reino Fungi e que apresentam características gerais dos fungos assim como uma parede celular rígida composta por polímeros de manose, glicanas e polímeros de N-acetilglucosamina (formando quitina), nutrição heterotrófica por absorção de moléculas em solução(STAMER; LACHANCE, 2011; ERWING; COW, 2016). Por outro lado, se diferenciam dos demais fungos por serem unicelulares, enquantosua reproduçãoassexuadaocorrepor fissão ou brotamento, sem produção de ascas o basidiomas (KURTZMAN; ROBNETT, 1998; SUH et al. 2006).

Taxonomicamente, as leveduras são agrupadas em dois filos: Ascomycota (leveduras ascomicéticas) e Basidiomycota (leveduras basidiomicéticas) (LACHANCE, 2011; BOEKHOUT et al.2011; KURTZMAN;QUINTILLA, 2015; SYLVESTERet al. 2015). A taxonomia de leveduras temsidoabordada convencionalmentea partir do uso de sua morfologia celular (modo de divisão celular e formação de estruturas reprodutivas) e a fisiologia (testes de fermentação e assimilação de açúcares e de diferentes fontes de nitrogênio e crescimento em diferentes temperaturas). Não obstante, a taxonomia convencional de leveduras é insuficiente para alcançar uma identificação correta, gerando uma baixa porcentagem de certeza nas relações filogenéticas (SCHOCH et al.2012).

Na atualidade, uma alternativa aos estudos taxonômicos tradicionais é o uso de ferramentas geradas a partir da biologia molecular baseadas em sequencias *barcode* que têm permitido a descrição e reorganização taxonômica ao nível de espécie e gênero, principalmente de micro-organismos isolados do ambiente (HAWKSWORTH, 2004; BLACKWELL, 2005, 2011; JAMES et al 2006; BASS, 2011, WANG; SIPILÄ; OVERMYER, 2016).Scorzetti e colaboradores (2002) sugeriram o uso de análises combinadas (taxonomia convencional e molecular) para uma identificação das espécies de leveduras, o que é denominado de taxonomia polifásica.

Os diferentes grupos filogenéticos de leveduras tem sido associações com o filoplano de plantas tropicais desde os anos sessenta; Ruinen J. (1956)avalioua

presença de grupos de leveduras aos componentes da planta.Algumas espécies de leveduras têm naturalmente seu principal habitat emplantas ou resíduos vegetais, sendo as comunidades de leveduras estabelecidas na superfície das partes vivas das plantas umas das mais numerosas e diversas (GLUSHAKOVA et al. 2006). As leveduras habitam o filoplano de forma transiente ou residente, apresentando uma heterogeneidade de associações ecológicas que permitem-lhes adquirir ou subministrar um amplo grupo de sustâncias e nutrientes, cumprindo diversas funções tais como comensais, saprótrofosou mutualistas, além de contribuirem na formação de barreiras naturais das plantas contra fitopatôgenos mediante a produção de enzimas extracelulares (STARMER; LACHANCE, 2011;LÓPEZ et al. 2105).

Apesar de que adescrição das comunidades de leveduras não éum acontecimentonovo, estudos taxonômicos recentes têm aportado ampalmente com o conhecimento da biodiversidade, o entendimento dos processos ecológicos, as estruturas das comunidades, assim como das funçõesecológicas que se apresentam nestas associações planta-levedura. Nos últimos 20 anos a descrição de novas espécies de leveduras isoladas de bromélias tem sido um fato importante (e.g. LANDELLet al. 2009, 2015; RUIVO et al. 2005; SAFAR et al. 2013), evidenciando que há uma grande diversidade inexplorada de leveduras associadas àsbromélias, particularmente ao filoplano (LANDELL; MAUTONE; VALENTE, 2006, FELIX et al. 2017).

Com baseno exposto acima, este trabalho teve como objetivos descrevera diversidade de leveduras,priorizando a descrição das prováveisespécies novas de leveduras associadas ao filoplano de bromélias, em uma porção da Mata Atlântica Setentrional;assim como identificar padrões de distribuição e variaçõesna composição das comunidades de leveduras na área amostrada.

2. Objetivos

Objetivo geral

- Descrevera diversidade de levedurasassociadas abroméliasnaMata Atlântica Setentrional.

Objetivos específicos

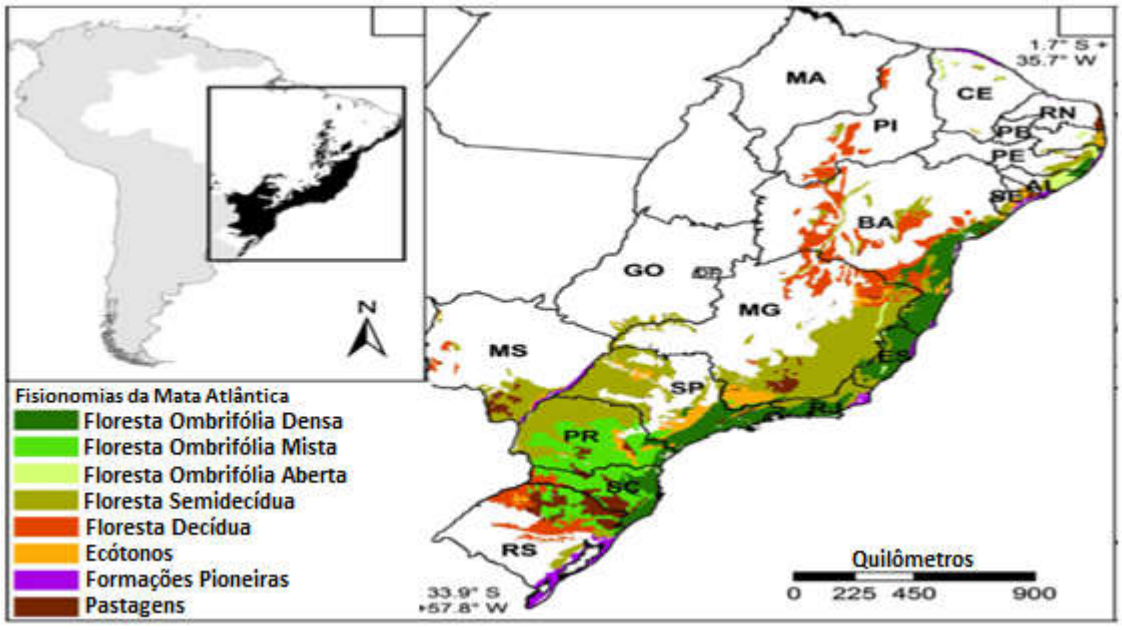
- Identificar padrões de distribuição e variações na composição das comunidades de leveduras isoladas de bromélias na Mata Atlântica Setentrional;
- Descrever as possíveis espécies novas encontradas.

3. Revisão de literatura

3.1 Mata Atlântica

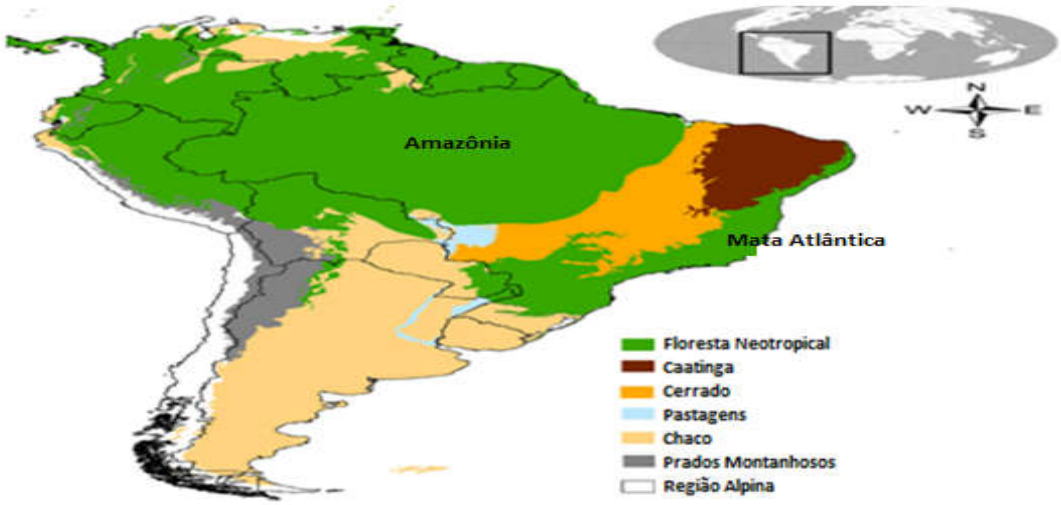
O Bioma Mata Atlântica (MA) abrange grande parte da região litorânea brasileira, entre as coordenadas geográficas latitudes 5º-33º Sul e as longitudes 35º-57º Oeste(LIMA et al. 2015). ODecreto Nº 6.660 de 21 de Novembro de 2008regulamenta as disposiçõessobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica, o qual descreve as formações florestais nativas e os ecossistemas associados da configuração original da Mata Atlântica como: Floresta Ombrófila Densa; Floresta Ombrófila Mista, também denominada de Mata de Araucárias; Floresta Ombrófila Aberta; Floresta Estacional Semidecidual; Floresta Estacional Decidual; Campos de Altitude; Áreas das Formações Pioneiras ou manguezais, restingas, similar ao exposto por Joly e colaboradores (2014) (Figura1).

Figura 1.Fitofisionomias da floresta Atlântica, Floresta Ombrófila Densa; Floresta Ombrófila Mista; Floresta Ombrófila Aberta; Floresta Estacional Semidecidual; Floresta Estacional Decidual; Campos de Altitude; Áreas das Formações Pioneiras, restingas, adaptado de JOLY et al. (2014).



A Mata Atlântica constitui a segunda maior Floresta Neotropical depois da Floresta Amazônica, apresentando entre elas um passado de interconexões recorrentes que através de diferentes eventos ecológicos (e.g. eventos de glaciação)diversificaram osecossistemas(Figura2) (SOBRAL-SOUZA; LIMA-RIBEIRO; SOLFERINI, 2015). Originalmente, a Mata Atlântica compreendiauma área de 1,5 milhões de quilômetros quadrados (Km²) distribuídos ao longo da costa leste do Brasil, desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, e prolongava-se até o Nordeste da Argentina e sudeste do Paraguai (RIBEIRO et al. 2009). No atual território brasileiro, a Mata Atlântica cobre aproximadamente 13% da área total do pais (1,1 milhões Km², aproximadamente), abrangendo 17 Estados - Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Sergipe e São Paulo (IBGE, 2004).

Figura 2.Extensão da Floresta Atlântica Neotropical (Mata Atlântica) e dos biomas associados (Caatinga, Cerrado, Chaco), adaptado de SOBRAL-SOUZA; LIMA-RIBEIRO; SOLFERINI (2015).

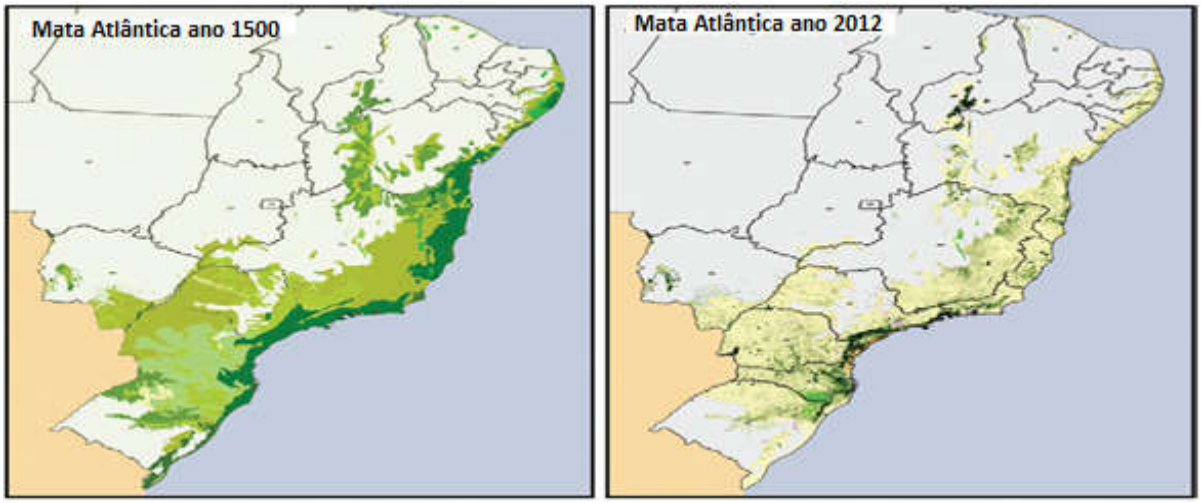


Este Bioma é considerado uns dos 34 *hotspots* de biodiversidade do mundo (LITMANet al. 2015). Porém, é um dos ecossistemas mais ameaçados do Brasil, sendo fortemente afetado por processos ecológicos históricos e mais recentemente pela alta atividade

antrópicacom cerca de 83 milhões de hectares desflorestados para a agricultura só nos anos 1980 e 1990,o que tem alteradoconsideravelmente a composição florística e faunística(MYERS et al. 2000; GIBBS et al. 2010; MAGNANOet al. 2014; BELLOet al. 2015). Projeções da cobertura vegetal do bioma Mata Atlântica nas últimas décadastêm evidenciado uma perda de mais de 90% da sua extensão original nos últimos 500 anos (Figura 3), e a porção restante (10%) de áreas remanescentes com um alto nível de fragmentação (LIMA et al. 2015;MAGNANOet al. 2014), onde a maioria dos fragmentos possui áreas não maiores do que100 hectares (RIBEIRO et al. 2009).

Somente 2% da extensão atual da Mata Atlântica está sob proteção (RIBEIRO et al. 2009; STEHMANNet al. 2009; Fundação SOS Mata Atlântica & INPE 2015). Isto é insuficiente, já que estesremanescentes florestais constituem uma importante fonte de diversidadedentro do bioma.Além disso, podemcontribuir comdiversos processos ecológicos como por exemplo a recolonização de grupos florais e faunísticos,favorecendoa recuperação e as associações ecológicas eassim possibilitando o incremento nabiodiversidade (MAGNANOet al. 2014; BELLOet al. 2015).

Figura 3.Alterações composicionais na cobertura vegetal na Mata Atlântica gerada pelos processos antrópicos de fragmentação e desflorestamento, adaptado de PINA-COSTAet al.(2014).



A porção Setentrional do Biomada Mata Atlântica (sensu VELLOSOet al. 1991) é importante por ser considerada um “corredor central biológico” associado ao centro de endemismo “Pernambuco”, que abrange as florestas costeiras e os brejos de altitude dos estados de Alagoas, Paraíba e Pernambuco, supordando a maior biodiversidade deste Bioma(THOMASet al. 1998). A perda da cobertura vegetal e a fragmentação sofridanesta zonaameaçam o habitat de inúmeras espécies, tornando-as mais vulneráveis aos efeitos decorrentes da modificação da paisagem.Entre os grupos taxonômicos ameaçadosestão as bromélias.Elas apresentam um alto endemismo nesta área e fazem parte do 20% da flora vascular(LEITMANet al. 2015), além de apresentar uma alta sensibilidade a mudanças ambientais,tornando-as boas biondicadoras, além de proporcionaremuma ampla variedade de habitat para diversos macro e micro-organismos (SCHUTTZ, ARAÚJO; SÁ, 2012).

3.2 Bromeliaceae

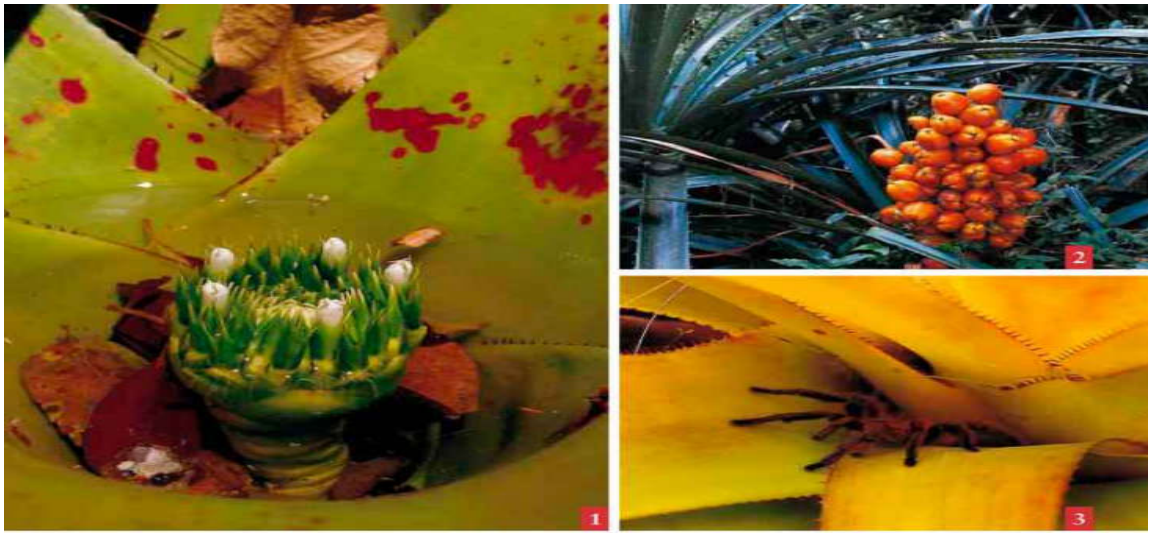
Predominantemente neotropicais,as bromélias são plantasde ampla distribuiçãodesde o nível do mar até os 4500 metros de altitude.Foi encontrada somente uma espécie endêmica do continente Africano na costa atlântica da Guiné (*Pitcairnia feliciana*) (FELIX-JACQUES, 2000; BENZING, 2000) (Figura 4).A história dasbromélias tem origem entre os séculos XIV e XVI, quando foram introduzidas as primeiras espécies através das viagens feitas pela coroa Espanhola ao novo mundo (HORNUNG-LEONI, 2011). Em 1600, Charles Plummer fez a introdução na Europa dos primeiros representantes no velho continente onde surgiu o nome da família, entre elas a espécie de bromélia amplamente conhecida e cultivada para a alimentação,conhecida como abacaxi (*Ananas comosos)*(MANETTI; DEIAPORTE; LAVERDE, 2009).

Figura 4.Distribuição geográfica dos representantes da família Bromeliaceae; Fonte:SMITH; DOWNS (1979).

Na atualidadeas bromélias são uma das plantas com flores mais diversas nos ecossistemas neotropicais, abrangendo aproximadamente 3320 espécies, distribuídas em 58 gêneros (GIVNISH et al. 2014, 2015, BASÍLICO et al 2015). Para os ecossistemas brasileiros, a família esta representada por 44 gêneros e 1307 espécies,150 táxons infra-específicos (MARTINELLI et al. 2008 BASÍLIO et al. 2015),com 80% de endemismo (FREITASet al. 2016).

As bromélias possuem representantes com diversas predileções de uso de hábitats: rupícolas, epífitas e terrestres, geralmente, herbáceas, com plantas de pequeno porte, como *Tillandsia recurvata* (L), com alguns centímetros de comprimento e indivíduos como *Puya raimondii* Harms, exclusiva dos Andes montanhosos, que chegam a atingir mais de oito metros de altura (HORNUNG-LEONI et al. 2013), assim como a presença de uma alta variedadede frutos e sementes, os quais são utilizados como indicadores taxonômicos dos grupos (Figura 5).

Figura 5.Estruturas morfológica de bromélias 1) Inflorescência, 2) Infrutescência, 3) Formação verticilada (roseta) das estruturas vegetativas adaptado de MARTINELI (2000).



Muitas espécies de bromélias são epífitas, sendo a segunda maior família nas florestas neotropicais.Sua distribuição espacial está estreitamente relacionada às necessidades especiais (reprodução, fixação, germinação, crescimento e sobrevivência), bióticas (disponibilidade de hospedeiros, dispersantes e polinizadores) e abióticas (temperatura, intensidade luminosa e umidade do ar) (DE SOUZA; COLPO, 2017).O desenho tridimensional da maioria das bromélias permite acumular águaem uma estrutura chamada fitotelmaou “tanque”, conferindo nichos com altas fontes de nutrientes que permitem o estabelecimento de assembleias de uma extensa variedade de organismos, como insetos e aves, os quais contribuem com o papel da polinização, dispersão e o fluxo biológico de (e.g. bactérias, leveduras, fungos filamentosos, vírus e arquéias). Adicionalmente estão associados anfíbios, lagartos/serpentes e pequenos mamíferos (HAGLER et al. 1993; ROCHAet al. 2004; GOMES et al. 2015; LOUCA, et al. 2016).

Pelo menos três espécies de bromélias que apresentamtanque são conhecidas por serem carnívoras(*Brocchinia reducta, B. hectioides* e *Catopsis berteroniana*) (GONSISKA; GIVNISH 2009).Outras bromélias têmestruturas especializadas que

auxiliam na absorção de nutrientes do ambiente, como no caso do gênero *Tillandsia*, onde as raízes principalmente têm a função de fixação ao substrato.Adaptações apresentadas por membros dafamília,como os tricomas modificados em escamas, permitem-lhes a absorção de água e nutrientes da atmosfera diretamente pelas folhas, deixando as raízes a função de fixação aos hospedeiros nas plantas epífitas.Além disso,espécies do gênero *Tillandsia* são referenciadas na literatura como eficientes bioindicadoras no monitoramento de excesso de poluentes, os quais se acumulam nos tecidos da planta (MANETTI; DEIAPORTE; LAVERDE, 2009).

As bromélias também são utilizadascomo sistemas de modelos em miniatura para ecologia, além de serem reconhecidas como*hotspots*de biodiversidade regionais (HOELTGEBAUM 2003; LOUCA et al. 2016), constituindo reservatórios de uma elevada biodiversidade, evidenciada nos últimos anos com a descrição de novas espécies de diferentes grupos taxonômicos reportados nos diferentes fragmentos de Mata Atlântica, particularmente no estado Alagoas, entre eles anfíbios e répteis (MOURA, 2006; NUNES; POMBAL, 2011) e leveduras (PAGANI et al. 2016a; FELIX et al. 2017), fornecendo um importante potencial para o conhecimento da diversidadeda Mata Atlântica Setentrional.

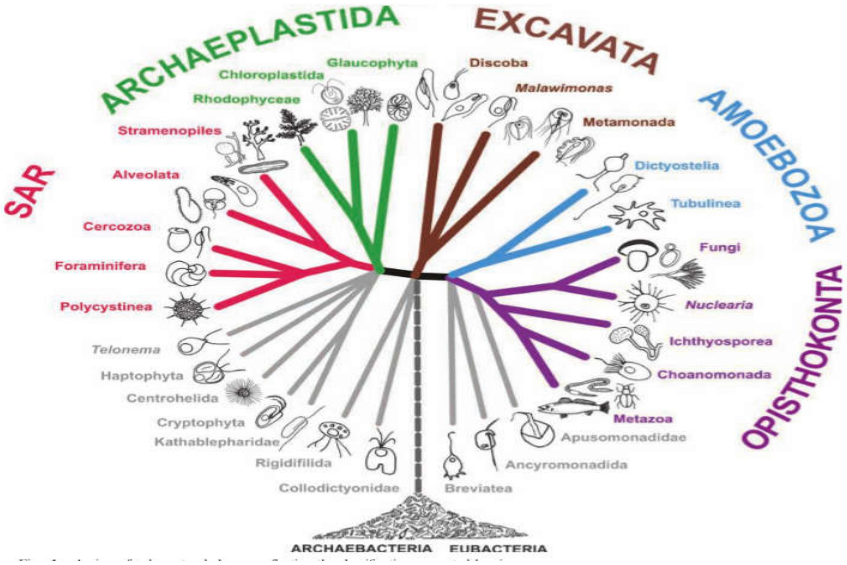
Entre a diversidade associada a bromélias , Klann e colaboradores (2016), isolaramdo fitotelma da bromélia *Werauhia gladioliflora* oito espécies de Betaproteobacteria das ordens Neisseria e Burkholderiales (também isoladas de outros ambientes anteriormente), que são organismos com a capacidade de utilizar N-acetil-D-glucosamina e umavariedade de fontes de carbono, refletindo um nicho predominantemente colonizado por organismos que participam na ciclagem de nutrientes (decomposição) e em particular do ciclo do carbono; fortalecendo a tese de que os micro-organismos(entre estes fungos filamentosos e leveduras)prticipam de diversos ciclos biogeoquímicos e por consequência a base da vida na terra (GIBBONS, 2017).

3.3 Diversidade de Fungos

O Reino Fungi(também chamado Reino Mycetae) e o Reino irmão Straminipila, conformam o supergrupo (SAR) (Figura 6) (RAGHUKUMAR, 2017).Os fungos são reconhecidos por servirem como organismos modelo para biotecnologia, biologia celular, genética e ciências da vida em geral (EBERSEGERet al. 2012; RAGHUKUMAR, 2017).A diversidade de fungos nos trópicos é mais rica do que nas regiões temperadas (BLACKWELL, 2011; BERRIN, et al. 2012), e hipóteses sustentadaspor Tedersso e colaboradores (2014),atribuíram esta diversidade as variáveis:climáticas (e.g. temperatura e precipitação), espaciais (e.g. distância do equador) e edáficos (e.g. pH e concentração de nutrientes)como relevantes na distribuição geográfica dos fungos,

mantendo os parâmetros de incrementos da biodiversidade em direção aos trópicos (regra de Rapoport), tanto como acontece com os macro-organismos e bactérias marinhas.

Figura 6.Classificação doseucariotos proposta por Adl e colaboradores, 2005, ressalta-se Opisthoconta grupo que contém os fungos.Fonte:RAGHUKUMAR et al. (2017).



A ubiquidade de diversos fungos é amplamente relatada na literatura (SUN E GUO, 2012) e cumprem vários papéis nos ecossistemas.Atuamcomo mutualistas, patógenos e saprótrofos, além de contribuir amplamente em uma gama de processos ecossistêmicos, incluindo a decomposição de carbono orgânico e a deposição de carbono recalcitrante (TRESEDER; LENNON, 2015;BERBEE; JAMES; STRULLU-DERRIEN, 2017),esta ultima dirigida pelos fungos saprótrofos de vida livre, os fungos ectomicorrízicos (conhecidos pela sigla ECM), obtêm também do solopotencialmente o carbono. Por outro lado, as transformações de nitrogênio e fósforo,entre outras funções, são processos favorecidos pela secreção de um amplo conjunto de proteínas extracelulares capazes de decompor os biopolímeros de matéria orgânica morta(TEDERSOO et al. 2014), conferindo aos fungos a capacidade de interagircom os principais táxons (e.g, bactérias, plantas, algas verdes e animais, incluindo insetos) (BLACKWELL, 2011) e colonizar diferentes tipos de habitats:e.g. rochas de desertos (GONÇALVESet al. 2016), regiões de mineraçãocom ambientes altamente poluídos com

metais (NARENDRULA-KOTHA; NKONGOLO, 2016), fontes termais e hipersalinas em lago (KAMBURA et al. 2016); ambientes marinhos (JONESet al. 2015).

O reino Fungi conta com cerca de 120.000 espécies já descritas (HAWKSWORTH; LÜCKING, 2017) e estima-se que existam de 1,5 a 6 milhões de espécies de fungos em nosso planeta, distribuídos em 156 ordens, 46 classes e 12 filos(CHAMBERGO; VALENCIA,2016; TEDERSSOet al. 2017).O aumento do conhecimento sobre a diversidade de fungos tem previsões de incrementar-seprincipalmentepelo uso de novas ferramentas de biologia molecular, favorecendo a descobertade novos táxons epermitindo com isto identificar mais funções e papéis que os fungos têmno ecossistema (BLACKWELL, 2011, HUGHESet al. 2006).Os fungos são osmoheterotróficoseestão intimamente envolvidos com a ciclagem biogeoquímica de nutrientes, assim como na produtividade vegetalnos ecossistemas,consideradosunsdos principais decompositores (TEDERSOO et al. 2014).

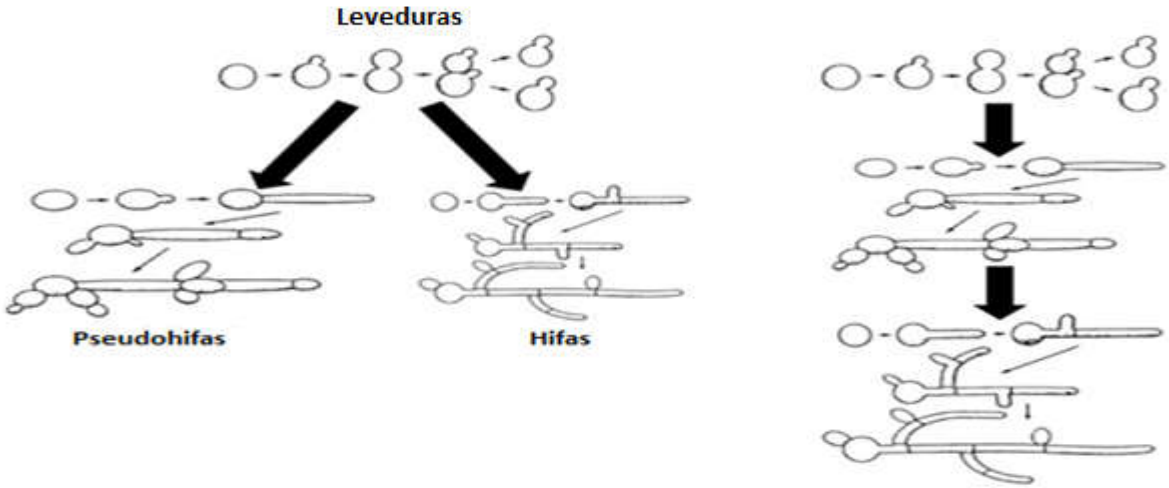
O conhecimento que se tem a nível filogenético dos fungos ainda é escasso.Por isso a taxonomia deste grupo desempenha um papel central na compreensão da diversidade da vida (HIBBETT, 2016) e como foi exposto acima, em particular deste grupo de organismos, considerados altamente relevante nos ecossistemas pelas funções ecológicas que desempenham e as relações que têm com outros organismos.Os integrantes do reino Fungi são agrupados em três categorias taxonômicas artificiais, baseadas em suas características morfológicas: leveduras (unicelulares), *yeast-like* (que pode alternar entre o estado unicelular e a formação de pseudo-hifas e aglomerados celulares) ou fungos filamentosos (multicelulares, formando hifas verdadeiras) (BASTIDAS; HEITMAN, 2009; BOEKHOUT et al. 2011).

3.4 Leveduras

As levedurassistematicamente são uma categoria artificialque pertencem ao Reino Fungi, apresentam um estado unicelular no seu ciclo de vida, com uma alta complexidade na sua morfologia celulare pelos diferentes estágios celulares

transicionais (BASTIDAS; HEITMAN, 2009; KNOP, 2011); asquais podem exibir transições a hifas verdadeiras ou uma fase intermediária através da formação de pseudo-hifas e aglomerados celulares, denominadosfungos dimórficos ou fungos semelhantes a leveduras(*yeast-like),*no entanto podemapresentar uma transição de leveduras a pseudo-hifas e finalmente hifas septadas,sem produção de ascomas ou basidiomas(indicado na figura 7) (HEITMAN, 2011; KURTZMAN, FELL; BOEKHOUT 2011).

Figura 7.Transições trimórficas em *Candida albicans*. Na imagem da esquerda, descreve-se a transição de células de leveduras de *C. albicans* para pseudo-hifas (esquerda) e hifas (direita) como dois destinos diferentes no desenvolvimento.Para cada espécie, sofisticações nas transições têm evoluído individualmente, as quais devem ter surgido, como uma adaptação evolutiva para condições ambientais particulares. Adaptado de HEITMAN (2011).



Além da fisiologia que pode ser afetada pelos processos de poliploidização nas leveduras, características nas estruturas, como a parede celular, podem também sofrer modificações.Como nos outros fungos, a parede celular de leveduras é formada por polissacarídeos que geram estruturas microfibrilares entremeadas, representados principalmente por quitinas e β-glicanas que dão as características de rigidez da parede fúngica, outros compostos, como β homo- e hétero-polissacarídeos, proteínas, pequenos lipídeos e sais inorgânicos também são encontrados na parede e atuam como

elementos de sedimentação, proteção, evitam a perda de água, entre outras funções (LARSet al. 2016).

3.4.1 TAXONOMIA DE LEVEDURAS

A taxonomia de leveduras tem evoluído com o uso das ferramentas de biologia molecular o que implica uma vantagem na capacidade discriminatória adicional, considerando que a taxonomia convencional é insuficiente para alcançar uma identificação confiável das leveduras(SCHOCHet al. 2012), por tantomelhorando assim o conhecimento das filogenias de leveduras.

Inicialmente pensou-se que todas as leveduras faziam parte do filo Ascomycota,no entanto trabalhos posteriorestrouxeram a descoberta de que algumas leveduras produziam balistoconidia e basidia com basidiósporos (KURTZMAN et al. 2015). Isso fezmudar profundamente as perspectivastidas sobre as leveduras,tornando-as fungosdistribuídos em dois filos:Ascomycota (leveduras ascomicéticas) e Basidiomycota (leveduras basidiomicéticas)que a sua vez conformama ao sub-reino Dikarya (HIBBETT, JAMES; VILGALYS,2007;LACHANCE, 2011;KURTZMAN; QUINTILLA, 2015; SYLVESTERet al. 2015).

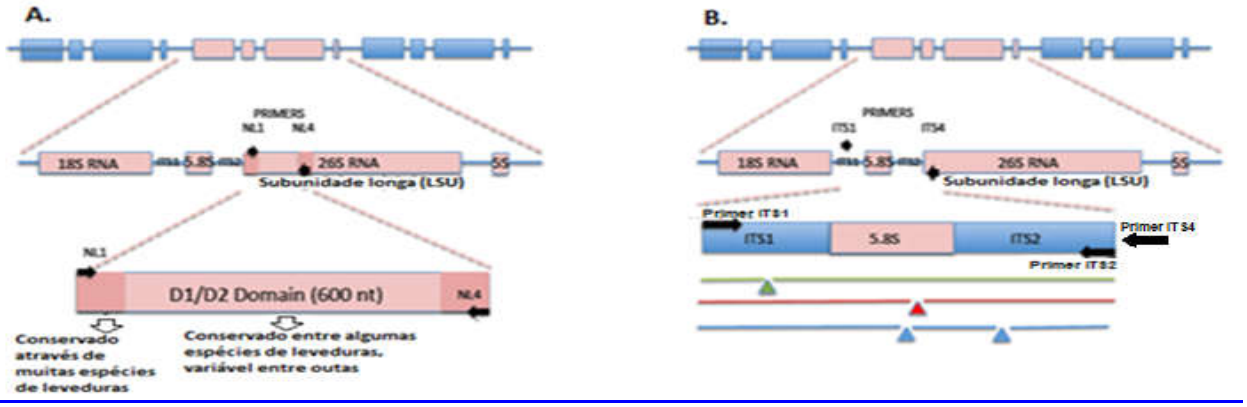
As técnicas de diagnóstico molecular para a identificação das espécies de fungos baseiam-se na amplificação do DNA ribossômico (rDNA) mediante o uso da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). A região do rDNA em fungos, incluindoleveduras,é constituída porregiões codificadas 18S, 5,8S e 28S, e estão separadas por regiões espaçadoras transcritas internas(sequências ITS1 e ITS2),que se apresentam altamente conservadas ao nível intraespecífico, mas são refinadamente variáveis interespecificamente,constituindo uma característica genética que permite o uso geral desses loci como indicadores taxonômicos (*Barcode*).Finalmente,cada repetição é separada por uma região espaçadora não transcrita (NTS)(FELL et al, 2000; KURTZMAN; ROBNETT, 1998; FELL; BOEKHOUT; ET, 2000; SCHOCH et al. 2012).

Kurtzman e colaboradores (1998), avaliaram a taxonomia de mais de 500 espécies de leveduras ascomicéticas, onde aquelas que apresentavam uma variação ou divergência de mais de 1% de substituições de nucleotidios no domínio D1/D2, foram

descritas como espécies diferentes.Incluindo assim taxas heterotálicos, homotálicos e anamórficos, aportando que quase todas as leveduras ascomicéticas avaliadas podem ter sua taxonomia determinada pelo uso de sequência dos domínios D1/D2 (450-600 nucleotídeos) da região LSU (subunidadelonga) do rDNA (Figura 8A), sendo este apoiado por estudos posteriores realizados no filo Basidiomycota e Ascomycota.

Além da região LSU, implementou-se o uso das regiões compreendidasentre os genes 18S e 28S nas quais encontram-se entre os espaçadores transcritos ITS1-2para reconhecer limites entre espécies, já que é altamente conservado e não deve ser incluído ao comparar substituições em ITS (Figura 8B). Esta avaliação aporto na solução para definir linhagens problemáticos taxonomicamente como no caso de *Cryptococcus ater*, *Cryptococcus magnus*, qua não constituíam espécies diferentes e foi renomeando *C. ater* como *C. magnus. (*FELL et al. 2000). Anos depois, Scorzetti e colaboradores (2002), avaliaram o poder de resolução apresentado pelas duas regiões em leveduras do subfilo Basidiomycota, concluindo que o uso destes marcadores para Basidiomicetos contribuiu enormemente com a resolução de incertezas na taxonomia de alguns táxons, ratificando o uso destas regiões como *Barcode* para a identificação de fungos.

Figura 8.Regiões utilizadas como*barcode* para leveduras (A) D1\D2região LSU (subunidade maior) do rDNA (B) ITS, espaçador interno transcrito (ITS), localizado entre os genes SSU e LSU rDNA. Adaptadas dehttps://www.studyblue.com/notes/note/n/yeast-molecular-taxonomy/deck/9823159.

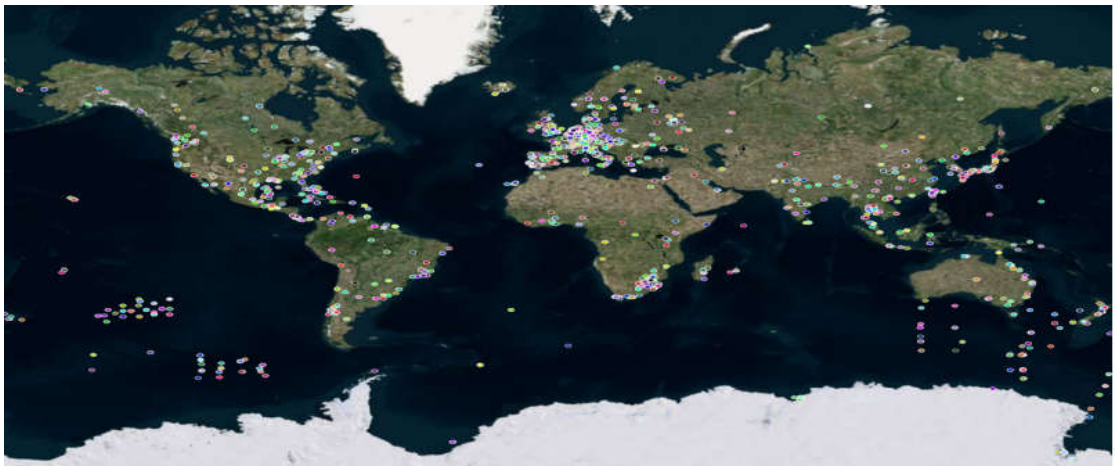


Análises combinadas de múltiplos genes (5.8S, 16S, 18S, 26S, TEF-1α, RPB2, CO1), têm sido efetuadas na busca de uma melhor descrição taxonômica das leveduras,

aumentando o nível de confiabilidade nas relações filogenéticas dos grupos (KATZ EZOV et al. 2006; GROENEWALD et al. 2011; ARAÚJO, 2012; SCHOCH et al. 2012; HAGEN et al. 2015; KURTZMAN;QUINTANILLA, 2015; LIU et al. 2015; WANG et al. 2015b; VU et al. 2017). A abordagem destas análises teve um forte impacto sobre a compreensão das relações filogenéticas de fungos, incluindo as leveduras, o que gerou novas regras na nomenclatura, sendo estas apresentadas e acolhidas majoritariamente no Código Internacional de Nomenclatura recentemente implementado para algas, fungos e plantas (Código de Melbourne) (HAWKSWORTH et al. 2011; TAYLOR, 2011).

É assim que análises feitas deaproximadamente 7000 sequencias de leveduras emKurtzman e colaboradores (2015), com a finalidade de avaliar as análisesdas sequências de DNA (loci *barcode*)para identificação de espécies de leveduras e determinar as relações filogenéticas entre espécies. Seconcluiu com o rearranjo de algumas relações filogenéticas ea recalsificação taxonomica de algumas outras leveduras; também foi chamanda a atenção na necessidade de conhecer além das informações genéticas, as condições e características ecológicas as quais proporcionem informações essenciais para a compreensão do papel que as leveduras apresentam nos ecossistemas;na figura 9 se apresentam as distribuições geográficas dos indivíduos que proporcionaram as sequências analisadaso que evindencia a ausência de estudos taxonômicos e de diversidade de leveduras em algumas regiões do mundo incluindo Brasil.

Figura 9.Dados geográficos das aproximadamente 7000 linhagens de leveduras presentes disponíveis publicamente na coleção do Westerdijk Fungal Biodiversity Institute-CBS. Fonte: KURTZMAN et al. (2015).



Uma abordagem similar foi realizada em 2016 por Vu e colaboradores com mais de 9000 sequências, que correspondiam a mais de 1700 espécies de leveduras reconhecidas atualmente. Na qual se fortalece a iniciativa do uso dos marcadores moleculares de rDNAconsiderados *barcode*para leveduras (D1/D2 e ITS),para a identificação deespécies. Trabalho que ratifcouoque foi feito por SCHOCH e colaboradores (2012) onde se considera ITS como o marcador com maior probabilidade de identificação exitosa na identificação de fungos em geral. Atualmente, ITS e LSU funcionam melhor na discriminação de espécies para leveduras do que para fungos filamentosos, com porcentagem alta de 88,4% para ITS e 84,6% para a região LSU (VU et al. 2016), contribuindo na resolução das relações filogenéticas para os dos grupos de leveduras tanto Ascomycota como Basisiomycota.

3.4.2 FILO ASCOMYCOTA

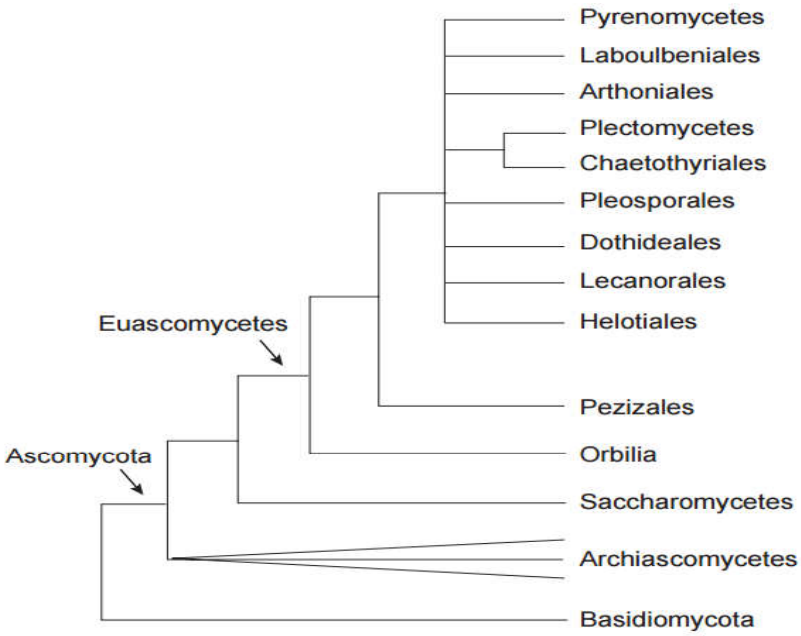
O filo Ascomycota foi considerado por muito tempo, o grupo que abrangia todas as leveduras.Além disso é o maior filo dos fungos e um dos mais diversos e ubíquos que usam uma ampla variedade de nichos ecológicos (habitats atmosféricos, terrestres e aquáticos) (SCHOCH et al. 2009, STARMER; LACHANCE, 2011), participandoem diferentes processos ecológicos, assim como em eventos de associação com outrosorganismosatravés de simbioses (STARMER; LACHANCE, 2011). Caracteristicamente, a reprodução sexual em ascomicetos resulta em diferentes

números de esporossexuais formados por meiose(dúzias como no caso de *Vanderwaltozyma polyspora)*, chamados ascósporos e carregados em umasco semelhante a um saco (pl. Asci) (KNOP, 2011; RAGHUKUMAR, 2017.

Ascomycotaestá constituído por três classes: Euascomycetes grupo polifiléticoque abrange majoritariamente fungos filamentosos e alguns dimórficos bem como formas mitospóricas ou conidiárias.Archiascomycetes (um táxon basal parafilético com poucos gêneros, com alta relevancia, como no caso de *Pneumocystis jiroveci*, agente causal da pneumonia por pneumocistos).Finalmente Saccharomycetes (leveduras verdadeiras) que são um grupo monofilético com ampla relevância nos ambientes como mutualistas (e.g. *Suhomyces kilbournensis* associados a insetos, solo e plantações de milho) (KURTZMAN et al. 2016), as quias estão distribuídos em três subfilos: Pezizomycotina, Taphrinomycotina e Saccharomycotina (LUMBSCH; HUHNDORF, 2010; KURTZMAN, 2011).

A filogenia do Filo Ascomycota,baseada em análises das sequências de RNA e DNA ribossômicos, fornecidos pelas técnicas modernas de sequenciamento,assim como análisesfilogenéticasmediante oestudo de genes únicos, suportados posteriormente por análises de multigenes,o que têm permitido a revelação de grupos de fungos previamente desconhecidos é representada na figura 10(BLACKWELL; SPATAFORA, 2011;KURTZMAN et al. 2015).

Figura 10.Filo Ascomycota, incluindo as três classes Archiascomycetes, Saccharomycetes e Euascomycetes neste último as principais linhagens da politomia foram suportadas a partir de análises de rDNA nuclear e RNA polimerase II. Adaptado de BLACKWELL; SPATAFORA (2011).



3.4.3 FILO BASIDIOMYCOTA

O filo Basidiomycota é o segundo maior filo do Reino Fungi,apresentando relevânciaem diferentes campos, principalmente na saúde, economia e nutrição (AVINet al. 2012). Recentemente o filo foi reclassificado em 4 subfilos (Pucciniomycotina, Ustilaginomycotina, Agaricomycotinae o proposto Wallemiomycotina) (ZHAOet al. 2017). Descrições dos subfilos têm sido abordadas por Fell e colaboradores em 2000, Hibbett e colaboradoresem 2007 e finalmente Zhao e colaboradores em2017.

Pucciniomycotina (Urediniomycetes), caracterizado por apresentar ciclos de vida dimórficos que incluem estados unicelular (leveduras) saprótrofos e um estado filamentoso patogênico. O segundo subfilo é Ustilaginomycotina (Ustilaginomycetes), neste ainda existe uma grande controvérsia por membros que apresentam convergências evolutivas com o subfilo Pucciniomycotina.No entanto,são fungos dimórficos semelhantes a leveduras que apresentam uma diversa classificação, onde os mais característicos são os Urediniomycetes filamentosos, que tem em seus micélios

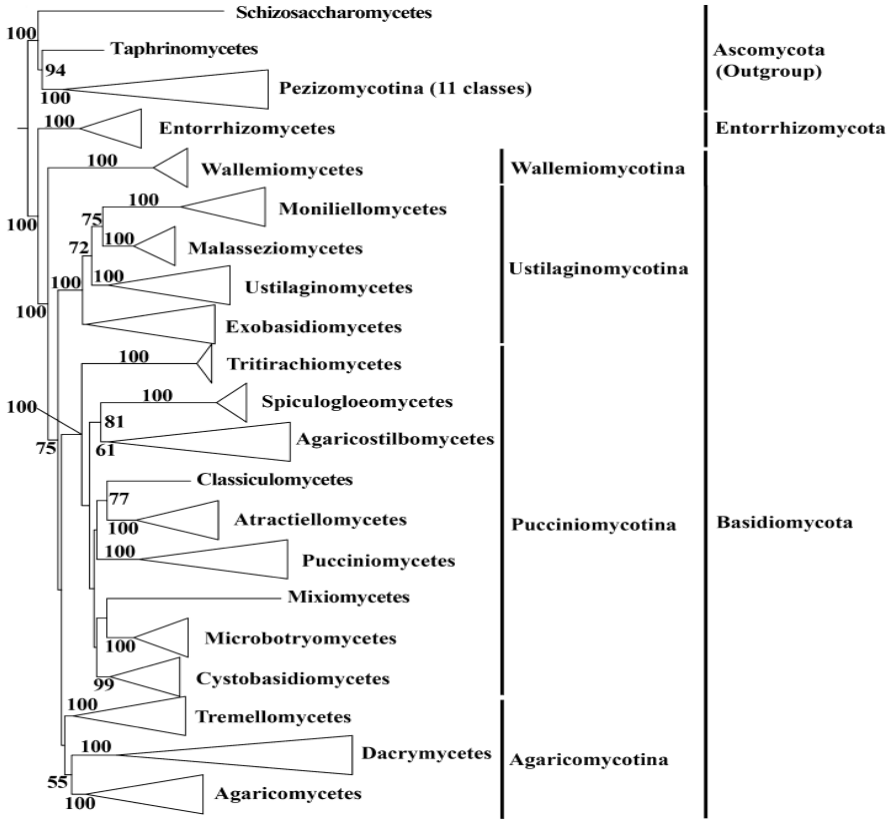
septados a característica de ter poros simples que permitem as interconexões celulares e em particular as leveduras neste grupo têm sido catalogadas como grupo polifilético.

Por outro lado, Agaricomycotina (Hymenomycetes) é o terceiro subfilo. Apresenta septos bem estruturados e doliporos nas hifas.Uma das classes mais representativaséTremellomycetes,a qualfoi reestruturada filogeneticamentepor Liu e colaboradores em 2015 atendendo as dificuldades nas filogenias moleculares, onde usaram 7 genes diferentes abrangendo a maioria das leveduras e fungos filamentosos presentes, gerando a reorganização em cinco ordens, 17 famílias e 54 gêneros, incluindo sete novas famílias e 18 novos gêneros.

Finalmente o subfilo reconhecido recentementecomo Wallemiomycotina(Classe - Wallemiomycetes), representada na filogenia pelo holótipo *Wallemia tropicalis*, e nas análises filogenéticas usando máxima verossimilhança aparece como grupo irmão dos outros três subfilos de Basidiomycota. Porém nas análises de filoproteômica é suportado como grupo irmão de Agaricomycotinano mesmo clado Agaromicotina+ Wallemiomycotina e como grupo irmão de Ustilaginomycotina, mas outras análises são sugeridas para sustentar mais esta hipótese (ZHAO et al. 2017).

As análises expostas por Zhao e colaboradores em 2017para a reclassificação do filo Basidiomycota(figura 11)foram baseadas no reconhecimento de taxa superior propostopor diversos autores,incluindoZhao e colaboradores em 2016.A sistemática e taxonomia fundamenta-se no uso de uma combinação de caracteres, incluindo dados moleculares, morfológicos, ecológicos e biogeográficos, além da abordagem de classificação usando tempos geológicos de divergência entre os grupos, avançando desta maneira no entendimento dos processos de especiação dos táxons, ampliando ainda mais as ferramentas para analisar e entender as relações filogenéticas entre fungos.

Figura 11.Principais clados do filo Basidiomycota, incluindo os 3 subfilos Agaricomycotina, Pucciniomycotina Ustilaginomycotina, e o quarto subfilo proposto Wallemiomycotina, usando o princípio de máxima verossimilhança e dados de sequência de seis genes tradicionalmente utilizados em sistemática molecular de fungos (nrLSU, nrSSU, 5.8S, TEF1-α, RPB1 e RPB2). Adaptado de ZHAO et al. (2017).



3.5ECOLOGIA E BIODIVERSIDADE DE LEVEDURAS

As leveduras podem colonizar diferentes ambientes,esta habilidade estárelacionadacom carateres fisiológicosque permitem-lhes metabolizar uma ampla gama de substratos e nutrientes.Sabe-se que asleveduras são responsáveis pela utilização de uma variada gama de fontes de carbono, incluindocelulose, hemicelulose, fenol e os subprodutos gerados pela atividade da degradação de lignocelulose por enzimas hidrolíticas (MAŠÍNOVÁ et al. 2016),assim como a decomposição de compostos orgânicos (incluindo moléculas tóxicas). Da mesma forma diversos

componentes celulares de membrana, permitemas leveduras suportarem condições extremas, diferentede outros organismos eucariotos(e.g. *Mrakia frigida* e *Leucosporidium fellii* leveduras psicrofílicas ou *Hortaea werneckii,*isoladade ambientes halófilos nos quais a membranacelular adquiriu como caráter evolutivouma maior quantidade de glicerol, favorecendo funçõesde osmoregulação)(CHENet al. 2012; MAGGUIet al. 2013; TRESEDER; LENNON, 2015; YURKOVet al. 2015).

O estabelecimento das leveduras nos habitats esta favorecido pela capacidade destas de produziremenzimas, as quais favorecerem os processos fisiológicos e ecológicos nohospedeiro (GLUSHAKOVA E CHERNOV, 2004; FERNANDEZ et al. 2011; MESTRE et al. 2014).Alem de favorecer o estabelecimento das comunidades, participam na geração de produtos que são usadospelos vetores e polinizadores contribuindo com sua dispersão. Como também são encontradasem associações mistas de fungos-algas (líquens) (STARMER; LACHANCE, 2011) estabelecendo assembleias nas quaisos papeis que desempenham ainda não são bem conhecidos; assim como em associações com animais (PAGANI et al. 2016b).

Estima-se também que entre 60–80% dos processos de intercambio gaseoso (respiração) no solo são levados acabo pelos fungos,entre estes as leveduras, e que contribuem consideravelmente à biomassa microbiana no solo.Também têm sido apresentadosavançosno conhecimento sobre o papel que as leveduras desempenham como promotores do crescimento em plantas,levandoem conta às múltiplas interaçõesnas assembleias microbianas que se constituem frequentemente,por meio de estruturas de polissacarídeos extracelulares conhecidas como biofilmes(COUÉE, 2015; FUet al. 2016; MAŠÍNOVÁ et al. 2016).

Além disso, as leveduras têm sido isoladas de ambientes antárticos e tropicais (BRANDÃO et al. 2017), partículas de matéria no ar presentes em ambientes com altos níveis de polução (ALGHAMDI et al. 2014), ambientes xerofíticos (PULSCHEN et al. 2015), ambientes marinhos (JONES et al. 2015) e em associação com plantas, onde uma das hipóteses na colonização é a transferência horizontal da planta “mãe” aos brotos ou entre a mesma planta (FORTE et al. 2016).

Hawksworth e colaboradores (2017)estimaram a biodiversidade de fungosincluindo levedurasno planeta em 2,2 a 3,8 milhão de espécies, baseado na diversidade de plantas vasculares e da possível relação planta-fungo, no seu estudo realizado em zonas temperadas estimou-seesta proporção em 1:6 para 1991 uma relação conservadora, já que na atualidade esta relação estão em torno de 9.8:1. Relação suportada pelo numero de plantas vasculares atualmente reportada de 380.000.

3.6ASSOCIAÇÃO PLANTA- MICRO-ORGANISMOS

Margulis e Fester (1991) discutiramsobre a evolução dos organismos e adependência que estes tinham das interações, principalmente de cooperação eassociações mutualistas.As plantas no seu processo de colonização da terra desenvolveram fortes associações mutualistas com uma variedade ampla de micro-organismos(microbiota) eprovavelmente, estas interaçõespermitiram a fixação dasplantas aos substratos, resistência ao estresse (LEBEIS, 2015), absorção e aquisição de nutrientes em ambientes oligotróficos, imunização, disponibilização de sustâncias úteis para o metabolismo e crescimento, a partir de subprodutos ou processo favorecidos por os micro-organismosna rizosfera e filosfera, favorcendo os diferentes processos biogeoquímicos na terra (MARTIN, 1992; VORHOLT, 2012; UROZ E BARKER, 2017).

Por outro lado, diversos micro-organismos contribuem para amanutenção da saúde da planta, tal como supressão e antagonismo a patógenos (FONSECA; INÁCIO, 2006; ANDREOTE; GUMIERE; DURRER, 2014; MOLLER et al. 2015).Se entende então, que as interações apresentadas entre fungos e plantas contribuem diretamente para moldar algumas das comunidades mais biodiversas da terra (SHAFFER, et al. 2016). Embora, os micro-organismos estejamassociados as diferentes estruturas nas plantas, porção aérea da planta (filosfera) ou porção subterrânea (rizosfera)(LINDOW; BRANDL, 2003; COUÉE, 2015; BRINGEL, 2017), o solo é definido como uma das principais fontes, dos micro-organismos, que interagem com plantas e como esta microbiota depende da disponibilidade de recursos e as condições fisiológicas que

estejam presentes, nas diferentes estruturas da planta e entre plantas (VORHOLT, 2012; MAŠÍNOVÁ et al. 2016; MARTIN;UROZ ; BARKER, 2017).

3.6.1. MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS A FILOSFERA DE PLANTAS

A filosfera é um habitat no qual estabelecem-se muitas assembleias de micro-organismos, estas se podem subdividir em relação à disponibilidade de substrato (nutrientes e recursos em geral),que são fornecidos pelos hospedeiros para os processos fisiológicos dos micro-organismos. A sua vez estes fatores controlam a diversidadeda microbiota em cada uma das regiões da planta (habitats: caulosfera (caule), carposfera (frutos), antosfera (flores) e filoplano (superfície das folhas)(FONSECA; INÁCIO, 2006; BALDRIAN, 2017).

Também é um ambiente altamente heterogêneo e rico em nutrientes, que permitem a coexistências e diversificação de uma ampla gama da vida microbiana (VACHER et al. 2016) e que compreende um dos nichos terrestres mais extensos do planeta.Estima-se que a área foliar das plantas da terra sejade 6,4 X 108 km², o que corresponde e excede a área total da biosfera (FIKEL, et al. 2011; BALDRAIN, 2016) proporcionando assim um habitat para centenas milhões de micro-organismos que têm representantes dos fungos em particular das leveduras.

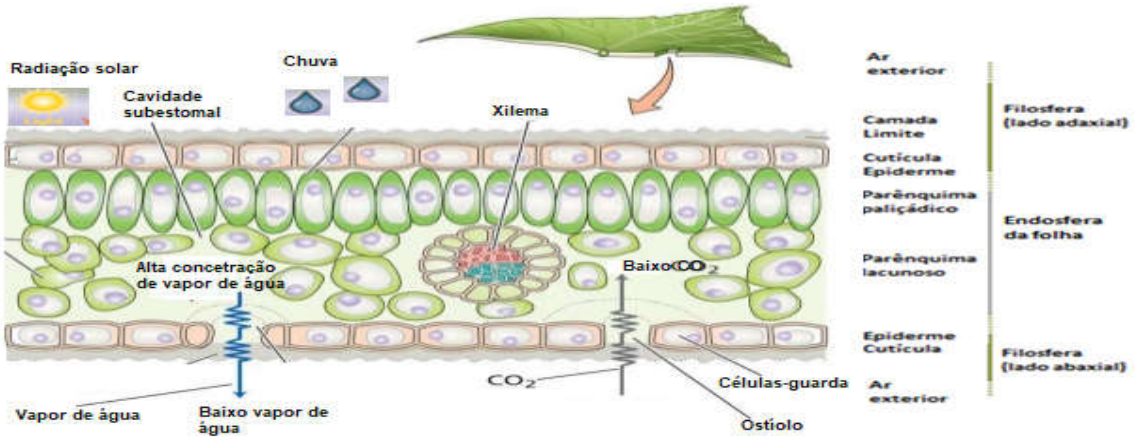
Muitas espécies de micro-organismos incluindo as leveduras são fortes colonizadores do filoplano das plantas(LIMTONG e NASANIT, 2017).Essa colonização é dada de diversas maneiras: por meio da transferência horizontal na planta (e.g. folhas de uma planta adulta para outra), por dispersão aérea direta pelo vento ou através de vetores, em particular insetos (WHIPPS et al. 2008; BULGARELLI et al. 2013, VACHER et al. 2016),outras podem se estabelecer nas sementes, na rizosfera ou nos galhos das plantas (VORHOLT, 2012, YURKOV et al. 2013, 2015). A colonização está favorecida pela alta capacidade de complementariedade de nicho funcional que apresentam os micro-organismos (BRADLEY et al. 2017). No casodos fitopatógenos, por exemplo, estes podem ser transmitidos de uma planta-reservatório para plantas vizinhas (BECKSTEAD et al. 2010; WILSON et al. 2014).

É assim que as dinâmicas de sucessão da microbiota no filoplano estão relacionadas a múltiplos fatores físicos, químicos e biológicos que controlam as mudanças cronológicas dacomposição damicrobiota na filosfera das plantas (LÓPEZ-GONZÁLEZ et al. 2015;LEBEIS, 2015; FORTE et al. 2016;THAKUR, 2017). De fato, a estrutura das comunidades microbianas depende claramente da fenologia das folhas,apresentando trocade espécies (do termino em inglês "*turnover*") de acordo como estado do filoplano. Apermanência de muitos destes micro-organismos (transientes) depende das condições microclimáticas, competitividade e da disponibilidade de recursos suficientes,enquanto outros são permanentes (residentes neste hábitat) e cumprem funções estabelecidas no hospedeiro (FONSECA; INÁCIO, 2006;MARTIN; UROZ; BARKER, 2017).

Em geral,o estabelecimento dosmicro-organismos no filoplano depende da capacidade de responder e se adaptar as mudanças que este habitat apresenta, bem como explorar nichos altamente específicos, como tricomas e depressões estomáticas (VORHOLT, 2012). O filoplano apresenta condições que podem chegar a ser muito extremas para o estabelecimento e permanência das assembleias de micro-organismos (VACHER et al. 2016;FORTE et al. 2016).

Diversas características que pode atuar de maneira seletiva no estabelecimento da microbiota é a composição da cutícula, que pode afetar a distribuição das comunidades,e outra variável que regula a presença é a exposição constante das folhasà radiação UV, como também a indisponibilidade de água e de nutrientes, flutuações na temperatura,assim como o genótipo do hospedeiro, os quais sãofatores que condicionam o estabelecimento dosmicro-organismos epifíticos ou endofiticos no filoplano(VACHER et al. 2016;FORTE et al.2016;FU et al. 2016) (Figura 12).

Figura 12.Atributos estruturais e função da filosfera.A filosfera se estende da superfície até os tecidos internos da folha e é o habitat de uma microbiota complexa que usam os açúcares e os nutrientes inorgânicos exsudados para a superfície da folha através da lixiviação. Os micro-organismos colonizam os tecidos foliares internos a traves dos estomas e estruturas celulares em forma de canales. Adaptado de TAIZ; ZEIGER (2010).



No entanto, diversos micro-organismos, em particular leveduras,apresentam traços funcionais que permitem-lhes colonizar as regiões aéreas das plantas (por exemplo leveduras Basidiomycota produtoras de pigmentos, gêneros como, *Symmetrosopora, Rhodotorula* e *Sporobolomyces* produzem carotenóides que tem propriedades antioxidantes, conferindo nelas uma vantagem competitiva para oestabelecimento nestes substrato,onde a irradiação UV é maior; além de serem produtos de um alto interesse comercial (e.g. *Rhodotorula phaffia*) (AL-TURKI et al. 2016; COBBAN et al. 2016).

Alem dos fatores ambientais, a estrutura e composição química das folhas das platas (e.g aproporção de lignina)condicionam a presença de micro-organismos nestes nichos; em particular deleveduras endofíticas,que são leveduras maisespecializadas que particupam naconversão de substratos como dióxido de carbono, açúcares e ácidos orgânicos frecuentemente encontrados nas folhas.Mais de 70 leveduras foram analisadas por Sitepu e colaboradores (2016),das quais50% estavam associadas a

decomposição de lignocelulase, o substrato mais amplo nas estruturas vegetais; mostrando a habilidade das leveduras na colonização das folhas.Por outro lado, a microbiota está exposta a várias toxinas hospedeiras e devem se adaptar a um ambiente onde fontes de carbono e aminoácidos podem não estar disponíveis (SLAVIKOVAet al. 2007; LACHANCE, 2011; VACHERet al. 2016).

3.6.2. LEVEDURAS NO FILOPLANO

Micro-organismos apresentam diversas relações com hospedeiros vegetais, das quais podem ser como patógenos, simbiontes entre outras, estas associações sugeremque existem outros fatores como as associações com os insetos, os quais funcionavam como vetores altamente específicos (VEGA;BLACKWELL,2005).A proporção de leveduras no filoplano pode ser tão elevada como (500 células / cm^2), mas a composição das assembleias é altamente variável dentro da mesma planta ou entre plantas adjacentes (INÁCIO et al. 2010). O mesmo patrão de distribuição foi achado para bactérias por Louca e colaboradores (2016), usando as bromélias como modelo de estudo.

Silva e colaboradores (2005; 2006) relacionaram o filoplano de diferentesespécies de plantas do Mediterrâneo com a ocorrência e a diversidade de leveduras muitas delas associadas as plantas por apresentar a capacidade de hidrolisar ou fracionar um variado grupo de compostos depositados nas folhas. Issto favorece a fixação das comunidades neste substrato. Para as análises deste estudo utilizou-se ferramentas taxonômicas convencionais e técnicas moleculares para a determinação das relações filogenéticas das espécies, os resultados obtidos demonstraram que aproximadamente 90% das leveduras isoladas do filoplano desse trabalho forambasidiomicética (de um total de cerca de 850 linhagens).

Conforme ao anterior, as leveduras podem estar associadas ao filoplano como comensais, saprófitas ou mutualistas, desempenhando funções variadascomo ainibição deagentes fitopatógenos (STARMER; LACHANCE, 2011, FONSECA; INÁCIO, 2006; GOMES et al. 2015). Do mesmo modo podem desenvolver interações que lhes permitematuar em processos ecológicos importantes, como a decomposição da matéria

orgânica, álcoois simples ea ciclagem de nutrientes (BALDRIAN, 2017), favorecendo o crescimento das raízes, folhas e o desempenho da planta (através da produção de fitohormônios), entre outras atividades (HERRERA; POZO 2010; MOLLER et al. 2015).

Consequentemente, estudos têm sido realizados analisando o potencial como agentes de biocontrole de fungos patogênicosem frutas e vegetais comercialmente importantes (LIMAet al. 2011;SEPULVEDA, et al. 2011), bem como associadas com substratos vegetais principalemte com a filosfera das plantas (folhas, diferentes tipos de frutos, flores e inflorescências), que têm diferentes conteúdos de açúcares e fontes de carbono e nitrogênio, encontradas em associação (INÁCIOet al. 2006; MEYER; LEVEAU, 2012; LANDELL et al. 2015; FUet al. 2016; FELIX, et al. 2017).

De maneira mais especifica, as bromélias possuem condições morfológicas e fisiológicas que as constituemcomo nichos ecológicos fundamentaise modelos ecológicos a pequena escala para o estudo das assembleias microbianas(LOUCAet al. 2016; GIBBONS, 2017). Estas relações foram tratadas por Leroy (2016), que evidenciou o papel fundamental que cumprem a presença de micro-organismos, na ministração denutrientes essenciais paraas bromélias, favorecendo a sua fisiologiafuncional e a sobrevivência do hospedeiro, até o fitness da planta.

Por outro lado, Landell e colaboradores (2006) fizeram a primeira abordagem relacionando as leveduras com este modelo de ecossistema em miniatura (as bromélias). Nessaabordagem foi utilizanda taxonomia convencional, relatandoassociações de leveduras basidiomicéticas (aproximadamente 70%)com maior afinidade por estes substratos (folhas); onde os gêneros mais representativos foram,*Papiliotrema; Rhodotorula, Sporobolomyces*. No entanto, as leveduras com afinidade ascomicética (aproximadamente 30%) foram representadas pelo gênero *Candida* (com algumas espécies não determinadas).Já Hagler e colaboradores (1993) sugeriram a presença de linhagens possivelmente não descritas de leveduras isoladas de bromélias, por divergências nas características fisiológicas e/ou morfológicas, o que abriu as portas para a descrição de espécies novas.

Recentementeo estudo da diversidade de leveduras associadas a bromélias tem sido incrementado, corroborando o já planteado de descrição de espécies novas, e

assim que no artigo relacionado a esta dissertação de Felix e colaboradores (2017), foram descritas duas espécies novas da família Trimorphomycetaceae (Basidiomycota), a primeira isolada do filoplano da bromélia do gênero *Hohenbergiae*, denominada*Carlosrosaea hohenbergia*e a segunda espécie isolada da bromélia do gênero *Aechmea, Carlosrosaea aechmeae,* na Mata Atlântica Setentrional do Brasil. Outros trabalhos que descrevem espécies novas de leveduras obtidos da interação com bromélias têm sido descritas, as quais tem pertencido tantoao filo Ascomycota (e.g. ARAUJO et al. 2012; LANDELL et al. 2010; RUIVO et al. 2005; SAFAR et al. 2013), bem comoao filo Basidiomycota (e.g. GOMES et al. 2015; LANDELL et al. 2009, 2014, 2015; PAGANI et al. 2016a). Isso confere o potencial que apresentameste ecossistema em miniatura como fonte de espécies novas deste de leveduras em particular (GOMES et al. 2015; MAUTONE et al. 2010; SAFAR et al. 2013).

4. Metodologia

4.1 Locais de amostragem

As amostras de bromélias foram coletadas em quatro locais do domino Setentrional da Mata Atlântica (sensu Velloso et al. 1991), com autorização de coleta pelas atividades competentes (Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio), Usina Caeté, Parque Memorial Quilombo dos Palmares): 1. Parque Memorial Quilombo dos Palmares - Serra da Barriga (9°10'12.89"Se 36° 5'21.19"W), com uma extenção aproximada de 2.797 hectareas, localizada no município de União dos Palmares, zona caracterizada pela visitação de turismo; 2. Reserva Biológica Federal de Pedra Talhada (REBIO) (9°14'48"S e 36°24'26"W), com uma extenção de 4.469hectareas no município de Quebrangulo, conformado por uma floresta estacional semidecidual e considerada zona de exploração minera;3. Estação Ecológica (ESEC) de Murici (09º12'52”S e 35°52'13.89"W), conformada por 6.116 hectareas no município de Murici, caraterizado por uma floresta ombrófila densa e fechada, e 4. Serra da Saudinha que faz parte da Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) (09°22'07"S e 35°42'57"W), com uma área de aproximadamente 1.210 hectares em Maceió onde predominantemente se tem uma floresta ombrófila.

4.2 Coleta de dados, processamento e manutençãodos isolados

Nos quatro pontos de amostragem foram coletadas porções do filoplano das bromélias, sendo realizadas no total oito coletas, umainicial em cada pontoefetuadas nos anos de 2013 – 2015(dados obtidos do Laboratório de Diversidade Molecular da UFAL) e dois a três anos depois realizou-se a coleta réplica para cada ponto no período 2016 – 2017 (Tabela 1).Durante ascoletas foram tomados registros fotográficos das bromélias para posterior identificação, além de aferidos parâmetros físicos como temperatura, umidade, altitude e geográficos comolatitude e longitudeusando umasonda multiparâmetros Instrutherm THDL-400 e um aparelho de Global Position Sistem (GPS) Discovery Channel.

Tabela 1.Pontos de amostragem e datas de cada coleta na Mata Atlântica Setentrional.

LOCAL	DATA COLETA 1	DATA COLETA 2
MACEIÓ (SERRA DA SAUDINHA)	03/02/2015	16/02/2017
MURICI (RESERVA ECOLÓGICA DE MURICI)	28/04/2014	24/04/2016
QUEBRANGULO (RESERVA PEDRA TALHADA)	27/11/2013	13/01/2016
UNIÃO DOS PALMARES (SERRA DA BARRIGA)	31/07/2013	21/07/2016

Em cada coleta, 10 amostras de folhas e em alguns casos (quando disponíveis) inflorescências de bromélias maduras em bom estado fitossanitário foram coletadas em sacos plásticos estéreis e preservadas à 4°C até o processamento no laboratório, em um tempo máximo de 24 horas,assegurando assim a viabilidade no cultivo dos micro-organismos. As folhas einflorescênciasforam lavadas com água destilada estéril com a finalidade de retirar a poeira, outros materiais, assim como diversos micro-organismo transientes presentes nas superfícies das amostras para posteriormente serem processadas.

Asinflorescências, além de serem submetidas aos mesmos processos das folhas.Após a lavagem, porções de aproximadamente 10 cm^2foram cortadas, tomadas assepticamente e colocadas em frascos Erlenmeyers com 50 mL de água destilada estéril eentão submetidos a agitação mecânicapor 10 minutos a 180 RPM. A água de cada Erlenmeyer foi descartada,e em seguida foramfeitas duas lavagens sucessivaspor separado do precipitado, com 30 mL de Tween20 0,5% esubmetidas a agitação mecânica por 30 minutos a 180 rpm cada uma. Após a última lavagem, duas alíquotas de 0,1 mL foram usadas, a primeira foi semeada diretamente nas placas, da segunda alíquotaforam realizadas diluições decimais seriadas até 10^{-2}esemeadas em duplicata através da técnica de espalhamento de superfície em meio YM suplementado com cloranfenicol 0,04% pH 4,0 e incubadas a 22-25ºC por 5-7 dias (LANDELL et al. 2009; LANDELL; MAUTONE; VALENTE, 2006; MAUTONE et al. 2010).Após o período de incubação, o crescimento nas placas foi verificado mediante observação direita, com a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), e as colônias (linhagens) com características macro morfológicas de leveduras e fungos semelhantes a leveduras

foram transferidas a novas placas usando a técnica de estria de esgotamento em meio YPD sólido (2% de glicose, 2% de ágar, 1% de peptona bacteriológica e 0,5% de extrato de levedura).O procedimento foi repetido pelo menos duas vezes, tentando obter isolamento total dos morfotipos presentes em cada placa. Para conferir os morfotipos isolados das leveduras, utilizou-se microscopia óptica de campo claro (aumentos de 40 e 100x).

As linhagens foram codificadas, fichadas catalograficamente e estocadas usando três diferentes métodos: **1)** Tubos de ensaio tampa rosca inclinados contendo o meio Ágar GYMP (2% de glicose, 2% de extrato de malte, 0,5% de extrato de levedura, 0,2% de fosfato de sódio monobásico e 2% de ágar), onde os isolados foram inoculados e após 48 horas de crescimento a 22-25 ºC recobertos com óleo mineral estéril e armazenados a 4ºC. **2)** Criotubos (YPD 50%) 900µL: contendo meio caldo YPD modificado (1% de glicose, 0,5% de peptona bacteriológica e 0,25% de extrato de levedura), inoculados e após 48 horas de crescimento a 22-25 ºC foram conservados na geladeira a 4ºC;**3)** Criotubos(YPD + glicerol 30%) contendo meio caldo YPD. Após o crescimento, foi adicionado glicerol a uma concentração final de 30%.Em seguida, foram homogeneizados e armazenados a -20ºC.

4.3Identificação taxonômica das bromélias

A identificação taxonômica das bromélias coletadasrealizou-sefundamentada na utilização de caracteres morfológicos vegetativos, dasestruturas florais, habitats de preferência (terrícola, epífita e saxícola) e distribuição geográfica, com auxílio de literatura especializada (e.x. SIQUEIRA FILHO e LEME, 2006).

4.4Caracterização e Identificação das Leveduras

As leveduras foram identificadas utilizando uma abordagem polifásica que combina características morfológicas, fisiológicas e moleculares.

4.4.1. Descrição Fenotípica das leveduras

A descrição dos traços morfológicosmacroscópicos coloniais (coloração, tipo de margem, consistência, elevação e superfície) realizou-se mediante observação através doestereoscópio (Ref. MOTIC SMZ140) com os aumentos de 2X e 4X. Para a diferenciação micro morfológica (segundo sua forma, tamanho, formação de pseudohifa, tipo de propagação vegetativa e número de brotamentos), foi utilizada microscopia óptica de campo claro nos aumentos de 40 e 100X usando um microscópio Olympus (Ref. CX40 RF200), de acordo com as chaves e descrições na literatura (KURTZMAN et al. 2011).

4.4.2. Teste Fisiológico de urease e reação ao Diazônio Azul B (DBB)

O teste de produção de urease e reação ao corante Diazônio Azul B (DBB)seguiu recomendação descritapor Hagler *et al.*(1981). Testes utilizados para diferenciar as leveduras dos filos Ascomycota e Basidiomycota.Geralmente os isolados que produziram urease e foram reativos ao DBB apresentaram afinidade basidiomicética, enquanto os isolados que não produziram urease e não reagiram ao DBB, possuem afinidade ascomicética (HAGLER *et al.* 1981).

Na preparação usou-se o meio Ágar ureia (1,17% YCB, 1% de ureia, 2% de ágar e fucsina ácida), preparado em tuboscom tampa rosca. Paralelamente a ureia foi esterilizada por filtração. Após a esterilizaçãodo meio, adicionou-seureia nas proporções químicas (meio 2,25 ml + ureia estéril 10% 0,25ml). Para a realização do teste foram inoculadas levedurasmetabolicamente ativas com 48h decrescimento no meio e incubadas a 22-25 ºC.Aleitura do teste foi realizada diariamente após 1, 2 e 3 dias de crescimento. A atividade da enzima urease quando presente nas linhagens provocou uma alteraçãono indicador de uma cor fucsina (rosa) para uma cor branca, gerada pelaelevação do pH, alcalinizando o meio e neutralizado a fucsina ácida após a hidrolises da ureia presente no meio. Produzir urease é uma característica principalmente relacionada com leveduras de afinidade basidiomicética (HAGLER *et al.,*1981; DELL 2009; KURTZMAN et al. 2011). Após do terceiro dia de leitura, os tubos foram incubados a 60ºC durante 16 horas, e após esse período, 1 ml de solução de DBB diluído em Tris-HCl 1M pH 7,0 foi adicionada aos tubos. Os isolados foram considerados

positivos para a reação quando apresentaram uma coloração avermelhada em contato com a solução e, portanto, foram considerados com afinidade basidiomicética (HAGLER, *et al.,*1981; KURTZMAN et al. 2011).

4.5 Extração de DNA genômico total

O DNA de levedura foi extraído e purificado de acordo com Ramos et al. (2001). Os isoladosforam inoculados em placas de Petri com meio Ágar YPD e incubadas por 3-6 dias a uma temperatura média de 24ºC. Uma vez selecionadas as colônias, foram inoculadas em tubos com tampa rosca com 2 mL de caldo Sabouraud e incubadas por 48 horas a uma temperatura entre 23-25°C. Após o crescimento, o conteúdo foi transferido para um tubo tipo Eppendorf e centrifugado a 21293 xgdurante 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e lavado duas vezes com água destilada estéril. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tampão de lise (0,15M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10mM de EDTA, 2% SDS pH 8,0) e o material incubado a 65ºC por uma hora. Imediatamente após foram adicionados 200 µL de Acetato de Potássio 5M pH 4.8 e as amostras foram agitadas mecanicamente com auxílio de um vórtex por 1 min e então incubadas em banho de gelo por 30 min. Após este período, realizou-se a etapa de centrifugação por 5 min a 21293 x gduas vezes com a finalidade de retirar o máximo possível de impurezas. Para a precipitação do DNA, adicionou-se 500 µL de Isopropanol a -20 °C e as amostras foram mantidas em freezer por*overnight*. O material foi então centrifugado por 20 min a 21293 x g, retirado o isopropanol e adicionados 200 µL de etanol 70% mantido a -20 °C. Finalmente, se centrifugou por 5 min a 21293 ge foi retirado o excesso de etanol. As amostras foram secas em temperatura ambiente, ressuspendidas em 50 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl pH=7,6 / 1mM EDTA pH=8,0) e estocadas a -20°C. Para verificar a qualidade e a quantidade do DNA, foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8 - 1% (p/vol) corado com o corante SybrSafe.

4.6 Sequenciamento das regiões ITS e D1/D2 do LSU gene 26S rDNA.

Após a verificação feita por eletroforese, realizou-se as amplificações da região D1/D2 da LSU, utilizados os oligonucleotídeos iniciadores NL1 (5’ -GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3’) e NL4 (5’-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3’)White et al. (1990) e Kurtzman et al (1998), assim como os espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) do rDNAutilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5’-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3’) e ITS4 (5’-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3’) (FELL et al. 2000). A reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com volume final de 25µL, obedeceu a seguinte composição: 20 – 30 ng de DNA, 0,6 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (20 pmol); 1,25 µL $MgCl_2$; 2,5 µL (50mM) PCR buffer (10x); 2,5 µL dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (2mM); 0,1 µL Taq polimerase (Invitrogen) (0.5 U). A região de amplificação foi constituída por um primeiro passo de desnaturação a 95°C durante 5 min, seguido de 33 ciclos de 45 seg a 95°C, 30 seg a 56°C e 1 min a 72°C, com uma extensão final de 72°C durante 5 min.

Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados seguindo o protocolo descrito no site https://openwetware.org/wiki/isopropanol_Precipitation_for_PCR. Inicialmente, ao volume produto da PCR adicionou-se 5 µL de Acetato de sódio 3M (- 20 °C). Após, adicionou-se 20 µL de isopropanol (- 20 °C), mantidos a - 20ºC por 30 min e centrifugados a 21293 gpor 5 min. O isopropanol foi retirado e adicionados 50 µL de etanol 70% a -20°C. Finalmente, se retirou o excesso de etanol e as amostras foram expostas a temperatura ambiente para a secagem e o pellet ressuspendido em 15 µL de água destilada estéril. A pureza e a quantidade do produto de PCR verificaram-se mediante espectrofotometria a 260nm e enviadas para o sequenciamento através do equipamento ABI 3000. As sequências foramcuradas manualmente utilizando o programa STADEN Package (STADEN et al. 2000) e comparadas (mediante homologia) com sequências já depositadas no banco de dados do GenBank, utilizando a ferramenta BLAST Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) (ALTSCHUL et al. 1997), disponível no site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Após,conferimos a similaridade ou homologia locais entre as sequências de nucleotídeos obtida de nosso trabalho com a sequencias depositadas base dedados GenBank.Posteriormente se fez o alinhamento com a

linhagem tipo, assima como as arvores filogeneticasutilizandoa ferramenta Muscle dentrodo programa MEGA 7.0 (KUMAR et al. 2016).

4.7 Análisesde diversidade

Foi feita a curvas de acumulação de espécies. Foram comparadas as amostras para as quais o resultado no número do isolamento foi desigual ou com um número total de contagens muito variável e gerada uma curva de rarefação por meio de um re-amostragem do conjunto de indivíduos(GOTELLI; COLWELL, 2001). Esto com a finalidade de determinar se a amostragem feita nos locais tinha sido suficiente para caracterizar as comunidades de leveduras presentes na área de amostragem. A partir desta curva de acumulação de espécies forma calculados os estimadores de riqueza CHAO2 e Bootstrap, os dois baseados em amostras com um alto numero de espécies raras.

A diversidade da comunidade de leveduras associada ao filoplano foi avaliada através dosindices baseados na abundância. Por meio da utilização de parâmetros de uniformidade (equitabilidade) quanto a riqueza de espécies, chamados de índices de heterogeneidade. Tambem foi calculado o índice de Shannon-Weaver (H') quem dá maior peso para as espécies raras e o índice de dominância Simpson.

As medições da diversidade (β), têm sido feitas a traves do uso de índices de similaridade (a medida de dissimilaridade) (PROBER et al. 2015), quanto maior a diversidade β, maior é a diferença na composição de espécies dos locais. Foram avaliadas correlações entre a a dissimilaridade encontradas nos locais e atributos geográficos usando o teoricamente mais relevante, padrões de biodiversidade espacial: a relação distância\declínio (variação da composição da comunidade com a distância geográfica) (GREEN; BOHANNAN,2006;BARTON et al. 2013). Assim como variables ecológicas como a disponibilidade de hospedeiros (espécies de bromélias)

que podem também influenciar a composição de espécies (heterogeneidade) nos locais (TEDERSOO et al. 2014).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho em taxonomia de leveduras é pioneiro na região Nordeste do Brasil e constitue uma ferramenta importante como base no entendimento dos processos ecológicos que acontecem nas plantas, baseado no conhecimento das comunidades de leveduras associadas a filosfera de bromélias. Além disso, a descrição de espécie novas contribui no conhecimento da riqueza de micro-organismos no estado de Alagoas-Brasil gerando uma visão de como são constituídos estes ambientes.

5.1. As bromélias como modelo ecológico para leveduras na Mata Atlântica Setentrional região Nordeste de Brasil

A partir de 90 amostras debroméliasem boascondições fitossanitárias (68amostras de filoplano e 22de antosfera), levando em consideração que não de todos os substratos (antosfera e filoplano) coletados foram isoladas leveduras. Um total de 320 leveduras forma obtidas,resultandoem uma riqueza de 114 espécies.

As bromélias foram representadas por 27 espécies e 13 gêneros, aproximadamente 30% dos reportados para a Mata Atlântica.Apesar da taxonomia deste grupo de plantasnão serobjetivo deste trabalho.De acordo com os resultados deste estudo, às bromélias apresentaram os trêstipos de habitats característicosdesta família (epífita, saxícola e terrícola), assim não foi evidenciada uma prevalência das leveduras por ninnhum dos habitats das bromélias de manera especifica.A representatividade de bromélias para cada local foi amplamente

heterogênea e considera-se que a composição é influenciada pelas características ecológicas de cada local, isto é evidenciado pelos estudos que associam as bromélias como substrato de micro-organismos principalmente leveduras para este bioma (RUIVO et al. 2005, LANDEL et al. 2006; 2009; 2010, GOMES eta al. 2014 PAGANI et al. 2016, FELIX et al. 2017), refletindo a alta diversidade e riquezadas bromélias ao longo da Mata Atlântica.

As espécies *Aechmea costantinii*e *Lamprococcus chlorocarpus*foram as únicas bromélias compartilhadas para os quatro locais, com representação de indivíduos nos diferentes habitats (epifítico, terrícola e saxícola). Levando em consideração só o filoplano, *A. costantinii* teve uma ampla distribuição, assim como um aplo número de espécies de leveduras associadas.Espécies como *Tillandsia chapeuensis, Lamprococcus chlorocarpus, Portea leptantha, Aechmea froesii, Aechmea muricata, Aechmea werdermannii,* fazem parte das bromélias de habitats epífitas representadas com 35% em relação aos outros habitats, estas bromélias se caracterizadas por serem um dos gruposmais importante nas florestas neotropicais no Brasil etêm sido associadas a papéis substanciais na manutenção de nichos ecológicos para o estabelecimento de micro-organismos, como de macro-organismos (KERSTEN, 2010, FONTOURA e SANTOS, 2010; BASÍLIO et al. 2015; LOUCA et al. 2016).

5.2. Representatividade Taxonomica de leveduras

5.2.1. Representatividade dos filos Basidiomycota e Ascomycota

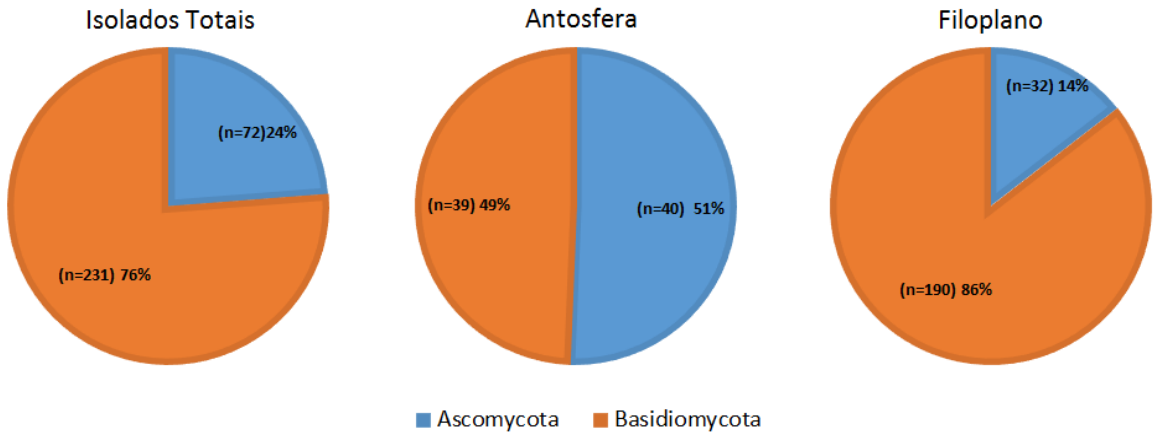
Foi obtida uma destacada representatividade de leveduras pertencentes aos dois filos (Ascomycota e Basidiomycota). Trabalhos associados a plantas têm relatado a presença de leveduras nas diferentes estruturas dos vegetais, onde as relações destes micro-organismos com seu hospedeiro estão fortemente associadas ao tipo de hospedeiro e às condições ambientais (NASANIT et al. 2017; MARTIN, UROZ E BARKER, 2017; LIMINGTON E NASANIT, 2017).

Dos resultados obtidos através do uso da taxonomia polifásica, evidenciou-se uma marcada prevalência de leveduras basidiomicéticas nas bromélias (filoplano e antosfera). No entanto, é apontado que as variações apresentadas por algumas linhagens aos testes fisiológicos e bioquímicos, pode ser explicada, segundo Vaughan-Martini (2003), pela variação intraespecífica onde linhagens da mesma espécie podem apresentar características diferentes. Porém, estes testes podem ter uma relevância para auxiliar na identificação presuntiva de diferentes leveduras (e.x. *Candida albicans, Cryptococcus/Filobasidiella neoformans*e *C. tropicalis*).

Destaca-se o uso de ferramentas moleculares, usando as regiões *barcode*para a identificação das leveduras. Foram identificados303isolados(94%) do total de leveduras (N=320). O restante (6%) está em processo de identificação e não fizeram parte das análises(Tabelas suplementares 1 e 2).

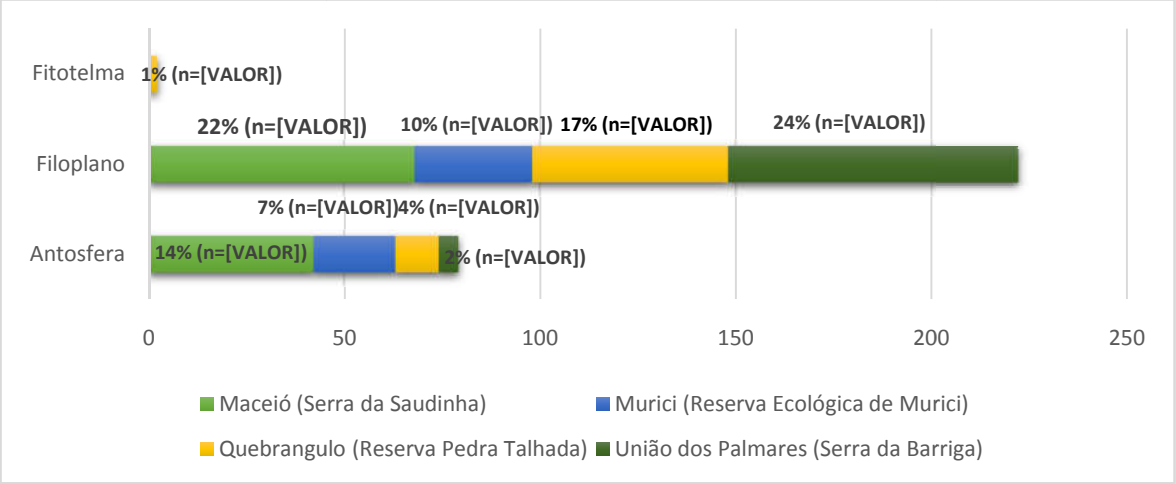
Baseado nas análises moleculares dos 303 isolados, 76% (n=231) foram determinados como basidiomicetos e 24% (n=72) como ascomicetos. A proporção existente entre filos naantosfera foi de 49% (n=39) com afinidade basidiomicética e 51% (n=40), com afinidade ascomicética. No entanto,uma prevalência de leveduras basidiomicéticas foi observada no filoplano, 86%(n=190) e 18% (n=42) afinidade ascomicética (Gráfico 1). Por meio do teste qui-quadrado de Pearson com significância de ($p<0,0001$), corroborou-se que há uma relação entre o substrato de onde foram isoladasas leveduras (Folha) e o filo ao qual pertenceram. No entanto para antosferas, não se apresentou relação, baseados quea distribuição de isolamento neste substrato para os dois filo foi equitativo.

Gráfico 1.Proporções de leveduras isoladas de Bromélias com afinidade Ascomicética e Basidiomicética em relação ao substrato do isolamento (Antosfera e Filoplano).



Os isolados foram divididos em dois grupos (filoplano e antosfera). Dototal de isolados (n=303), 222 foram obtidosdo filoplano e79 daantosfera das bromélias. Além disso, dois isoladosse obtiveram de amostras da água do fitotelma (tanques de bromélias), do local Pedra Talhada no município de Quebrangulo (*Hannaella zeae* e *Vishniacozyma* sp. nov.1), as duascom afinidade basidiomicética. A espécie *H. zeae* foi exclusiva deste substrato (fitotelma) e é conhecidamente produtora de esterase, enzima já relatada para leveduras associadas a plantas por Mautone e colaboradores (2010).A enzima esterase tem atividade catalítica e hidrolítica, o que confere aos micro-organismos produtores atuar sobre um amplo espectro de substratos, entre estes, material em decomposição, uma atividade que acontece amplamente nos tanques das bromélias (LEROY et al. 2017). No caso de *Vishniacozyma* sp. nov. 1, foi isolada também do filoplano das bromélias. Neste trabalho, a relação geral de associação de isolados por local é apresentada no Gráfico 2.

Gráfico 2.Distribuição dos isolados de leveduras em relação ao substrato de isolamento em cada um dos locais de coleta.



5.2.1.1 Basidiomycota e Ascomycota na antosfera

De acordo com o esforço amostral, obtiveram-se 79isoladosde flores nos quatro pontos de amostragem (Gráfico 2), destacando Maceió com 42 isolados, seguido de Murici, Quebrangulo e União dos Palmares, com 21, 11 e 5 respectivamente. Treze espécies de bromélias estiveram relacionadas às linhagens de leveduras, obtidos um total de 34 espécies de leveduras associadas a este substrato (Tabela 2).

Tabela 2.Distribuição taxonômica das espécies de leveduras isoladas da antosfera de Bromélias e suas respectivas frequências obtidas nos 4 locais amostrados na Mata Atlântica Setentrional.

	Maceió	Murici	Quebrangulo	União dos Palmares	Total
Ascomycota	**25**	**11**	**4**	**0**	**40**
Aureobasidium pullulans	3				3
Aureobasidium thailandense	4		1		5
Clavispora\Candida intermedia		4	3		7
Clavispora\C. pseudointermedia	2				2

Hanseniaspora sp. nov.		1			1
Hanseniaspora uvarum	3	2			5
Metschnikowia sp. nov. 1	3				3
Meyerozyma caribbica	1				1
Meyerozyma guilliermondii	4				4
Meyerozyma\Candida carpophila	2				2
Phialemoniopsis ocularis	2				2
Torulaspora delbrueckii	1				1
Wickerhamiella jalapaonensis		1			1
Yamadazyma\Candida jaroonii		3			3
Basidiomycota	**17**	**10**	**7**	**5**	**39**
Carlosrosaea hohenbergiae		2			2
Carlosrosaea sp. nov. 6				1	1
Colacogloea diffluens				1	1
Dimennazyma cistialbidi	1				1
Microstroma sp. nov. 1	2				2
Moesziomyces aphidis			2		2

Continuação - Tabela 2.Distribuição taxonômica das espécies de leveduras e suas respectivas frequências isoladas da antosfera de Bromélias, obtidas nos 4 locais amostrados na Mata Atlântica Setentrional.

Occultifur sp. nov. 1			2		2
Papiliotrema flavescens	5	3	1		9
Papiliotrema miconiae	1				1
Papiliotrema nemorosus	1				1
Papiliotrema sp. nov. 1		1	1	1	3
Piskurozyma sp. nov.		1			1
Pseudohyphozyma bogoriensis		2			2
Pseudozyma hubeiensis	3	1			4
Pseudozyma sp. nov.			1		1
Rhodosporidiobolus ruineniae	2				2
Saitozyma podzolica	1				1
Sporobolomyces carnicolor	1				1
Vishniacozyma sp. nov. 2				1	1
Vishniacozyma taibaiensis				1	1
Total geral	**42**	**21**	**11**	**5**	**79**

As espécies mais representativas na antosfera das bromélias neste estudo foram *Papiliotrema flavescens* (nove isolados), que pertence ao gênero proposto por

Liu e colaboradores em 2015,como resultado da união de pequenos clados monofiléticos (*Auriculibuller, laurentii*, *Papiliotrema, pseudoalba e aureus*) (LIU et al. 2015) e a espécie ascomicética*Candida intermedia* (sete isolados), conhecida por ter ampla distribuição e que foi isolada de diferentes ambientes, entre estes,o fitotelma de bromélias em época chuvosa e em ambientes árticos (GOMES et al. 2014; BRANDA et al. 2010), também considerada uma espécie generalista (RUIVO et al. 2005).

A espécie *P. flavescens* tem sido descrita como uma espécie associada a diferentes habitats, em particular a plantas (LIMTONG E NASANIT, 2017). Em nosso estudo, *P. flavescens* foi isolada de flores de oito espécies de bromélias, as quais foram obtidas de três dos locais amostrados, indicando uma ampla distribuição e uma alta capacidade de colonizar diferentes nichos potenciais.*P. flavescens* também foi reportada como residente nas flores de duas famílias de plantas no trabalho de Canto, Herrera e Rodriguez (2017). O gênero *Papiliotrema* foi diverso e mais três espéciesforam reportadas neste estudo,são elas:*P. miconia P. nemorosus*e uma espécie não descrita *Papiliotrema* sp. nov. 1.

As leveduras pertencentesao gênero *Candida* foram as predominantesdentro do filo Ascomycota e amplamente associadasàs flores de bromélias nos diferentes locais amostrados. As espécies *C. intermedia, C. jaronii, C. carpophila, C. jalapaonensis*e *C. pseudointermedia* somaram 14 isolados dos 40 associados neste filo. A espécie *Wickerhamiellajalapaonensis*(*Candidajalapaonensis)* que foi proposta como uma combinação nova por Vega e colaboradores (2017);destacando a presença do gênero em três dos locais amostrados, com exceção de Quebrangulo. Outros trabalhos contrastam com os nossos resultados, Pozo, Herrera e Bazaga (2011) e VEGA e colaboradores (2017), reportam o gênero *Metschnikowia* como o mais representativo de Ascomycota em flores, sendo que este gênero só foi representadoneste estudo por uma espécie (*Metschnikowia*sp. nov. 1), isolada no local de Maceió.

Ainda no filo Ascomycota, outros gêneros bem representados foram:*Aureobasidium*(oito isolados)e *Hanseniaspora* (seis isolados), os quais

sãomostrados no trabalho de revisão de ALEKLETT, HART e SHADE (2014) como gêneros amplamente distribuídos e associados a diferentes estruturas florais.A espécie *Aureobasidiumpullulans*é considerada um fungo de distribuição ubíqua, presente no filoplano eantosfera de diferentes espécies de plantas (ABDELFATTAH et al. 2015).Isto pode ser evidenciado, já que as linhagens obtidas destes gêneros (incluída a espécie *A. pullulans*) foram isoladas em diferentes locais e de pelo menos oito espécies de bromélias.

A espécie ascomicética*Hanseniasporauvarum*também se destacoucom cinco isolados obtidos de dois dos locais amostrados.Esta espécie recentemente foi reportada como uma espécie com potencial biotecnológico, utilizada como coadjuvante nos processos de fermentação na enologia (TRISTEZZA et al. 2016). Cabe destacar que os susbstratos de isolamento (famílias de plantas) e as metodologias usadas nos diferentes trabalhos citados foram diferentes. Por enquanto, vários gêneros de leveduras ascomicéticas associadosàantosfera de bromélias neste estudo, já foram reportados como hegemônicos da antosfera ou estruturas como frutos e néctar na literatura(ROSA et al. 1999; LACHANCE; BOWLES E STARMER, 2003; FONSECA E INÁCIO, 2006; LACHANCE, 2011, ALEKLETT et al. 2013; LANDELL et al. 20014).

O filo Basidiomycota apresentou 20 espécies com a particularidade que as frequênciasrelacionadas a cada espécie foram menores. Diversos trabalhos discutem a relação de leveduras basidiomicéticas em estruturas florais, principalmente focados na composição química destas estruturas (ALEKLETT, HART E SHADE, 2014), ou gerados por eventos estocásticos favorecidos pelos mecanismos de liberação de esporos principalmente associada a leveduras basidiomicéticas (CANTO; HERRERA e RODRIGUEZ, 2017).

Levando em consideração que a metodologia usada neste trabalho consistiu em lavagens sucessivas dos substratos (neste caso flores), possivelmente este fato diminuiu a quantidade de espécies de leveduras associadas ao néctar e as estruturas reprodutivas das flores, mudando as características comumente relatadas para este substrato de predominância do filo Ascomycota (VEGA et al. 2017, POZO;

HERRERA. 2011; LACHANSE et al. 2006).Contudo as leveduras basidiomicéticas apresentaram uma maior riqueza de espécies associadas principalmente às estruturas como pétalas, sépalas e outras de caráter vegetativos, onde este tipo de leveduras é predominande. Isto possivelmente está relacionada à composição da estrutura química das das estruturas vegetativas das flores são ricas em polissacarídeos complexos, como exemplo a cutinaque é formada de ácidos graxos de cadeia longa (UEDA et al. 2015).

Diversos trabalhos têm reportado a composição de leveduras na antosfera de plantas. Vadkertiová e colaboradores (2012) usaram como substrato de isolamento de leveduras, flores e frutos de plantas onde identificaram 23 espécies a partir de 173 isolados. Em 2011, Pozo, Herrera e Bazaga, trabalhando com diferentes flores de plantas, isolaram 128 leveduras com uma riqueza de 12 espécie, enquanto Canto e colaboradores (2017) obtiveram um total de 39 espécies de leveduras distribuídas na proporção de48% Ascomycota e 52% Basidiomycota. Mais recentemente, Vega e colaboradores (2017) trabalharam com néctar de flores (113 amostras) e também com insetos, onde identificaram 114 espécies, com uma prevalência de leveduras ascomicéticas, principalmente do gênero *Wickerhamiella,* e um amplo número de espécies novas.

O que mostra quea composição das comunidades de leveduras obtidas das flores das bromélias apresentou um número relativamente alto de espécies (n=34) e com uma marcada heterogeidade para cada local e isto esteve associado a um número substancial de espécies de bromélias (n=13).Ressaltando, queadistribuição das espécies de leveduras (riqueza e frequências) pode ser determinada por diferentes fatores, entre eles o substrato (YURKOV et al. 2015; LACHANCE ET AL. 2011, 2016; BRANDÃO et al. 2017). Por enquanto, plantas associadas a diferentes habitats podem influenciar a presença de leveduras que fazem parte da hiperdiversidade de micro-organismos nestes nichos ecológicos (LACHANCE et al. 2006; HERRERA E POZO, 2010).

5.2.1.2 Basidiomycota e Ascomycota no filoplano

Dos 222 isolados obtidos do filoplano das bromélias, 86% (n=190) são leveduras basidiomicéticas e 14% (n=32) ascomicéticas (Tabela 3). Estas linhagens foram obtidas a partir de 68amostras de 26 espécies de bromélias, mostrando a ampla facilidade das leveduras de serem colonizadoras ativas deste substrato;principalmente favorecidas por relações mutualistas com a planta hospedeira, fato que pode ser evidenciado nos diversos trabalhos que relacionam este substrato com leveduras nos últimos 30 anos (INÁCIO et al. 2002; 2006; GLUSHAKOVA et al. 2007; LANDELL et al. 2010; LIMTONGet al. 2014; LIMTONG E NASANIT, 2017).

Tabela 3.Distribuição taxonômica das espécies de leveduras e suas respetivas frequências de isolamento no filoplano de Bromélias, obtidas nos quatro locais amostrados na Mata Atlântica Setentrional.

	Maceió	Murici	Quebrangulo	União dos Palmares	Total
Ascomycota	**16**	**7**	**4**	**5**	**32**
Anhellia nectandrae	1				1
Aureobasidium pullulans	2		1		3
Aureobasidium sp. nov. 1			1		1
Aureobasidium thailandense	4		2	3	9
Candida sinolaborantium		1			1
Clavispora\Candida intermedia		2			2
Exophiala sp. nov.	1				1
Hortaea werneckii				1	1
Lodderomyces\Candida parapsilosis	1	1		1	3
Metschnikowia sp. nov. 2	1				1
Meyerozyma guilliermondii	4	1			5
Phaeothecoidea sp. nov.	2				2
Yamadazyma\Candida jaroonii		2			2

Basidiomycota	52	23	46	69	190
Anomalomyces sp. nov.			1		1
Bulleribasidium sp. nov.				1	1
Carcinomyces sp. nov.			1		1
Carlosrosaea aechmeae		1			1
Carlosrosaea hohenbergiae	1	1		7	9
Carlosrosaea sp. nov.3	3	4	1	3	11
Carlosrosaea sp. nov. 4				1	1
Carlosrosaea sp. nov. 5				1	1
Carlosrosaea sp. nov.7		1			1
Carlosrosaea sp. nov.8	1			1	2
Carlosrosaea sp. nov. 9	1				1
Colacogloea cycloclastica				1	1
Colacogloea diffluens				5	5
Colacogloea sp. nov. 1	1				1
Colacogloea sp. nov. 2				1	1
Cyrenella sp. nov. 1	2				2
Cystobasidium sp. nov.	1			1	2
Fellomyces borneensis				3	3

Continuação Tabela 3. Distribuição taxonômica das espécies de leveduras e suas respetivas frequências de isolamento no filoplano de Bromélias, obtidas nos quatro locais amostrados na Mata Atlântica Setentrional.

Hannaella kunmingensis			1		1
Hannaella oryzae				1	1
Hannaella pagnoccae			3	1	4
Hannaella phetchabunensis				1	1
Hannaella siamensis			1		1
Hannaella sp. nov. 1			1	1	2
Hannaella sp. nov. 2		1			1
Hannaella sp. nov. 3		1			1
Hannaella sp. nov. 4	1				1
Hasegawazyma lactosa	1				1
Heterocephalacria sp. nov. 1	1			1	2
Jaminaea rosea	1				1
Kockovaella sacchari				1	1
Kordyana sp. nov. 1			1		1
Kordyana sp. nov. 2	1				1

Kordyana sp. nov. 3		1			1
Meira miltonrushii			1	1	2
Meira nashicola	2				2
Meira sp. nov. 2			1		1
Meredithblackwellia sp. nov.				2	2
Moesziomyces antarcticus			1		1
Moesziomyces aphidis	1		3		4
Moesziomyces rugulosa			1		1
Pattersoniomyces tillandsiae	1				1
Moesziomyces sp. nov. 2	1				1
Oberwinklerozyma sp. nov.	1				1
Occultifur externus				1	1
Occultifur sp. nov. 1				1	1
Papiliotrema flavescens	1	1	4	4	10
Papiliotrema leoncinii		6	2	6	14
Papiliotrema mangalensis	1	1			2
Papiliotrema miconiae			1		1
Papiliotrema nemorosus				2	2
Papiliotrema siamense	3				3
Papiliotrema sp. nov. 1	1			1	2
Piskurozyma taiwanensis	1	1	1	1	4
Pseudozyma hubeiensis	8		1	4	13

Continuação Tabela 3. Distribuição taxonômica das espécies de leveduras e suas respetivas frequências de isolamento no filoplano de Bromélias, obtidas nos quatro locais amostrados na Mata Atlântica Setentrional.

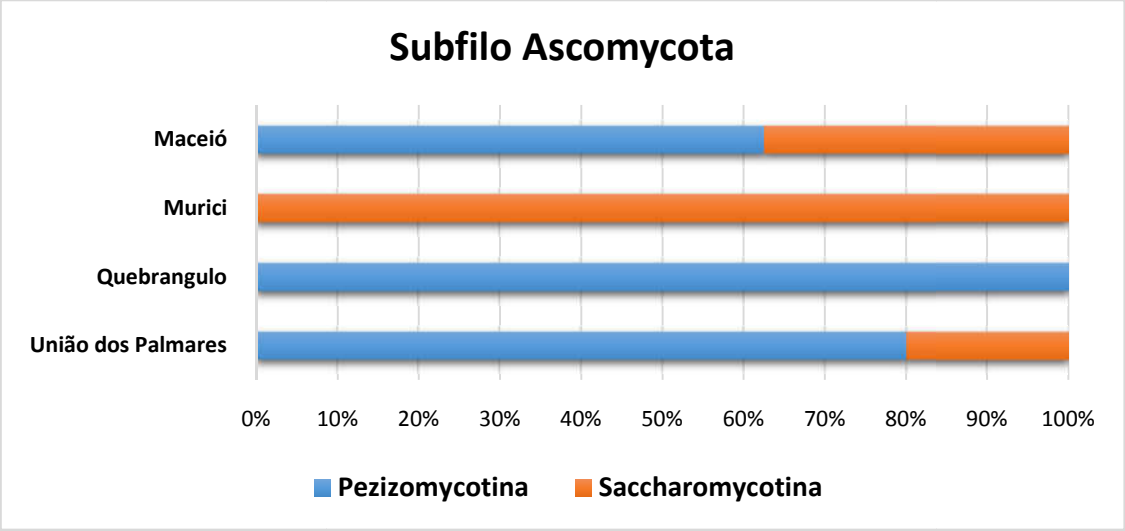
Rhodosporidiobolus poonsookiae	1				1
Rhodotorula sp. nov. 1				1	1
Rhodotorula sp. nov. 2			1		1
Rhodotorula taiwanensis			2		2
Rhynchogastrema complexa			1		1
Saitozyma podzolica	3			2	5
Saitozyma sp. nov. 1	2		1	1	4
Saitozyma sp. nov. 2	2				2
Sporobolomyces sp. nov. 1			1		1
Symmetrospora marina			5		5
Symmetrospora marina/vermiculatus				3	3
Symmetrospora sp. nov. 1	1		2		3
Symmetrospora sp. nov. 2			1		1
Symmetrospora symmetricus				1	1
Sympodiomycopsis paphiopedili			1		1

Sympodiomycopsis sp. nov.	1				1
Tremella sp. nov. 1		1			1
Tremella sp. nov. 2			1	2	3
Tremella sp. nov. 3		1			1
Tremella sp. nov. 4				1	1
Tremella sp. nov. 5	1				1
*Trimorphomyces*sp. nov. 1				2	2
Vishniacozyma sp. nov. 2		1			1
Vishniacozyma sp. nov. 1	2	1	2	2	7
Vishniacozyma taibaiensis	1		1		2
Vonarxula javanica	1				1
Vonarxula sp. nov.	1				1
Yunzhangia sp. nov.			1		1
Total geral	**68**	**30**	**50**	**74**	**222**

Os subfilos de leveduras representados no estudo foram:Pezizomycotina e Saccharomycotina que pertencem ao filo Ascomycota eAgaricomycotina, Pucciniomycotina eUstilaginomycotina pertencentes aBasidiomycota. As leveduras isoladas do filoplano não apresentaram relação espécie-específicacom as bromélias e/ou os habitats que estas ocorreram.

O filo Ascomycota esteve representado por 32 isolados, distribuídos em 13 espécies.Os subfilos apresentados foram Pezizomycotina e Saccharomycotina com sete e seis espécies de leveduras respectivamente. A distribuição dos subfilos nos locais amostrados é apresentadano gráfico3.Para os isolados obtidos em Murici houve uma maior frequência de isolamento associada ao subfilo Saccharomycotina nas espécies *Candida sinolaborantium, Candida intermedia, Candida parapsilosis, Meyerozyma guilliermondii*e*Candida jaroonii*.Muitas destas espécies têm sido isoladas de plantas, como exemplo*C. jaroonii* do clado Yamadazyma, isolada do filoplano e frutas, insetos (LIMTONG et al. 2012) e grãos de cacau (GRONDIN et al. 2015). Destacando aogênero *Candida*como um dos mais representativos associadocom diferentes clados (*Lodderomyces, Yamadazyma, Clavispora*), somando sete isolados dos 14 obtidos do subfilo Saccharomycotina.

Gráfico 3.Grupos taxonômicos presentes nos quatro locais amostrados. A porcentagem indica frequênciasde leveduras relacionadas a cada subfilo de Ascomycota.



Alem disso, foi obtido o gênero *Aureobasidium*considerado de ampla distribuição e cosmopolitas (INÁCIO et al. 2002, FORT et al. 2016; SOLIS et al. 2015; VACHER et al. 2016), este gênero foi o unico representante de Pezizomycotina e o mais representativo de Ascomycota neste substrato.Foramobtidas três espécies (*Aureobasidium pullulans, Aureobasidium thailandense, Aureobasidium* sp. nov. 1) com um total de 13 isolados. Este fato pode ser explicado, já que este gênero apresentama capacidade de produzir substâncias biossurfactantes facilitando assimo grau de umectação na superfície da folha, aumentando ainda mais a lixiviação de substâncias orgânicas depositadas ou fornecidas pela planta (LIMNTONG E NASANIT, 2017; MENESES et al. 2017).

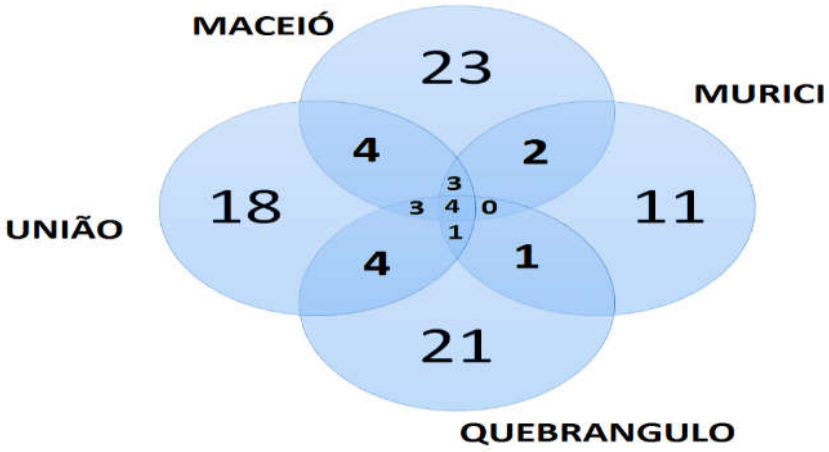
Em contraste com os resultados apresentados neste estudo, Landell e colaboradores (2006), que também isolaram leveduras do filoplano de bromélias, reportaram os gêneros *Candida e Debaryomyces*como os mais predominantes de Ascomycota, correspondendo a 75% dos isolados neste filo.Estes isolados foram relacionados a um número variado de espécies de bromélias, o que direciona a importância do substrato (bromélias) emestudos relacionado com leveduras.Como

também este gênero foi isolados no trabalho deCamatti-sartori e colaboradores (2005), com a variante que estiveram como gêneros prevalentes associados a antosfera da maçã (*Malus domestica*).

Um total de 190 isolados de basidiomicetos foi obtidos nos quatro locais amostrados, somando 83 espécies. Destas, 43 associadas ao subfilo Agaricomycotinacorrespondendo a 117 isolados, constituindo o mais representativo subfilo de Basidiomycota.As espécies commaior frequênciase distribuição foram *Papiliotrema leoncinii, Carlosrosaea hohenbergiae, Carlosrosaea* sp. nov. 3,*P.flavescens, Vishniacozyma* sp. nov. 1, *Piskurozymataiwanensis*, onde as quatroúltimas foram às únicas leveduras compartilhadas nos quatro locais para o filoplano.

As espécies*P. flavescense**P. leoncinii* foram as mais frequêntemente isoladas neste estudo, gênero pertenecente à família Rhynchogastremataceae da ordem Tremellales.A espécie*P. leoncinii*foi descrita recentemente e associada também aofiloplano de bromélias (PAGANIet al, 2016a). Ográfico quatrosinaliza as relações gerais na composição de leveduras entre locais.

Gráfico 4.Relação da composição das espécies de leveduras para os locais amostrados na porção setentrional do Bioma da Mata Atlântica.



Diversos gêneros associadosa Tremellomycetes foram os mais representativos.Se destaca o gênero *Carlosrosaea*com 30 isolados,este gênero surge da raclasificação do *Bullera* gênero altamente polifilético (LIU et al. 2015).A espécie *Carlosrosaea vrieseae* (*Bulleravrieseae)*emais recentemente duas espécies de leveduras associadas a este gênero,foram descritas como produto de esta dissertação*C. aechmeae* e *hohenbergiae*(FELIXet al. 2017). Destacando ainda mais que o gênero tem sido reportado na literatura unicamente associado a filosfera de bromélias.

Outro gênero com alta representatividade reportados neste trabalho foi *Hannaella* com 13 isolados distribuídos em nove espécies, das quais quatro são possíveis espécies novas.O gênero *Hannaella*é bem estabelecido baseando sua classificação além de caracteres moleculares, em relevantes caracteres morfológicos, o que estabelece sua posição filogenética dentro da ordem.*Hannaella*pertencem à família Bulleribasidiaceae recentemente criada com o objetivo de agrupar linhagens monofiléticos, a maioria de seus representantes incluindo *Hannaella,* só se conhece o estado anamórfico (Liu et al. 2015).

Finalmente, está o gênero *Tremella*(Tremellales)representado por sete isolados em cinco espécies novas, obtidos em todos os quatro locais amostrados.Este gênero apresenta atributos como corpos de frutificações úteis no momento de reclassificar as espécies associadas, distribuidas assim em três clados filogenéticos; o clado *Tremella sensustrito* apresenta para sua classificação o uso de caracteres tanto morfológicos como ecológicos, além dos genéticos.Dentro do clado são várias as características morfológicas usadas na classificaçãocomo a presença de basidiomao que os associa com grupos de fungos Russulales (Peniophora) no sub clado mesenterica e com Xylariaceae (Hypoxilon ou Xylaria) do clado fusiformes, entre outras características, o gênero conta com 90 espécies.

Além na ordem Tremellales se destaca o gênero*Vishniacozyma*recentemente proposto na reclassificação da ordem. Surge a partir de diferentes espécies do gênero *Cryptococcus* clado *C. victoriae* e uma espécie de *Trimorphomyces*e o clado *dimennae*relacionando às linhagens associadasa*Trimorphomyces, Cryptococcus*e

uma espécie de *Bullera,* estos dois subclados foram fortememente soportados nas analises filogenéticas. No entanto a combinação destes em um único gênero é devido à consideração de que eles são fenotípicamente indistinguíveis (Liu et al. 2015).

Outro subfilo representado neste trabalho foiPucciniomycotina.Este foi representado por 24 espécies e 40 isolados, onde os gêneros mais prevalentes por suas frequênciase número de espécies foram *Colacogloea*com oitoisolados distribuídos em quatro espécies.Este gêneroapresentou recentemente uma reclassificação e surgido da fusão de outros gêneros como *Rhodotorula*(e.x.*R. diffluens-Colacogloeadiffluens) e Sporobolomyces*.Onde as relações filogenéticas não foram suportadas fielmente por genes relacionados ao rDNA, por enquanto, genes codificadores de proteínas esclareceram as relações filogenéticas (WANG et al. 2015).

O gênero prevalente de Pucciniomycotina foi *Symmetrospora*, com 13 isolados agrupados em cincoespécies.Este gênero também foi proposto pela união de espécies associadas aos gêneros *Rhodotorula*e*Sporobolomyces*(WANG et al.2015), sendo estes gêneros já reportados na literatura como alguns dos mais representativos na filosfera (LANDELL et al. 2009, 2014; VERHOLT, 2012; SURUSSAWADEE et al. 2014; MACHADO et al. 2016).Neste estudo destaca-se a espécie *Symmetrosporamarina* com oito isolados.

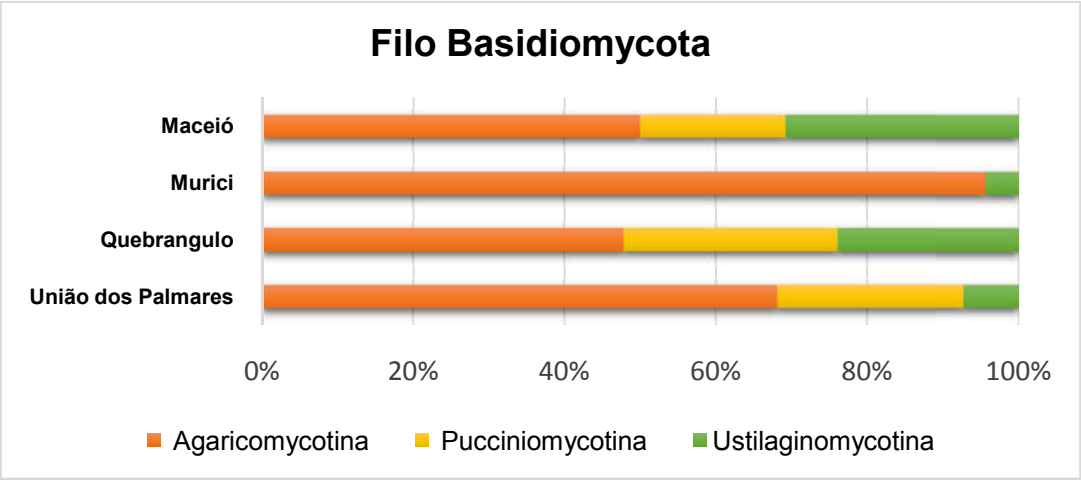
Espécies associadas aPucciniomycotina como:*Rhodosporidiobolus poonsookiae,Rhodotorula taiwanensis,Symmetrospora symmetricus, Sporobolomyces* sp. nov. 1, apresentam pigmentos carotenoides que favorecemo estabelecimento destas leveduras no filoplano,já que este mecanismo ajuda na proteção contra a radiação UV. Leveduras deste grupo sãoem alguns casos, consideradas indicadores da contaminação do ar nos ambientes (VALARINI et al. 2007) e algumas espécies são capazes de formar balistoconídias que são mecanismos especializados para a dispersão (LIMNTON e NASANIT, 2017), característica que apresentam integrantes de outros grupos filogenéticos como *Kockovaella* do subfilo Agaricomycotina (NASANIT et al. 2015).

Finalmente o subfilo Ustilaginomycotina apresentou uma destacada representatividade com 15 espécies distribuídas em 33 isolados, onde a espécie mais freuênte foi *Pseudozyma hubeiensis*, obtida de três dos quatro locais, além de apresentar 39% dos isolados do subfilo, foi umas das leveduras isoladas de um maior número de espécies de bromélias (n=10).*P. hubeiensis* é uma espécie também considerada cosmopolita inicialmente isolada na China a partir de diferentes tipos de folhas de plantas (WANG et al. 2006) e com um alto potencial biotecnológico, principalmente na produção e imobilização de lipases (Bussamara et al. 2012).

A taxonomia dos ustilaginomicetos ainda é controversa.Alguns dos gêneros isolados neste trabalho apresentaram células leveduriformes nas observações microscópicas e além do já conhecido estado anamórfico de *yeast-like*. As análises por homologia usando o programa *Blast* geraram associações a estados teleomórficos de fungos filamentosos.Alguns destes gêneros foram *Meira* e *Jaminaea*(considerado uma linhagem basal de Mycrostomales),todos eles apresentado um elevado número de substituições nas análises utilizando sequências da regiãoD1\D2 para a espécies mais próximas.

O gênero *Meira* tem sido de interesse recentemente já que apresenta como muitos fungos deste subfilo, estados teleomórficos e anamórficos.Está representado na atualidade por trêsespécies inicialmente obtidas a partir do filoplano de plantas, entre elas de magnólia em Louisiana, EUA, também encontrado como endófito de plantas (RUSH et al. 2013). Destaca-se também gêneros como *Kordyana, Sympodiomycopsis*e*Moesziomyces,* este último amplamente associados com a família Poaceae,damesma ordem das bromélias (NASANIT et al. 2016). Demaneira geral as relações dos subfilos de Basidiomycota entre os pontos de amostragem são observadas no gráfico 5.

Grafico 5. **Grupos taxonômicos presentes nos quatro locais amostrados. A porcentagem indica a frequênciasde leveduras relacionadas a cada subfilo de Basidiomycota**.



Os pontos de amostragem apresentaram uma composição altamenteheterogênea de leveduras, como também de nichos (espécies de bromélias).Àsmicrobiotas apresentadas mostram o alto potencial que têm estes substratos na comprenção da diversidade de leveduras nestos ecossistemas.O filoplano de bromélias é um habitat que favorece o estabelecimento das leveduras,ainda apresentando fatores que o tornam um ambiente extremo: abióticos (radiação solar, chuva), como bióticos (competência secreção de sustâncias inhibitorias) que cumprem o papel de filtragem no estabelecimento das leveduras.

No entanto às leveduras também apresentam características de tolerância a condições ambientais extremas, acapacidade formar estruturas clamidósporas (estruturas resistentes à dessecção) (LANDELL et al. 2006), produção de pigmentos, bem como uma maior versatilidade no uso de diferentes fontes de carbono e outras substâncias disponíveisque às auxiliam na colonização destes habitats (VALARINI et al. 2007; LIMNTON e NASANIT, 2017).Os resultados obtidos neste estudo ratificam o reportado na literatura em relação alta frecuencia de ocurrência de leveduras basidiomicéticas no filoplano (INÁCIO et al. 2012, LANDELL et al. 2006; LIMNGTON e NASANIT, 2017).

Porém, resultados diferentes foram apresentados por Limtong e colaboradores (2014) num trabalho feito com o filoplano de cana de açúcar.Onde hove uma maior prevalência deleveduras ascomicéticas no filoplano, o 66% dos isolados distribuídas

em 24 espécies, onde o gênero mais representativo foi *Candida* com 10 espécies; a porcentagem restante correspondeu a seis gêneros representados em12 espécies de leveduras basidiomicética, a espécie com maior frequênciafoi *Rhodosporidium taiwanensis.*Este resultado contrastante esteve associado ao método utilizado que enriqueceuo meio de cultura com açúcares simples, o que possibilitou o crecimento de leveduras ascomicéticas as quais têm uma preferência por estes substratos.

No entanto,este resultado de prevalência de leveduras ascomiceticas também pode serexplicadolevando em consideração que a associaçãode leveduras e fungos em geral depende dos estados particulares nosprocessos fisiológicos das plantas, além de fatores abióticos como mudanças microclimáticas ou sazonalidade(CROSS etal. 2016).Não obstante estes fatores não apresentaram variação significativa neste estudo, o que não permite atribuir a heterogeneidade e distribuição das leveduras a estes fatores noslocaisde estudo.

5.2.2 Espécies Novas na Mata Atlântica Setentrional

Das espécies reportadas para o filoplano 50 são possíveis espécies novas (Tabela 4). Todos os subfilos apresentados neste trabalho tiveram possíveis espécies novas associadas; os mais representativos foram Agaricomycotina de Basidiomycota com 24 espécies novas, Pucciniomycotina com 14, Ustilaginomycotina com oito, e finalmente os subfilos associados a Ascomycota, onde Pezizomycotina apresentou três espécies e Saccharomycotina uma espécie. O que evidencia a alta riquza de taxas de leveduras e mais ainda de possíveis espécies novas associadas a bromélias na Mata Atlantica Setentrional.

Os gêneros com maior número de possíveis espécies novas foram *Carlosrosaea* (seis)*, Tremella* (cinco)*, Hannaella* (quatro)*, Kordyana* (três).O gênero*Carlosrosaea,*apresentou além das espécies já descritas (três) seis possíveis

espécies novas, com uma ampla distribuídas tendo representantes nos quatro locais amostrados, além duma alta frequência de isolamento neste substrato.

Tabela 4.Distribuição taxonômica das espécies novas de leveduras e suas respectivas frequências de iolamento no filoplano de bromélias, obtidas nos quatro locais amostrados na Mata Atlântica Setentrional.

	Maceió	Murici	Quebrangulo	União dos Palmares
ASCOMYCOTA				
Pezizomycotina				
Aureobasidium sp. nov. 1			1	
Exophiala sp. nov.1	1			
Phaeothecoidea sp. nov.1	2			
Saccharomycotina				
Metschnikowia sp. nov. 2	1			
BASIDIOMYCOTA				
Agaricomycotina				
Bulleribasidium sp. nov. 1				1
Carcinomyces sp. nov. 1			1	
Carlosrosaea sp. nov. 3	3	4	1	3

Continuação Tabela 4.Distribuição taxonômica das espécies novas de leveduras e suas respectivas frequências de iolamento no filoplano de bromélias, obtidas nos quatro locais amostrados na Mata Atlântica Setentrional.

Carlosrosaea sp. nov. 4				1
Carlosrosaea sp. nov. 5				1
Carlosrosaea sp. nov. 7		1		
Carlosrosaea sp. nov. 8	1			1
Carlosrosaea sp. nov. 9	1			
Hannaella sp. nov. 1			1	1
Hannaella sp. nov. 2		1		
Hannaella sp. nov. 3		1		
Hannaella sp. nov. 4	1			
Heterocephalacria sp. nov. 1	1			1
Papiliotrema sp. nov. 1	1			1
Saitozyma sp. nov. 1	2		1	1
Saitozyma sp. nov. 2	2			
Tremella sp. nov. 1		1		

Tremella sp. nov. 2			1	2
Tremella sp. nov. 3		1		
Tremella sp. nov. 4				1
Tremella sp. nov. 5	1			
*Trimorphomyces*sp. nov. 1				2
Vishniacozyma sp. nov. 1	2	1	2	2
Vishniacozyma sp. nov. 2		1		
Pucciniomycotina				
Colacogloea sp. nov. 1	1			
Colacogloea sp. nov. 2				1
Cyrenella sp. nov. 1	2			
Cystobasidium sp. nov.1	1			1
Meredithblackwellia sp. nov.1				2
Oberwinklerozyma sp. nov. 1	1			
Occultifur sp. nov. 1				1
Rhodotorula sp. nov. 1				1
Rhodotorula sp. nov. 2			1	
Sporobolomyces sp. nov. 1			1	
Symmetrospora sp. nov. 1	1		2	
Symmetrospora sp. nov. 2			1	
Vonarxula sp. nov.1	1			
Yunzhangia sp. nov.1			1	

Continuação Tabela 4.**Distribuição taxonômica das espécies novas de leveduras e suas respectivas frequências de iolamento no filoplano de bromélias, obtidas nos quatro locais amostrados na Mata Atlântica Setentrional**.

Ustilaginomycotina				
Anomalomyces sp. nov.1			1	
Kordyana sp. nov. 1			1	
Kordyana sp. nov. 2	1			
Kordyana sp. nov. 3		1		
Meira sp. nov. 2			1	
Moesziomyces sp. nov. 1	1			
Moesziomyces sp. nov. 2	1			
Sympodiomycopsis sp. nov. 1	1			

Ogenêro*Tremella*teveassociado cincopossíveis espécies novas obtidos nos quatro locais amostrados. As diferencias basearam-se com a espécie tipo *Tremella*

globispora todas elas com nove ou dez substituições para nas regiões D1\D2 e variações para ITS que as determinou como possíveis espécies novas. Finalmente o gênero *Hannaella* com varias possíveis espécies novas associadas com representantes nos diferentes locais *(Hannaella* sp. nov. 1*, Hannaella* sp. nov. 2, *Hannaella* sp. nov. 3*, Hannaella* sp. nov. 4).

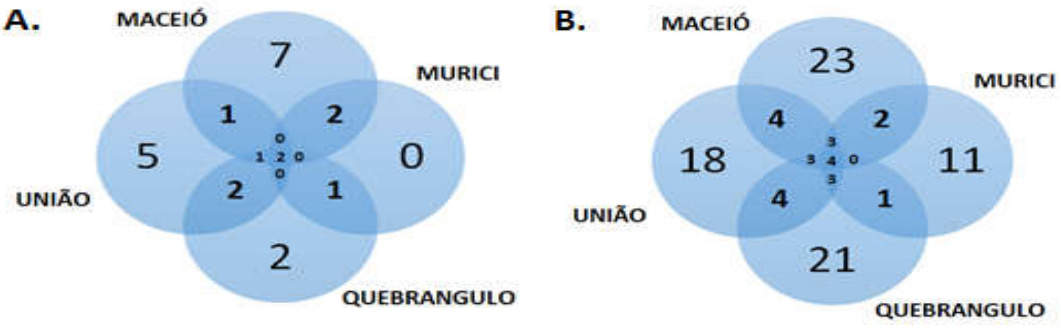
O conhecimento da diversidade de leveduras tem sido incrementada consideravelmente nos últimos 50 anos (JUMPPONEN; JONES, 2010; YURKOV; KEMLER; BEGEROW, 2011). Diferentes trabalhos relacionam esta diversidade a o substratos deisolamentoe às regiões ecológicas.Em Taiwan nos últimos anos tem-se descrito mais de 70 espécies novas (GROENEWALD, ROBERT; SMITH, 2011). Na Rússia mais 130 leveduras têm sido reportadas exclusivamente para o solo (YURKOV et al. 2015). No Brasil recentemente têm sido descritas diversas espécies novas de leveduras associadas a diferentes substratos, se destaca *Carlosrosaea hohenbergia* e *Carlosrosaea aechmeae,*associadas a bromélias na Mata Atlantica Setentrional, como produto desta dissertação po FELIX e colaboradores (2017), fato que evidencia a importância deste tipo de trabalhos taxonômicos, que contribuem com o conhecimento da riqueza de espécies de leveduras, ainda pouco explorada nestes habitats.

Levando isto em consideração e contrastando com a riqueza de espécies de leveduras reportadas na literatura, que superou 1500 espécies segundo Kurtzman e colaboradores (2011), e anos depois (VU et al. 2016) reportou 1700.As possíveis espécies novas associadas a este trabalho é superior a 3% do total de espécies descritas na atualidade e o mesmo porcentagem para às espécies descritas, contribuindo substancialmente ao conhecimento da diversidade de leveduras em ambientes naturais. Por outro lado, a descrição de leveduras têm um rol importante na indústria e na biotecnologia, já que muitas destas possíveis espécies novas podem apresentar potencialidades que permitam o desenvolvimento de múltiplos produtos e serviços.

5.3 Relação entre a composição de bromélias e composição de leveduras nos locais amostrados

Não foi estabelecida uma relação espécie-especifica entre as leveduras e bromélias para nenhum dos quatro locais amostrados.No entanto, pode-se observar que os locais que apresentaram maior número de espécies de plantas hospedeiras, apresentaram uma heterogeneidade maior na composição das espécies de leveduras.Os locais de amostragem de União dos Palmares e Maceió apresentaram o maior número de leveduras junto com o maior número espécies de bromélias (Gráfico 6).

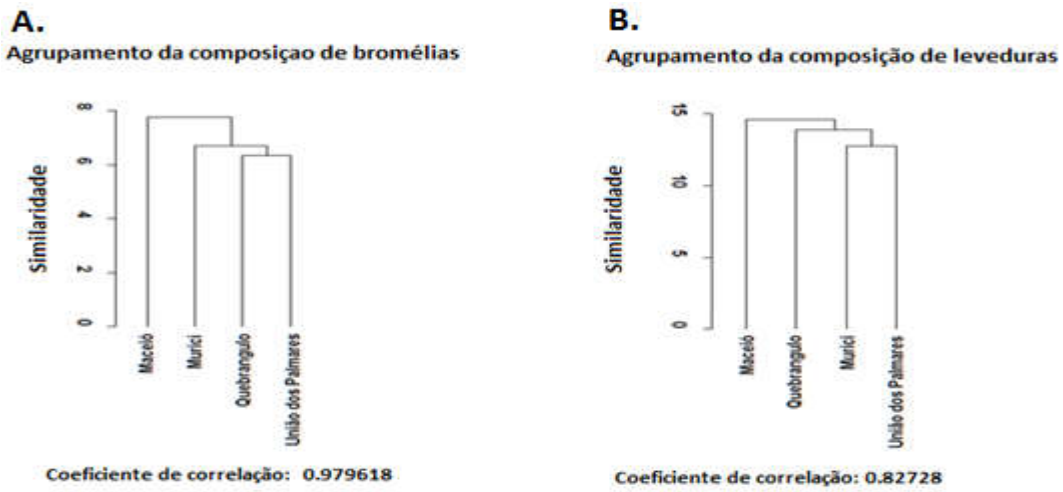
Gráfico 6. Composição e relação de bromélias (A) e leveduras (B), nos locais amostrados.



Os padrões de agrupamento na composição das espéciespara bromélias e leveduras para os quatro locais são apresentados no gráfico 7. De acordo com as

análises de similaridade, a maior semelhança em relação à composição das bromélias foi entre os pontos União dos Palmares e Quebrangulo, enquanto a composição dos outros sítios mostrou uma baixa semelhança entre eles. No entanto para leveduras a melhor relação foi apresentada nos locais de Murici e União dos Palmares.

Gráfico 7.Dendrograma representando a composição de espécies de bromélias (A) e leveduras (B), para os quatro pontos de coleta, na Mata Atlântica Setentrional.



Aproximadamente 68% dos gêneros de bromélias reportados para a Mata Atlântica Setentrional foram encontrados neste estudo (SIQUEIRA et al. 2003; MARTINELLI et al. 2008).Estes resultados reforçam a concepção de que bromélias são um importante nicho no qual a descrição de espécies novas, assim como o papel destesmicro-organismos na ciclagem de nutrientes, na defesa da planta e na contribuição nos processos de polinização (*fitness* das plantas) ainda é pouco explorada (LANDELL et al. 2006; GOMES et al. 2015; FELIX et al. 2017).

Para as leveduras os locais com maior correlação na composição foram Murici e União dos Palmares, já que muitas espécies de leveduras isoladas em União dos Palmares (que apresento maior número de espécies isoladas que Murici), também

fizeram parte da composição de leveduras do Murici. Os outros locais mostraram uma composição mais heterogênea entre eles.

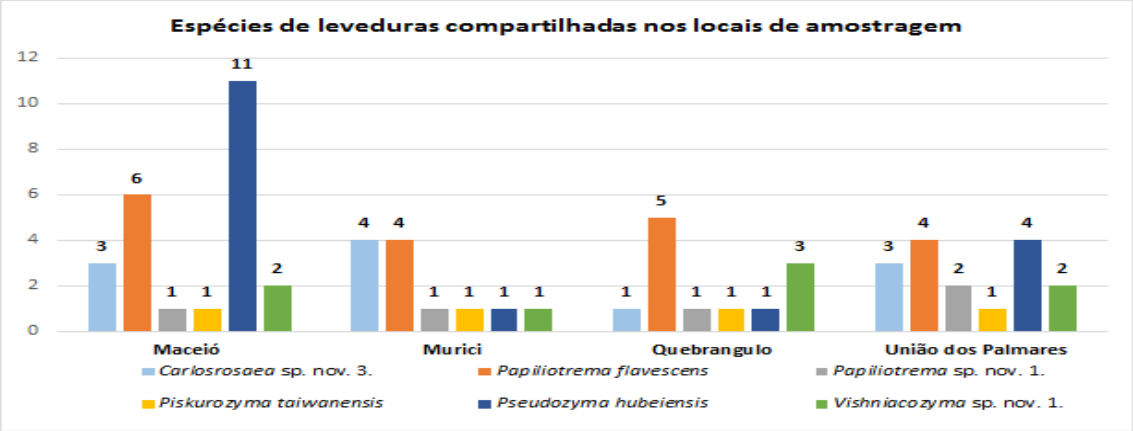
5.4 Diversidade de Leveduras

5.4.1 Diversidade alfa (α)

Riqueza, frequências, Equitabilidade e Índice de Shanonn- Weaver

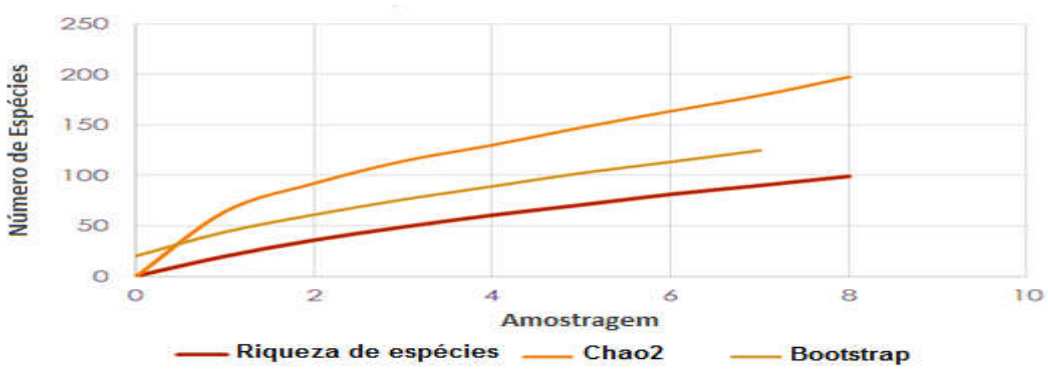
No total, seis espécies foram compartilhadas para os diferentes substratos (filoplano, antosfera ou fitotelma) nos quatro locais.Todas as espécies compartilladas foram de leveduras basidiomicética, representadas nos subfilos: Agaricomycotina distribuídos em quatro famílias:Bulleribasidiaceae- *Vishniacozyma* sp. nov. 1; Piskurozymaceae- *Piskurozyma taiwanensis*; Rhynchogastremataceae - duas espécies do gênero *Papiliotrema* (*P. flavescens e Papiliotrema* sp. nov.1) e Trimorphomycetaceae - *Carlosrosaea* sp. nov. 3 e do subfilo Ustilaginomycotina representado na família Ustilaginaceae - *P. hubeiensis* (Gráfico 8).

Gráfico 8.Espécies de leveduras apresentadas nos quatro locais amostrados com suas respectivas frequências.



As análises estatísticas foram baseadas nos dados relacionados ao filoplano, por serem dados padronizados na metodologia de coleta. A análise da curva de acumulação de espécies basead em rarefação dos dados obtidos, permitiu fazer a comparação dos locais onde os resultados de isolamento foram desiguais; fato relacionado à ampla obtenção de espécies com baixas frequencias de isolamento isoladas do filoplano das bromélias. A curva de acumulação das espécies de leveduras mostrou que para os dados obtidos nos quatro locais, não foi atingida a assíntota ou patamar(Gráfico 9).

Gráfico 9.Curva de acumulação baseada em rarefação e estimadores de riqueza de espécies de leveduras associadas ao filoplano de bromélias da Mata Atlântica Setentrional.



A riqueza total foi estimada em 144 espécies, o que pode indicar que o esforço amostral ou o método de isolamento empregado não foi satisfatório para conhecer a diversidade de leveduras presente nestes substratos. Estes resultados indicam quediversas espéciesde leveduras poderiam ser encontradas com o aumento do esforço amostral.

Da área amostrada distribuída em quatro pontos foi obtidauma riqueza de 96 espécies de leveduras, associadas a 222 isolados no filoplano de bromélias.Tem-se relatado até agora uma alta heterogeneidade na composição de leveduras nos diferentes locais.Assim que para Maceió foi apresentadaumariqueza de S = 42 a qual foi refletida no maior valor do índice de Shanonn H = 3,524 obtido nos quatro pontos de amostragem; nestelocal também foi reportado a maior riqueza de

bromélias, fatores que podem estar influenciados diretamente.Prober e colaboradores (2015) reportaram uma forte relação entre a riquza de plantas (hospedeiro) e micro-organismo, incluindo fungos fato que mantem a relação com os dados aprsentados neste estudo.

Os locais de União dos Palmares e Quebrangulo apresentaram um número próximo na riqueza de levedura: 39 e 34, respectivamente, e uma composição semelhante no número de espécies de bromélias. Dados contrastantes foram obtidos no local de Murici, com 13% das espécies relatadas para o filoplano neste estudo, com predominância de Agaricomycotina (n = 14 espécies) em associação a oito gêneros, sendo os mais representativos *Papiliotrema* e *Carlosrosaea*. Do subfilo Saccharomycotina (n = 5) espécies associadas em sua maioria ao gênero *Candida*.Os índices de diversidade calculados podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5.Valores de índices de diversidade, baseados na estrutura das comunidades.

	Maceió	**Murici**	**Quebrangulo**	**União dos Palmares**
Riqueza de Espécies -S	42	20	34	39
Número de individuos	68	30	50	74
Dominância_D	0,03893	0,08444	0,0416	0,04127
Simpson_1-D	0,9611	0,9156	0,9584	0,9587
Shannon-Weaver_H	3,524	2,766	3,37	3,426
Equitabilidade_J	0,9427	0,9232	0,9556	0,935

Dominância

Na análise de diversidade para as áreasamostradas, se considerou o índice de Dominância.Murici apresentou o valor mais alto(0,08444), por outro ladoapresentou também o menor valor de equabilidade (0,9232). Esta relação foi dada, pelo fatoalém de ter um número baixo de linhagens obtidos (n=30), representados em20 espécies. Em comparação aos outros locais, a distribuição das espécies neste ponto de amostragem,esteve marcada por uma maior frequência de isolamento apresentada por três espécies, *P. leoncinii* (n=6), *Carlosrosaea* sp. nov. 3 (n=4) e Yamadazyma*C. jaroonii* (n=3), constituindo aproximadamente 50% das linhagens reportadas.

A dominância deste local se refleteno nível taxonômico, onde não teve arepresentação dos subfilo Pezizomycotina doAscomycota e Pucciniomycotina de Basidiomycota. Além disso, o maior número de linhagens (n=21 ou 66%), esteve restrita à ordem (Tremellales) do filo Basidiomycota. Apesar de ter sido o local com maior valor de dominância nas análises, apresentou noveespécies associadas a táxons novos, quase 50% das espécies do local. Os outros locais apresentaram valores de dominância menores que 0,05.

Equitabilidade

A riqueza de espécies, assim como o índice de Shannon-Weaver(que será abordado mais adiante) são levados em consideração para determinar os valores de equitabilidade na amostragem.O local que apresentou um maior valor para esteíndice foi Quebrangulo (0,957) mas não apresentou a maior riqueza. No entanto as espécies presentes neste local tiveram uma distribuição mais homogênea, onde as espécies *S.marina e P.flavescens*apresentaram as maiores frequências, cinco e quatro linhagens respectivamente.As 32 espécies restantes, tiveram de um a três isolados.

Nove ordens foram representadas no local de Quebrangulo; a ordem Dothideales,a única associada ao filo Ascomycota comquatro isolados, associados todos ao gênero *Aureobasidium*.

Os valores de equabilidade nos locais de Maceió e União dos Palmares apresentam valores próximos entre eles (0,9427 e 0,935) respectivamente.Destaca-se que estes dois locais foram os que mais compartilharam espécies com outros pontos de amostragem. Quebrangulocompartilhou 13 espécies com Maceió, 15 com União dos Palmares e sete com Murici. Destaca-se que os valores de equabilidade apresentados nos quatro locais, refletemnuma baixa predominância nas espécies apresentadas, sendo isto gerado por uma distribuição altamente heterogênea.

Índice de Shanonn- Weaver e índice de Simpson (1 - D)

O local que teve melhor relação entre o índice calculado foi Maceió, que apresentou um índice H'=3,524, uma equabilidade de 0,9427 e uma dominância de 0,03893, a mais baixa entre os locais. A maior diversidade obtida em Maceió está representada peladiversidade filogenética das leveduras, onde os cinco subfilos relacionados neste trabalho foram apresentados no filoplano.Para o filo Ascomycota se apresentaram oito espécies em sete gêneros, nossubfilos: Pezizomycotina e Saccharomycotina, o que correspondeu a 33% da riqueza no local e o restante (67%)correspondeu ao filo Basidiomycota com 34 espécies associadas a 21 gêneros nos subfilos Agaricomycotina, Pucciniomycotina eUstilaginomycotina. Além disso, os isolados obtidos estiveramassociados a umnúmero maior de espécies de bromélias por local (n=17).

As proporções dos diferentes gêneros presentes em cada um dos locais encontram-se representadas nos gráficos10 e 11, onde para Quebrangulo se mostra a prevalência do gênero *Aureobasidium*,que também teve uma destacada representatividade em Maceió e em União dos Palmares;levando em consideração qie é um gênero cosmopolita,e amplamente associada a estudos com material vegetal, além de seruma levedura halotolerante associada a diferentes ambientes.

Do mesmo modo,encontrou-se representatividade da levedura *Hortaea werneckii*, da qual seu particular nicho são ambientes com altas concentrações de sal (halófilo) e considerado patógeno em humanos,causando *Tinea nigra* (STERFLINGER, 2006), indicando as posibles condições ambientais e ecologicas que apresentarm estes locais e que podem ser também um filtro no estabelecimento de outras leveduras que não conseguem tolerar estas condicçoes.

O gênero *Candida*foi representado em diferentes clados no local de Murici.Estas leveduras estãoassociadas com diferentes ambientes e fazem parte das leveduras mais cosmopolitas, estas espécies estão associadas à produção de estruturas que permitem o estabelecimento na superfície das folhas,além de uma produção variada de enzimas que permitem a degradação de diferentes compostos presentes nesses substratos (FERNANDEZ et al. 2012; MAŠÍNOVÁet al. 2015;

TEIXEIRA et al. 2017), também alguma espécies de este genêroparticiparem processos fermentativos (LIMTONG; NASANIT, 2017).

Gráfico 10.Proporção dos gêneros do filo Ascomycota em cada local de amostragem na Mata Atlântica Setentrional.

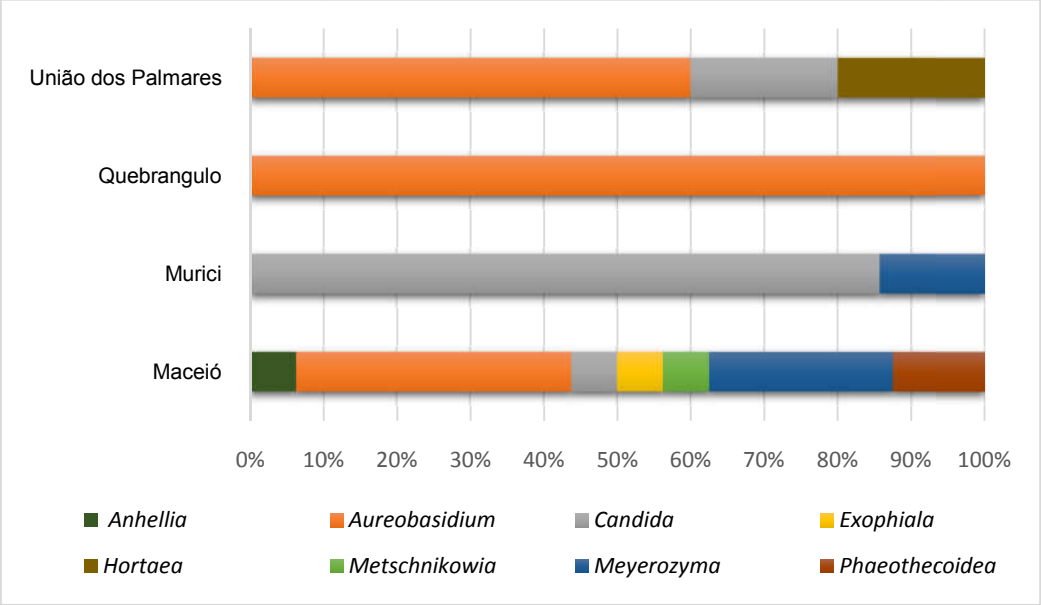
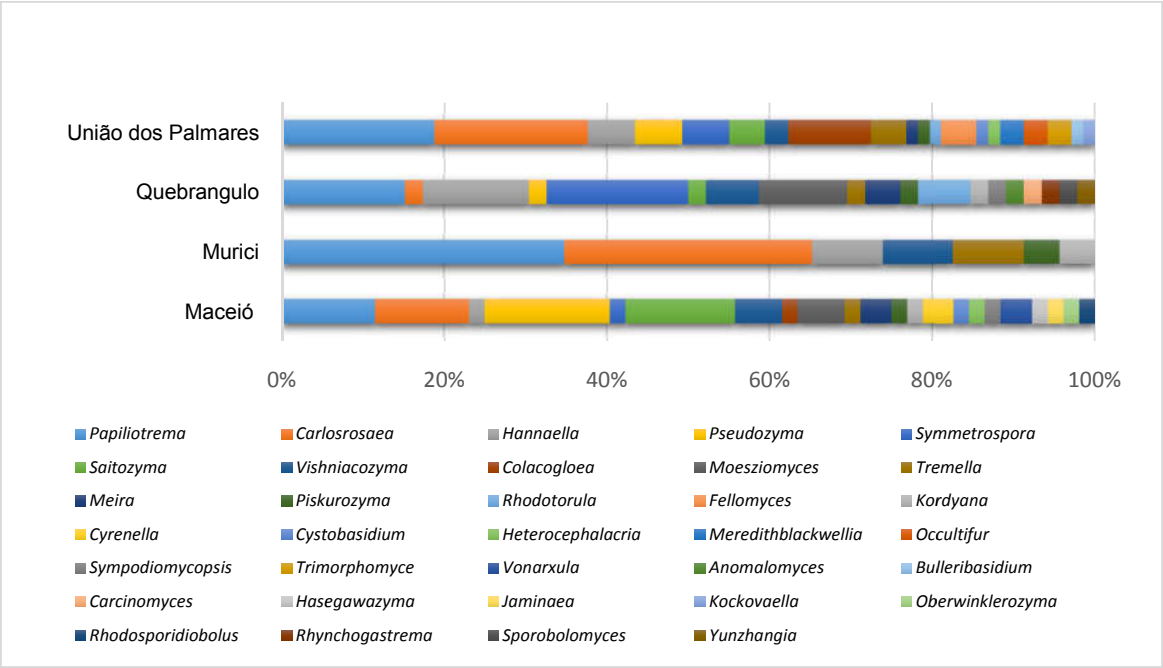


Gráfico 11.Proporção dos gêneros do filo Basidiomycota em cada local de amostragem na Mata Atlântica Setentrional.



5.4.2 Diversidade beta (β)

Para avaliar a variação na composição de espécies entre os locais, se obtive a matriz de valores de diversidade beta pelo índice de Whittaker que mede a mudança ou taxa de substituição na composição de espécies de um local para outro.Os valores obtidos entre os locais Maceió/União dos palmares 0.6545 foi o mais baixo indicando que a composição de espécies nestos locais apresenta menos dissimilaridade, entre tanto o valor obtido paraMurici/Quebrangulo foi de 0,8148, establecendo que estos locais apresentaram o maior valor de dissimilaridade entre a composição de suas comunidades de leveduras(Tabela 6).

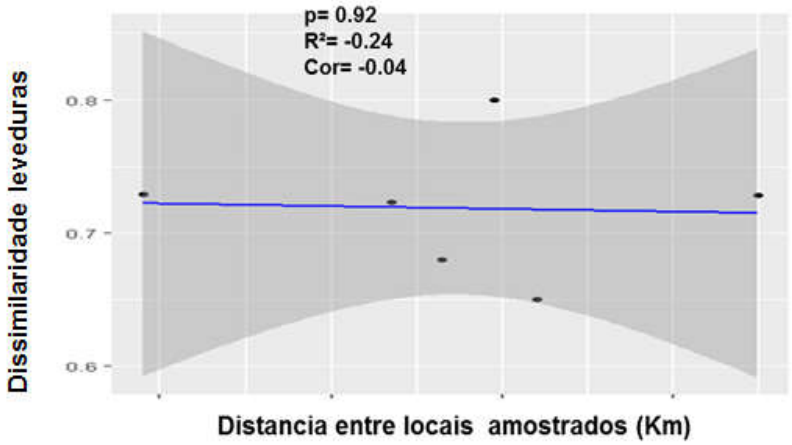
Tabela 6.Matriz de diversidade beta obtida pelo índice de Whittaker.

	Maceió	Murici	Quebrangulo	União dos Palmares
Maceió	0	0,74194	0,71053	0,65423
Murici		0	0,81481	0,76271
Quebrangulo			0	0,67123
União dos Palmares				0

Isto pode ser considerado como uma diferença importante entre os pontos amostradosonde os valores apresentados entre os locais foram maiores ao 65% de dissimilaridade. Por consequência se evidencia a alta heterogeneidade, refletido também nobaixo número de espécies comuns entre locais.Variáveis como a temperatura e umidade relativa não apresentaram diferencias significativas entre os pontos,por encuanto não foi atribuível a estas os altos valores de dissimilaridade e as diferencias na composição taxonômica entre os locais de amostragem.

O resultado da avaliação da diversidade betaem relação àdistância geográfica,mostraram que não houve relação significativa entre a distância geográfica e a diversidade beta, onde não manteve a premissa de quanto maior a distancia entre os pontos, maior é a dissimilaridade na composição de espécies;o que pode ser observadono gráfico 12. Este resultado difere do reportado na literatura para micro-organismos, onde locais mais distantes geograficamente apresentam uma maior heterogeneidade em sua composição (MARTINY, et al. 2006; GREEN e BOHANNAN, 2006);sugerindo que outras variáveis estão influenciando a composição entre os locais.

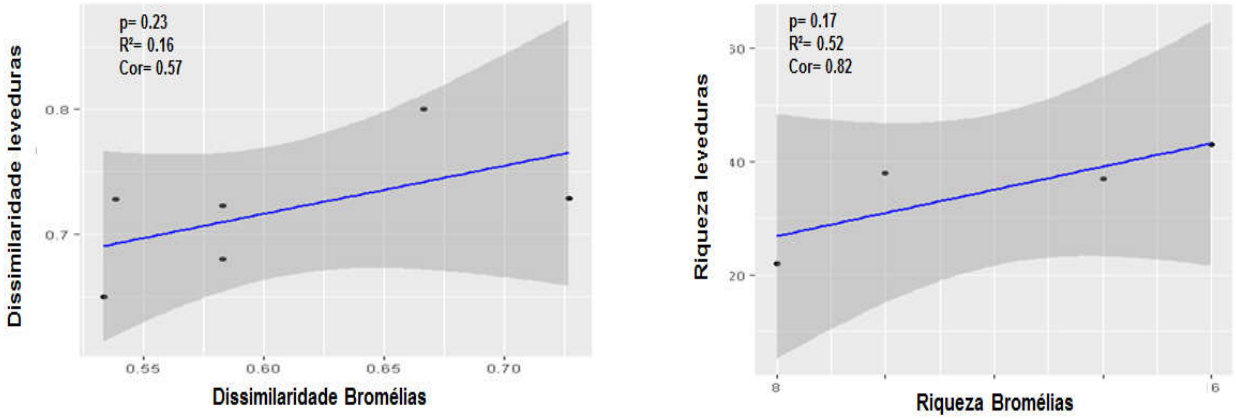
Gráfico 12.Análise de regressão linear mostrando a dispersão entre a diversidade beta e a distância geográfica dos pontos de amostragem p= valor alfa; Cor= valor da correlação de Pearson; R^2= Coeficiente de determinação.



Por outro lado, não foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre a dissimilaridade das espécies de leveduras e de bromeliasentre locais(gráfico 13A).Como tampouco uma relação significativa entre a riqueza de leveduras e bromélias (gráfico 13B). Entretanto, podemos identificar que o padrão geral entre a diversidade beta e a riqueza de bromélias e leveduras (gráfico 13A e B,respectivamente) e embora nãosejam estatisticamente significativos, apresentam uma tendência positiva entre variáveis e valores de correlação razoáveis. Desta forma é possível se observar um incremento na riqueza de leveduras, uma vez que há um incremento na riqueza das bromélias.

Gráfico 13.Análise de regressão linear mostrando: (A)relação entre a diversidade beta de levedura e bromélias; (B) Relação entre riqueza de leveduras e nos pontos de amostragem p= valor alfa; Cor= valor da correlação de Pearson; R^2= Coeficiente de determinação.

B.



A premissa de que há um aumento da diversidade de fungos fitopatogênicos ao aumentar a diversidade de plantas foi abordada por Tedersoo et al. (2014), onde quanto maior a riqueza e diversidade das plantas, maior a diversidade de fungos fitopatógenos. Essa relação que provavelmente deve-se à conexão íntima entre esses organismos.Assim, um maior número de espécies de plantas significa um maior número de nichos para este organismo. A comunidade de leveduras epifíticas também tem uma associação íntima com seu hospedeiro, inclusive sendo modulada e sustentada por ele, isto pode ser observado nos resultados obtidos neste estudo e o que possivelmente pode seconsiderar uma explicação a alta heterogeneidade de leveduras encontradas.Outros fatores como a sazonalidade, ontogênese da planta, traços morfológicos, concentração de nutrientes das folhas e até mesmo as diferenças na composição da cutina podem afetar a composição da microbiota das leveduras epífitas em seus hospedeiros (VORHOLTet al. 2012; REISBERGet al. 2013; KEMBEL; MUELLER, 2014; YURKOV, 2017; LIMTONG; NASANIT, 2017).

Em vista disso, é plausível inferir que tanto a riqueza quanto a dissimilaridade das leveduras entre os pontos estão respondendo, em algum nível, à composição e riqueza de espécies de bromélias. Isso corrobora os resultados encontrados por Prober et al. (2015) que estudaram micro-organismos do solo e encontraram uma relação positiva entre a diversidade beta de micro-organismos e de plantas, além disso, estudaram a composição das espécies de gramíneas que pertencem à mesma

ordem das bromélias (Poales). De acordo com os autores, a explicação para este fenômeno seria provavelmente a combinação de fatores ambientais, ecológicos e a estreita relação entre micro-organismos e plantas.

6. CONCLUSÕES

A Mata Atlântica Setentrional apresenta uma grande riqueza de espécies de leveduras, 96 espécies, reportadas neste trabalho e a maior reportada para o filoplano de plantas. Também é reportada um maior numero de espécies de leveduras, leveduras basidiomicéticas reportadas para antosfera das bromélias, esta associada diretamente as estruturas das quais foram isoladas

Se ratifica o estabelecido na literatura, que o filo Basidiomycota é prevalente no filoplano de plantas, com uma alta representatividade nos diferentes níveis taxonômicos (gêneros, famílias até subfilos), constituindo assim ao filoplano de bromélias como um substrato importante para a descoberta de espécies ainda não descritas, foram 50 espécies novas (n= 83) reportadas neste estudo**;**

Existe uma correlação entre a diversidade de leveduras e bromélias, sugerindo que a maior riqueza de bromélias (nicho fundamental) maior é a riqueza de leveduras, evindenciando que às leveduras de filoplano respondem mais fortemente aos aspectos ecológicos, em escala local, a riqueza de levedura foi melhor explicado por variáveis ecológicas (riqueza do hospedeiro). No entanto não foram encontrados indícios de relações espécie específicos entre leveduras e bromélias**.**

.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEKLETT, K.; HART, M.; SHADE, A. The microbial ecology of flowers: an emerging frontier in phyllosphere research. **Botany**, v. 92, p. 253–266, 2014.

ALGHAMDI, M. A. et al. Microorganisms associated particulate matter: A preliminary study. **Science of the Total Environment**, v. 479–480, n. 1, p. 109–116, 2014.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, n. 215, p. 403– 410, 1990.

ANDREOTE, F. D.; GUMIERE, T.; DURRER, A. Exploring interactions of plant microbiomes. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 6, p. 528–539, 2014.

ARAUJO, F. V. et al. *Kazachstania bromeliacearum* sp. nov., a yeast species from water tanks of bromeliads. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1002–1006, 2012.

AVIN, F. A. et al. Molecular classification and phylogenetic relationships of selected edible Basidiomycetes species. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 7, p. 7355–7364, 2012.

BARTON, P. S. et al. The spatial scaling of beta diversity. **Global Ecology and Biogeography**, v. 22, n. 6, p. 639–647, 2013.

BASÍLIO, G. A. et al. Community ecology of epiphytic Bromeliaceae in a remnant of Atlantic Forest in Zona da Mata, Minas Gerais State, Brazil. **Hoehnea**. v. 42, n. 1, p. 21–31, 2015.

BASS D, RICHARDS T.A. Three reasons to re-evaluate fungal diversity ‘on Earth in the ocean’. **Fungal Biology Review** 25:159–164, 2011.

BASTIDAS, R. J.; HEITMAN, J. Trimorphic stepping stones pave the way to fungal virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 2, p. 351–352, 2009.

BERBEE, M. L.; JAMES, T. Y.; STRULLU-DERRIEN, C. Early Diverging Fungi: Diversity and Impact at the Dawn of Terrestrial Life. **Annual Review of Microbiology,** v. 71, n. 1, p. annurev-micro-030117-020324, 2017.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426–438, 2011.

BOEKHOUT, T. et al. Discussion of teleomorphic and anamorphic ascomycetous yeasts and yeast-like taxa. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T (Eds). The Yeasts, a Taxonomic Study. Amsterdam: **Elsevier**. 5ª ed, vol. 1, p. 293–307. 2011.

BRANDÃO, L. R. et al. Diversity and biogeographical patterns of yeast communities in Antarctic, Patagonian and tropical lakes. **Fungal Ecology**, v. 28, p. 33–43, 2017.

BRASIL. DECRETO Nº 6.660, DE 21 DE NOVEMBRO DE 2008. Regulamenta dispositivos da Lei no 11.428, de 22 de dezembro de 2006, que dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica.

BRINGEL, F.; COUÉE, I. Pivotal roles of phyllosphere microorganisms at the interface between plant functioning and atmospheric trace gas dynamics. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAY, p. 1–14, 2015.

BUSSAMARA, R. et al. Optimal conditions for continuous immobilization of pseudozyma hubeiensis (Strain HB85A) lipase by adsorption in a packed-bed reactor by response surface methodology. **Enzyme Research**, v. 12, 2012.

CHEN, J. et al. Identification of Hortaea werneckii Isolated from Mangrove Plant Aegiceras comiculatum Based on Morphology and rDNA Sequences. **Mycopathologia,** v. 174, n. 5–6, p. 457–466, 2012.

COBBAN, A. et al. Revisiting the pink-red pigmented basidiomycete mirror yeast of the phyllosphere. **Microbiology Open**, 2016.

DE SOUSA, M. M.; COLPO, K. D. Diversity and distribution of epiphytic bromeliads in a Brazilian subtropical mangrove. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 89, n. 2, p. 1085–1093, 2017.

ERWIG, L. P.; GOW, N. A. R. Interactions of fungal pathogens with phagocytes**. Nature** Reviews Microbiology, v. 14, n. 3, p. 163–176, 2016.

Felix C.R, Casanova Navarro H.M, Vasconcelos G, Paulino B, Broetto L, Landell M.F. Carlosrosaea hohenbergiae sp. nov. and Carlosrosaea aechmeae sp. nov., two tremellaceous yeasts isolated from bromeliads in north-eastern Brazil. **International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology**,67(6):1752-1757, 2017.

FELL, J. L.; BOEKHOUT, T.; et al. Biodiversity and systematic of basidiomycetous yeast as determined by large submit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 50, p. 1351–1371, 2000.

FONSECA, A.; INÁCIO, J. Phylloplane yeasts. In: ROSA, C. & PÉTER, G. (Eds.). Biodiversity and ecophysiology of yeasts. **Springer Berlin Heidelberg**. p. 263-301, 2006.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA & INPE 2015. ATLAS DOS REMANESCENTESFLORESTAIS DA MATA ATLÂNTICA. p. 61, 2012.

GONÇALVES, V. N. et al. Fungi associated with rocks of the Atacama Desert: Taxonomy, distribution, diversity, ecology and bioprospection for bioactive compounds. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 232–245, 2016.

GLUSHAKOVA, A. M.; CHERNOV, I. Y. Seasonal dynamics of the structure of epiphytic yeast communities. **Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 830–839, 2010.

GLUSHAKOVA, A. M.; CHERNOV, I. Y. Seasonal dynamics in a yeast population on leaves of the common wood sorrel *Oxalis acetosella* L. **Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 184–188, 2004.

GOFFREDI, S. K.; JANG, G. E.; HAROON, M. F. Transcriptomics in the tropics: Total RNA-based profiling of Costa Rican bromeliad-associated communities. **Computational and Structural BiotechnologyJournal**, v. 13, p. 18–23, 2015.

GOMES, F. C. O. et al. The diversity and extracellular enzymatic activities 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. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, n. 2, p. 597–611, 2015.

GROENEWALD, M.; ROBERT, V.; SMITH, M. T. The value of the D1/D2 and internal transcribed spacers (ITS) domains for the identification of yeast species belonging to the genus Yamadazyma. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 26, n. 1, p. 40–46, 30 jun. 2011.

HAGLER, A. N. et al. Yeasts and coliform bacteria of water accumulated in bromeliads of mangrove and sand dune ecosystems of southeast Brazil. **Canadian journal of microbiology**, v. 39, n. 10, p. 973–977, 1993.

HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology**, v. 50, n. November, p. 9–18, 2004.

HAWKSWORTH, D. L. A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. **IMA Fungus**, v. 2, n. 2, p. 155–162, 2011.

HAWKSWORTH, D. L. and LÜCKING, R. Fungal Diversity Revisited 2.2 to 3.8 Million Species. **Amirican Society for Microbiology**, vol. 5 no. 4, July 2017.

HAGLER, Allen N. Yeasts as indicators of environmental quality. In: ROSA, C. & PÉTER, G. Biodiversity and ecophysiology of yeasts. **Springer Berlin Heidelberg**. p. 515-532, 2006.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p. 509–547, 2007.

HILBER-BODMER, M. et al. Competition assays and physiological experiments of soil and phyllosphere yeasts identify Candida subhashii as a novel antagonist of filamentous fungi. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 4, 2017.

HORNUNG-LEONI, C. T. Bromeliads: Traditional Plant Food in Latin America Since Prehispanic Times. **Polibotánica**, n. 32, p. 219–229, 2011.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Mapa de Biomas e de Vegetação. 2006. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm> Acessado em: 05/10/2016.

INÁCIO, J. et al. Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a Mediterranean-type ecosystem in Portugal. **Microbial Ecology**, v. 44, n. 4, p. 344–353, 2002.

INÁCIO, J. et al. Characterisation and classification of phylloplane yeasts from Portugal related to the genus *Taphrina* and description of five novel *Lalaria* species. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 4-5, p. 541–555, 2004.

INÁCIO, J. et al. Assessment of phylloplane yeasts on selected Mediterranean plants by FISH with group-and species-specific oligonucleotide probes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 71, n. 1, p. 61–72, 2010.

JAMES, T. Y. et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 818–822, 2006a.

JAMES, T. Y. et al. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). **Mycology**, v. 98, n. 6, p. 860–871, 2006b.

JOLY, C. A.; METZGER, J. P.; TABARELLI, M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest : ecological findings and conservation initiatives Tansley review Experiences from the Brazilian Atlantic Forest : ecological findings and conservation initiatives. n. August 2015, p. 459–473, 2014.

JUMPPONEN, A.; JONES, K. L. Seasonally dynamic fungal communities in the Quercus macrocarpa phyllosphere differ between urban and nonurban environments. **New Phytologist**, v. 186, n. 2, p. 496–513, 2010.

KEMBEL, S. W.; MUELLER, R. C. Plant traits and taxonomy drive host associations in tropical phyllosphere fungal communities 1. **Botany**, v. 92, n. 4, p. 303–311, 2014.

KURTZMAN, C. P. et al. Methods for isolation, phenotypic characterization and

maintenance of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T (Eds). The Yeasts, a Taxonomic Study. Amsterdam: **Elsevier**. 5ª ed, vol. 1, p. 87–110. 2011.

KURTZMAN, C. P. Discussion of Teleomorphic and Anamorphic Ascomycetous Yeasts and Yeast-like Taxa. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T (Eds). The Yeasts, a Taxonomic Study. Amsterdam: **Elsevier**. 5ª ed, vol. 1, p. 293–307. 2011.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie van Leeuwenhoek, **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 331–371, 1998.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J.; BLACKWELL, M. Description of teunomyces gen. nov. for the Candida kruisii clade, Suhomyces gen. nov. for the Candida tanzawaensis clade and Suhomyces kilbournensis sp. nov. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 5, p. 1–9, 2016.

LANDELL, M. F. Caracterização genética e avaliação da diversidade de leveduras associadas a bromélias no Parque de Itapuã-Viamão/RS. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porta Alegre-RS, 2009.

LANDELL, M. F. et al. *Cryptococcus bromeliarum* sp. nov., an orange-coloured basidiomycetous yeast isolated from bromeliads in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 910–913, 2009.

LANDELL, M. F. et al. *Candida aechmeae* sp. nov. and *Candida vrieseae* sp. nov., novel yeast species isolated from the phylloplane of bromeliads in Southern Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 244–248, 2010.

LANDELL, M. F. et al. *Hannaella pagnoccae* sp. nov., a tremellaceous yeast species isolated from plants and soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 1970–1977, 2014.

LANDELL, M. F. et al. *Bullera vrieseae* sp. nov., a tremellaceous yeast species isolated from bromeliads. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 2466–2471, 2015.

LANDELL, M. F.; MAUTONE, J. N.; VALENTE, P. Biodiversity of Yeasts Associated To Bromeliads in Itapuã Park, Viamão / Rs. **Biociencias**, v. 14, n. 2, p. 144–149, 2006.

LEITMAN, P. et al. Floristic patterns of epiphytes in the Brazilian Atlantic Forest, a biodiversity hotspot. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 179, n. 2009, p. 587–601, 2015.

LEROY, C. et al. The contribution of microorganisms and metazoans to mineral nutrition in bromeliads. **Journal of Plant Ecology**, v. 9, n. 3, p. 241–255, 2016.

LIMA, R. A. F. et al. How much do we know about the endangered Atlantic Forest? Reviewing nearly 70 years of information on tree community surveys. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 9, p. 2135–2148, 2015.

LIMTONG, S. et al. Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. World Journal of **Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 1785–1796, 2014.

LIMTONG, S.; KAEWWICHIAN, R. The diversity of culturable yeasts in the phylloplane of rice in Thailand. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 667–675, 2014.

LIMTONG S., NASANIT R. Phylloplane Yeasts in Tropical Climates. In: Buzzini P., Lachance MA., Yurkov A. (eds) Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity. **Springer**, Champ. p. 199–223, 2017

LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the Phyllosphere. Microbiology of the Phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1875–1883, 2003.

LIU, X. Z. et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. **Studies in Mycology**, v. 81, p. 85–147, 2015.

LUMBSCH, H. T.; HUHNDORF, S. M. Myconet Volume 14. Part One. Outline of Ascomycota—2009. Part Two. Notes on Ascomycete Systematics. Nos. 4751–5113. **Fieldiana. Life and Earth Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1–64, 2010.

MAGGI, O. et al. Adaptation of fungi, including yeasts, to cold environments. Plant Biosystems - **An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 147, n. February 2015, p. 247–258, 2013.

MARTINY, J. B. H. et al. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature reviews**. Microbiology, v. 4, n. February, p. 102–112, 2006.

MANETTI, L. M.; DEIAPORTE, R. H.; LAVERDE, A. Metabólitos Secundários da Família Bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1885–1897, 2009.

MAUTONE, J. N. et al. Phylloplane yeasts as a source of industrially interesting enzymes. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 8, n. 9, p. 169–173, 2010.

MITTELBACH, M. et al. Nectar sugars and bird visitation define a floral niche for basidiomycetous yeast on the Canary Islands. **BMC Ecology**, v. 15, n. 1, p. 2, 2015.

MITTERMEIER, R.A; GIL P.R, HOFFMANN M; PILGRIM J, BROOKS T; MITTERMEIER

C.G; LAMOREUX J, FONSECA G.A.B. Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Mexico City: **CEMEX**. 2004.

MÜHLHAUSEN, S.; KOLLMAR, M. Molecular phylogeny of sequenced Saccharomycetes reveals polyphyly of the alternative yeast codon usage. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 12, p. 3222–3237, 2014.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000.

NASANIT, R. et al. Assessment of epiphytic yeast diversity in rice (*Oryza sativa*) phyllosphere in Thailand by a culture-independent approach. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 119, n. 12, p. 1145–1157, 2015.

NASANIT, R. et al. Yeast diversity and novel yeast D1/D2 sequences from corn phylloplane obtained by a culture-independent approach. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2016.

ORTIZ-CASTELLANOS, L.; RUIZ-HERRERA, J. Phylogenetic relationships of the wall-synthesizing enzymes of Basidiomicota confirm the phylogeny of their subphyla. **Folia Microbiologica**, v. 60, n. 2, p. 143–150, 2015.

PAGANI, D. M. et al. *Papiliotrema leoncinii* sp. nov. and *Papiliotrema miconiae* sp. nov., two tremellaceous yeast species from Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1799–1806, 2016a.

PAGANI, D. M. et al. Susceptibility to antifungal agents and enzymatic activity of *Candida haemulonii* and *Cutaneotrichosporon dermatis* isolated from soft corals on the Brazilian reefs. **Archives of Microbiology**, 2016b.

PROBER, S. M. et al. Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. **Ecology Letters**, v. 18, n. 1, p. 85–95, 2015.

PULSCHEN, A. et al. UV-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology. **Microbiology Open**, v. 4, n. 4, p. 574–588, 2015.

RADHUKUMAR, S. Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems.**Springer**. 2017.

REISBERG, E. E. et al. Distinct phyllosphere bacterial communities on Arabidopsis wax mutant leaves. **Plos One**, v. 8, n. 11, p. 1–12, 2013.

RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141–1153, 2009.

RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: A Shrinking Biodiversity Hotspot. **Springer-Verlag**, v. 21, p. 405–434, 2011.

RUIVO, C. C. C. et al. *Candida bromeliacearum* sp. nov. and *Candida ubatubensis* sp. nov., two yeast species isolated from the water tanks of *Canistropsis seidelii* (Bromeliaceae). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 2213–2217, 2005.

SAFAR, S. V. B. et al. *Kazachstania rupicola* sp. nov., a yeast species isolated from water tanks of a bromeliad in Brazil**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART3, p. 1165–1168, 2013.

SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 1–6, 2012.

SIQUEIRA FILHO, J. A.; LEME, E. M. C. Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste: biodiversidade, conservação e suas bromélias. **Andrea Jakobsson Estúdio**, 2006.

SOBRAL-SOUZA, T.; LIMA-RIBEIRO, M. S.; SOLFERINI, V. N. Biogeography of Neotropical Rainforests: past connections between Amazon and Atlantic Forest detected by ecological niche modeling. **Evolutionary Ecology**, v. 29, n. 5, p. 643–655, 2015.

STADEN, R.; BEAL, K. F.; BONFIELD, J. K. The Staden package. **Methods in Molecular Biology**, n. 132, p. 115–130, 2000.

STARMER, W. T.; LACHANCE, M. A. Yeast ecology. The Yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T (Eds). The Yeasts, a Taxonomic Study. Amsterdam: **Elsevier**. 5ª ed, vol. 1, p. 65–83, 2011.

STEHMANN JR, FORZZA RC, SALINO A, SOBRAL M, COSTA DP, KAMINO LHY. Diversidade taxonômica na Floresta Atlântica. In: Stehmann JR, Forzza RC, Salino A, Sobral M, Costa DP, Kamino LHY, eds. Plantas da Floresta Atlântica. Rio de Janeiro: **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 3–12, 2009.

STARMER W.T., ABERDEEN V., LACHANCE MA. The Biogeographic Diversity of Cactophilic Yeasts. In: Péter G., Rosa C. (eds) Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook. **Springer**, Berlin, Heidelberg, 2006.

SUH, S.-O. et al. Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. **Mycology**, v. 98, n. 6, p. 1006–1017, 2006.

SYLVESTER, K. et al. Temperature and host preferences drive the diversification of Saccharomyces and other yeasts: a survey and the discovery of eight new yeast species. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 3, p. fov002, 2015.

TEDERSOO, L. et al. Global diversity and geography of soil fungi. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1052–1053, 2014.

TEIXEIRA, M. M. et al. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (Chaetothyriales, Ascomycota). **Studies in Mycology**, 2017.

THOMAS, W.M., CARVALHO, A.M., AMORIM, A.A., GARRISON, J. & ARBELÁEZ, A. L. Plant endemism in two forests in southern Bahia, Brazil. **Biodiversity and Conservation**. 7(3):311-322, 1998.

UEDA, H. et al. Extracellular esterases of phylloplane yeast *Pseudozyma antarctica* induce defect on cuticle layer structure and water-holding ability of plant leaves. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 15, p. 6405–6415, 2015.

VOORDECKERS K, KOMINEK J, DAS A, ESPINOSA-CANTÚ A, DE MAEYER D, et al. Adaptation to High Ethanol Reveals Complex Evolutionary Pathways. **PLOS Genetics** e1005635 p. 1–31, 2015.

VORHOLT, J. A. Microbial life in the phyllosphere. **Nature reviews**. v. 10, n. 12, p. 828–40, 2012.

VU, D. et al. DNA barcoding analysis of more than 9000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. **Studies in Mycology**, v. 85, p. 91–105, 2016.

WANG, K.; SIPILÄ, T. P.; OVERMYER, K. The isolation and characterization of resident yeasts from the phylloplane of Arabidopsis thaliana. **Nature Publishing Group**, n. July, p. 1–13, 2016.

Yurkov A. Temporal and Geographic Patterns in Yeast Distribution. In: Buzzini P., Lachance MA., Yurkov A. (eds) Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology. **Springer**, Cham, pp 101-130, 2017.

YURKOV, A. et al. Yeast Biogeography and the Effects of Species Recognition Approaches: The Case Study of Widespread Basidiomycetous Species from Birch Forests in Russia. **Current Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 587–601, 2015.

YURKOV, A. M. et al. Yeast diversity and species recovery rates from beech forest soils. **Mycological Progress**, v. 15, n. 8, p. 845–859, 2016.

YURKOV, A. M.; KEMLER, M.; BEGEROW, D. Species accumulation curves and incidence-based species richness estimators to appraise the diversity of cultivable yeasts from beech forest soils. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

YURKOV, A. M.; KEMLER, M.; BEGEROW, D. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. **Fungal Ecology**, v. 5, n. 1, p. 24–35, 2012.

ZHAO, R. L. et al. A six-gene phylogenetic overview of Basidiomycota and allied phyla with estimated divergence times of higher taxa and a phyloproteomics perspective. **Fungal Diversity**, v. 84, Volume 78, 239–292, 2016.

ZHAO, R. L. et al. A six-gene phylogenetic overview of Basidiomycota and allied phyla with estimated divergence times of higher taxa and a phyloproteomics perspective. **Fungal Diversity**, v. 84, pp 43-74, 2017.

ANEXOS

Tabela suplementar 1. Lista das espécies de leveduras isoladas com suas frequências de isolamento, a espécie de bromélia de onde foram isoladas e seus respectivos locais.A. ASCOMYCOTA B. BASIDIOMYCOTA

A. ASCOMYCOTA

	Maceió														Murici				Quebrangulo			União dos Palmares					
Espécies de leveduras	*Aechmea costantinii*	*Aechmea froesii*	*Aechmea muricata*	*Aechmea tomentosa*	*Aechmea werdermannii*	*Ananas comosus*	*Billbergia sp*	*Canistrum alagoanum*	*Canistrum improcerum*	*Cryptanthus dianae*	*Lamprococcus chlorocarpus*	*Lamprococcus fulgens*	*Portea leptantha*	*Tillandsia kegeliana*	*Canistrum alagoanum*	*Canistrum aurantiacum*	*Lamprococcus chlorocarpus*	*Lamprococcus fulgens*	*Billbergia sp*	*Canistrum aurantiacum*	*Portea leptantha*	*Aechmea werdermannii*	*Ananas comosus*	*Hohenbergia ridleyi*	*Hohenbergia stellata*	*Portea leptantha*	**Total**
Anhellia nectandrae		1																									1
Aureobasidium pullulans	1[a]	1[a]		1[a]			1		1												1						6
Aureobasidium sp. nov. 1																					1						1
Aureobasidium thailandense		3[a]-1		1[a]-1			1						1						1[a]		2	1	1		1		14
Candida sinolaborantium																		1									1
Clavispora\Candida intermedia															1[a]	2[a]	2	1[a]	1[a]	1[a]	1[a]						9
Clavispora\Candida pseudointermedia	2[a]																										2
Exophiala sp. nov.									1																		1
Hanseniaspora sp. nov.																		1[a]									1
Hanseniaspora uvarum										1		2						2[a]									5
Hortaea werneckii																										1	1
Lodderomyces\Candida parapsilosis								1									1							1			3
Metschnikowia sp. nov. 1		2[a]-1																									3
Metschnikowia sp. nov. 2		1																									1
Meyerozyma caribbica			1[a]																								1
Meyerozyma guilliermondii		2	3[a]		1		1	1										1									9
Meyerozyma\Candida carpophila	1[a]		1[a]																								2
Phaeothecoidea sp. nov.						1								1													2
Phialemoniopsis ocularis											2[a]																2
Torulaspora delbrueckii		1[a]																									1
Wickerhamiella jalapaonensis																		1[a]									1
Yamadazyma\Candida jaroonii																2[a]-2		1[a]									5
Total geral	**4**	**13**	**5**	**3**	**1**	**1**	**3**	**2**	**2**	**1**	**2**	**2**	**1**	**1**	**1**	**6**	**3**	**8**	**2**	**1**	**5**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**72**

(As letras correspondem ao tipo de substrato de isolamento, a = antosfera; f = fitotelma e as que apresentam só número correspondem ao filoplano).

Continuação - Tabela suplementar 1. Lista das espécies de leveduras isoladas com suas frequências de isolamento, a espécie de bromélia de onde foram isoladas e seus respectivos locais.A. ASCOMYCOTA B. BASIDIOMYCOTA

B. BASIDIOMYCOTA

	Maceió															Murici						Quebrangulo									UUnião dos Palmares									
Espécies de leveduras	*Aechmea froesii*	*Aechmea muricata*	*Aechmea tomentosa*	*Aechmea wedermannii*	*Aechmea werdermannii*	*Ananas comosus*	*Billbergia sp*	*Canistrum alagoanum*	*Canistrum improcerum*	*Cryptanthus burle-marxii*	*Cryptanthus dianae*	*Cryptanthus zonatus*	*Lamprococcus chlorocarpus*	*Lamprococcus fulgens*	*Tillandsia kegeliana*	*Aechmea costantinii*	*Canistrum alagoanum*	*Canistrum aurantiacum*	*Lamprococcus chlorocarpus*	*Lamprococcus fulgens*	Sem identificação	*Aechmea cephaloides*	*Aechmea costantinii*	*Aechmea muricata*	*Aechmea werdermannii*	*Billbergia sp*	*Bromelia karatas*	*Canistrum aurantiacum*	*Hohenbergia stellata*	*Lamprococcus chlorocarpus*	*Portea leptantha*	Sem identifição	*Aechmea costantinii*	*Aechmea froesii*	*Aechmea mertensii*	*Aechmea werdermannii*	*Ananas comosus*	*Hohenbergia ridleyi*	*Hohenbergia stellata*	*Lamprococcus chlorocarpus*	*Neoregelia gigas*	*Portea leptantha*	*Sem identificação*	*Tillandsia chapeuensis*	*Tillandsia sp*	**Total**
Anomalomyces sp. nov.																													1													1
Bulleribasidium sp. nov.																																								1		1
Carcinomyces sp. nov.																														1												1
Carlosrosaea aechmeae																1																										1
Carlosrosaea hohenbergiae														1			1[a]	1		1[a]														1	1	2			1		1	1	11
Carlosrosaea sp. nov. 3	2							1									1	2			1								1							1			2				11
Carlosrosaea sp. nov. 4																																								2			1
Carlosrosaea sp. nov. 5																																				1						1
Carlosrosaea sp. nov. 6																																								2			1
Carlosrosaea sp. nov. 7																	1																										1
Carlosrosaea sp. nov. 8		1																															1									2
Carlosrosaea sp. nov. 9	1																																									1
Colacogloea cycloclastica																																								1			1
Colacogloea diffluens																																								1		5	6
Colacogloea sp. nov. 1													1																														1
Colacogloea sp. nov. 2																																										1		1
Cyrenella sp. nov. 1		1		1																																							2
Cystobasidium sp. nov.												1																												1			2
Dimennazyma cistialbidi		1[a]																																									1
Fellomyces borneensis																																			2					1			3
Hannaella kunmingensis																													1														1
Hannaella oryzae																																								1			1
Hannaella pagnoccae																						1							1	1										1			4
Hannaella phetchabunensis																																										1	1
Hannaella siamensis																															1												1
Hannaella sp. nov. 1																							1																1			2
Hannaella sp. nov. 2																	1																										1
Hannaella sp. nov. 3																				1																							1
Hannaella sp. nov. 4												1																															1
Hannaella zeae																																1[f]											1

(As letras correspondem ao tipo de substrato de isolamento, a = antosfera; f = fitotelma e as que apresentam só número correspondem ao filoplano)

ContinuaçãoTabela suplementar 1. Lista das espécies de leveduras isoladas com suas frequências de isolamento, a espécie de bromélia de onde foram isoladas e seus respectivos locais.A. ASCOMYCOTA B. BASIDIOMYCOTA

B. BASIDIOMYCOTA

	Maceió														Murici						Quebrangulo								UUnião dos Palmares										
Espécies de leveduras	*Aechmea froesii*	*Aechmea muricata*	*Aechmea tomentosa*	*Aechmea wedermannii*	*Aechmea werdermannii*	*Ananas comosus*	*Billbergia sp*	*Canistrum alagoanum*	*Canistrum improcerum*	*Cryptanthus burle-marxii*	*Cryptanthus dianae*	*Cryptanthus zonatus*	*Lamprococcus chlorocarpus*	*Lamprococcus fulgens*	*Tillandsia kegeliana*	*Aechmea costantinii*	*Canistrum alagoanum*	*Canistrum aurantiacum*	*Lamprococcus chlorocarpus*	*Lamprococcus fulgens*	*Sem identificação*	*Aechmea cephaloides*	*Aechmea costantinii*	*Aechmea muricata*	*Aechmea werdermannii*	*Billbergia sp*	*Bromelia karatas*	*Canistrum aurantiacum*	*Hohenbergia stellata*	*Lamprococcus chlorocarpus*	*Portea leptantha*	*Sem identifição*	*Aechmea costantinii*	*Aechmea froesii*	*Aechmea mertensii*	*Aechmea werdermannii*	*Ananas comosus*	*Hohenbergia ridleyi*	*Hohenbergia stellata*	*Lamprococcus chlorocarpus*	*Neoregelia gigas*	*Portea leptantha*	*Sem identificação*	*Tillandsia chapeuensis*	*Tillandsia sp*	**Total**
Hasegawazyma lactosa												1																												1
Heterocephalacria sp. nov. 1		1																																					1	2
Jaminaea rósea												1																												1
Kockovaella sacchari																																						1		1
Kordyana sp. nov. 1																														1										1
Kordyana sp. nov. 2									1																															1
Kordyana sp. nov. 3																		1																						1
Meira miltonrushii																									1												1			2
Meira nashicola	2																																							2
Meira sp. nov. 2																									1																1
Meredithblackwellia sp. nov.																																		2						2
Microstroma sp. nov. 1					1						1																													2
Moesziomyces antarcticus																													1											1
Moesziomyces aphidis									1																	1			1	1	2										6
Moesziomyces rugulosa																															1										1
Pattersoniomyces tillandsiae									1																															1
Moesziomyces sp. nov. 2		1																																						1
Oberwinklerozyma sp. nov.												1																												1
Occultifur externus																																							1	1
Occultifur sp. nov. 1																										1[a]	1[a]									1					3
Papiliotrema flavescens	1[a]	1[a]	1[a]						1		1[a]		1[a]				2[a]	1[a]		1		1		1	1[a]			1	1			1	2					1			19
Papiliotrema leoncinii																1	2		3						1					1			2				1		1	2	14
Papiliotrema mangalensis											1								1																						2
Papiliotrema miconiae			1[a]																						1																2
Papiliotrema nemorosus	1[a]																																						2	3
Papiliotrema siamense						1					1				1																										3
Papiliotrema sp. nov. 1												1				1[a]													1									1	1	5
Piskurozyma sp. nov.																			1[a]																						1
Piskurozyma taiwanensis		1																	1						1													1			4
Pseudohyphozyma bogoriensis																		1[a]	1[a]																						2
Pseudozyma hubeiensis	1[a]	1				1	1	1	1		2[a]-1		1		1			1[a]											1						1	1				2	17
Pseudozyma sp. nov.																										1															1

(As letras correspondem ao tipo de substrato de isolamento, a = antosfera; f = fitotelma e as que apresentam só número correspondem ao filoplano).

Continuação - **Tabela suplementar 1.** Lista das espécies de leveduras isoladas com suas frequências de isolamento, a espécie de bromélia de onde foram isoladas e seus respectivos locais.A. ASCOMYCOTA B. BASIDIOMYCOTA

B. BASIDIOMYCOTA

	Maceió																Murici						Quebrangulo										UUnião dos Palmares											
Espécies de leveduras	*Aechmea froesii*	*Aechmea muricata*	*Aechmea tomentosa*	*Aechmea wedermannii*	*Aechmea werdermannii*	*Ananas comosus*	*Billbergia sp*	*Canistrum alagoanum*	*Canistrum improcerum*	*Cryptanthus burle-marxii*	*Cryptanthus dianae*	*Cryptanthus zonatus*	*Lamprococcus chlorocarpus*	*Lamprococcus fulgens*	*Tillandsia kegeliana*	*Aechmea costantinii*	*Canistrum alagoanum*	*Canistrum aurantiacum*	*Lamprococcus chlorocarpus*	*Lamprococcus fulgens*	*Sem identificação*	*Aechmea cephaloides*	*Aechmea costantinii*	*Aechmea muricata*	*Aechmea werdermannii*	*Billbergia sp*	*Bromelia karatas*	*Canistrum aurantiacum*	*Hohenbergia stellata*	*Lamprococcus chlorocarpus*	*Portea leptantha*	*Sem identifição*	*Aechmea costantinii*	*Aechmea froesii*	*Aechmea mertensii*	*Aechmea werdermannii*	*Ananas comosus*	*Hohenbergia ridleyi*	*Hohenbergia stellata*	*Lamprococcus chlorocarpus*	*Neoregelia gigas*	*Portea leptantha*	*Sem identificação*	*Tillandsia chapeuensis*	*Tillandsia sp*	**Total**
Rhodosporidiobolus poonsookiae											1																																	1
Rhodosporidiobolus ruineniae		1[a]									1[a]																																	2
Rhodotorula sp. nov. 1																															1														1
Rhodotorula sp. nov. 2																											1																		1
Rhodotorula taiwanensis																															2														2
Rhynchogastrema complexa																										1																			1
Saitozyma podzolica		2		1							1[a]																									1									6
Saitozyma sp. nov. 1	1												1														1														1				4
Saitozyma sp. nov. 2		1[a]										1																																	2
sporobolomyces carnicolor	1																																												1
*Sporobolomyces*sp. nov. 1																												1																		1
Symmetrospora marina																													2		3														5
Symmetrospora marina/vermiculatus																																				3									3
Symmetrospora sp. nov. 1										1												1									1													3
Symmetrospora sp. nov. 2																															1														1
Symmetrospora symmetricus																																							1						1
Sympodiomycopsis paphiopedili																															1														1
Sympodiomycopsis sp. nov.		1																																										1
Tremella sp. nov. 1												1																																	1
Tremella sp. nov. 2																															1					1	1								3
Tremella sp. nov. 3																		1																											1
Tremella sp. nov. 4																																											1			1
Tremella sp. nov. 5											1																																			1
*Trimorphomyces*sp. nov. 1																																								1	1					2
Vishniacozyma sp. nov. 2																					1																						1			2
Vishniacozyma sp. nov. 1			1												1			1				1			1						1[f]		1					1							8
Vishniacozyma taibaiensis											1															1																1			3
Vonarxula javanica							1																																						1
Vonarxula sp. nov.												1																																		1
Yunzhangia sp. nov.																									1																					1
Total geral	**4**	**13**	**9**	**1**	**1**	**1**	**2**	**2**	**3**	**4**	**1**	**14**	**6**	**4**	**1**	**3**	**1**	**5**	**11**	**3**	**11**	**2**	**2**	**1**	**1**	**7**	**4**	**5**	**4**	**9**	**4**	**16**	**2**	**1**	**5**	**3**	**9**	**6**	**4**	**3**	**4**	**3**	**16**	**2**	**16**	**2**	**231**

(As letras correspondem ao tipo de substrato de isolamento, a = antosfera; f = fitotelma e as que apresentam só número correspondem ao filoplano).

Tabela suplementar 2. Lista de isolados de leveduras e seus respectivos códigos: (Código da linhagem; GenBank; Número de coleção (UFMG) e Número de coleção (CBS)).

Filo	*Gênero*	*Espécie*	*Código da linhagem*	*GenBank ITS¹; D1/D2²*	*Número de coleção (UFMG)*	*Número de coleção (CBS)*
ASCOMYCOTA						
	Exophiala	*Exophiala* sp. nov.	BSS161	KY305141[1]; KX348014[2]	UFMG-CM-Y6111	CBS 141892
	Myriangium	*Myriangium* sp. nov.	BSS155	KY305129[1];KX348020[2]		
	Hortaea werneckii	*Hortaea werneckii*	BSB29	KR610426[2]		
BASIDIOMYCOTA						
	Bulleribasidium	*Bulleribasidium* sp. nov.	BSB09	KY305125[1];KY305117[2]		
	Carcinomyces	*Carcinomyces* sp. nov.	BPT70	KY305146[1];KY305115[2]	UFMG-CM-Y6101	CBS 14575
	Carlosrosaea	*Carlosrosaea* hohenbergiae	BSB05	KX009089[1];KX009071[2]		CBS 14579
		Carlosrosaea hohenbergiae	BSB16	KX009090[1];KX009072[2]	UFMG-CM-Y6103	
		Carlosrosaea hohenbergiae	BSB34	KX009091[1];KX009073[2]	UFMG-CM-Y405	CBS 14563
		Carlosrosaea hohenbergiae	BM82	KX009087[1];KX009069[2]	UFMG-CM-Y6094	
		Carlosrosaea hohenbergiae	BSS147	KX009092[1];KX009074[2]		CBS 14564
		Carlosrosaea aechmeae	BM94	KX009088[1];KX009070[2]	UFMG-CM-Y6095	CBS 14578
		Carlosrosaea sp. nov. 3	BSB18	KX009103[1];KJ690943[2]	UFMG-CM-Y402	
		Carlosrosaea sp. nov. 3	BSB24	KX009097[1]		
		Carlosrosaea sp. nov. 3	BPT61	KX009095[1];KX009077[2]	UFMG-CM-Y6099	
		Carlosrosaea sp. nov. 3	BM78	KX009086[1];KX009068[2]		
		Carlosrosaea sp. nov. 3	BM89	KX009094[1];KX009076[2]		
		Carlosrosaea sp. nov. 3	BM108	KX009093[1];KX009075[2]		
		Carlosrosaea sp. nov. 3	BSS145	KX009098[1]		
		Carlosrosaea sp. nov. 3	BSS158	KX009100[1];KX009082[2]		
		Carlosrosaea sp. nov. 4	BSB27	KX009083[1]	UFMG-CM-Y6105	
		Carlosrosaea sp. nov. 5	BSB46	KX009084[2]	UFMG-CM-Y406	
		Carlosrosaea sp. nov. 7	BM77	KX009085[1];KX009067[2]		
		Carlosrosaea sp. nov. 8	BM94	KX009088[1];KX009070[2]	UFMG-CM-Y6095	CBS 14578
	Colacogloea	*Colacogloea* sp. nov.	BSS168	KY305140[1];KX348013[2]		
	Cryptococcus	*Cryptococcus* sp. nov.	BSB30		UFMG-CM-Y6106	CBS 14574

(BM) Bromélia de Murici, (BSB) Bromélia da Serra da Barriga, (BPT) Bromélia de Pedra Talhada, (BSS) Bromélia da Serra da Saudinha, (UFMG) Universidade Federal de Minas Gerais, (CBS) Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Continuação - Tabela suplementar 2. Lista de isolados de leveduras e seus respectivos códigos: (Código da linhagem; GenBank; Número de coleção (UFMG) e Número de coleção (CBS)).

Filo	*Gênero*	*Espécie*	*Código da linhagem*	*GenBank ITS[1]; D1/D2[2]*	*Número de coleção (UFMG)*	*Número de coleção (CBS)*
Basidiomycota	***Cystobasidium***					
		Cystobasidium sp. nov.	BSB307	KY305128[2]		
	Hannaella					
		Hannaella sp. nov.1	BM92	KY305135[1];KX348015[2]	UFMG-CM-Y5983	
		Hannaella sp. nov.2	BM104		UFMG-CM-Y6097	CBS 14572
	Kordyana					
		Kordyana sp. nov.1	BPT68	KX348016[2]		
		Kordyana sp. nov.2	BSS140	KX348017[2]		
	Moesziomyces					
		Moesziomyces sp. nov.2	BSS149	KX348019[2]	UFMG-CM-Y6110	CBS 14580
	Occultifur					
		Occultifur sp. nov.	BSB51	KY305137[1]; KY305118[2]	UFMG-CM-Y6108	CBS 14576
	Papiliotrema					
		Papiliotrema leoncinii	BPT62	KT981970[1]; KT981968[2]		
		Papiliotrema leoncinii	BM76	KT981969[1]; KT981965[2]		
		Papiliotrema leoncinii	BM84	KT981971[1]; KT981966[2]	UFMG-CM-Y5982	
		Papiliotrema leoncinii	BM90	KT981972[1]; KT981967[2]	UFMG-CM-Y5984	
		Papiliotrema leoncinii	BM91	KY305127[1];KY305111[2]		
		Papiliotrema leoncinii	BM101			
		Papiliotrema sp. nov.	BM81	KY305126[1];KY305119[2]	UFMG-CM-Y6093	
	Pseudozyma					
		*Pseudozyma*sp. nov.	BSS144	KX348018[2]		
	Rhodotorula					
		Rhodotorula sp. nov.	BSB15	KX348021[2]	UFMG-CM-Y6102	CBS 14582
		Rhodotorula sp. nov.	BSS168	KX348013[2]		
		Rhodotorula sp. nov.	BPT176	KY305114[2]		
		Rhodotorula cyclostatica	BSB10	KM043877[2]		
	Saitozyma					
		Saitozyma sp. nov.	BSB30	KX267829[2]	UFMG-CM-	
	Symmetrospora			KY305113[2]	UFMG-CM-	
		Symmetrospora sp. nov.	BPT205	KY305116[2]		
		Symmetrospora sp. nov.	BPT209			

(BM) Bromélia de Murici, (BSB) Bromélia da Serra da Barriga, (BPT) Bromélia de Pedra Talhada, (BSS) Bromélia da Serra da Saudinha, (UFMG) Universidade Federal de Minas Gerais, (CBS) Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Continuação - Tabela suplementar 2. Lista de isolados de leveduras e seus respectivos códigos: (Código da linhagem; GenBank; Número de coleção (UFMG) e Número de coleção (CBS)).

Filo	*Gênero*	*Espécie*	*Código da linhagem*	*GenBank ITS[1]; D1/D2[2]*	*Número de coleção (UFMG)*	*Número de coleção (CBS)*
	Tremella					
		Tremella sp. nov. 1	BSB36	KM043878[2]	UFMG-CM-Y5980	CBS 14568
		Tremella sp. nov. 1	BSB40	KX348024[2]	UFMG-CM-Y6107	CBS 14570
		Tremella sp. nov. 1	BPT69	KX348023[2]	UFMG-CM-Y6100	CBS 14571
		Tremella sp. nov. 1	BM100	KX348022[2]	UFMG-CM-Y6096	CBS 14567
		Tremella sp. nov. 2	BSB20		UFMG-CM-Y6104	CBS 14569
		Tremella sp. nov. 2	BM87			
	Trimorphomyces					
		Trimorphomyces sp. nov. 1	BSB33	KY305142[1], KX348026[2]		
		*Trimorphomyces*sp. nov. 2	BSB35	KY305144[1],KX348025[2]		
	Vishniacozyma					
		Vishniacozyma sp. nov.	BM110	KY305136[1], KX348027[2]	UFMG-CM-Y6098	CBS 14573
	Yunzhangia					
		Yunzhangia sp. nov.	BPT54	KX348028[2]		

(BM) Bromélia de Murici, (BSB) Bromélia da Serra da Barriga, (BPT) Bromélia de Pedra Talhada, (BSS) Bromélia da Serra da Saudinha, (UFMG) Universidade Federal de Minas Gerais, (CBS) Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Seção 2: Artigos

Artigo 1. Publicado em International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY

TAXONOMIC DESCRIPTION
Felix *et al.*, *Int J Syst Evol Microbiol*
DOI 10.1099/ijsem.0.001856

MICROBIOLOGY SOCIETY

Carlosrosaea hohenbergiae sp. nov. and *Carlosrosaea aechmeae* sp. nov., two tremellaceous yeasts isolated from bromeliads in north-eastern Brazil

Ciro R. Felix,[1,2] Hector Mauricio Casanova Navarro,[1,2] Gustavo Vasconcelos Bastos Paulino,[1,2] Leonardo Broetto[1] and Melissa Fontes Landell[1,*]

Abstract

Yeast surveys associated with different bromeliads in north-eastern Brazil led to the proposal of two novel yeast species, *Carlosrosaea hohenbergiae* sp. nov. and *Carlosrosaea aechmeae* sp. nov., belonging to the Tremellales clade (Agaricomycotina, Basidiomycota). Analysis of the sequences of the internal transcribed spacer (ITS) region and D1/D2 domain of the LSU rRNA gene suggested an affinity with a phylogenetic lineage that includes recently reclassified *Carlosrosaea vrieseae*. Six isolates of the novel species were obtained from different bromeliad species collected in three Atlantic Forest fragments in Alagoas state, Brazil. *Ca. hohenbergiae* sp. nov. differs by 69 and 12 nucleotide substitutions in the ITS and D1/D2 domain, respectively, from *Ca. vrieseae*. The type strain is UFMG-CM-Y405^T (=BSB 34^T=CBS 14563^T), Mycobank 819227. *Ca. aechmeae* sp. nov. is represented by one strain isolated from *Aechmea constantinii* leaves. *Ca. aechmeae* sp. nov. differs from the related species *Ca. hohenbergiae* and *Ca. vrieseae* by 36 and 65 nucleotide substitutions, respectively, in the ITS region and by 12 and 15 nucleotide substitutions in the D1/D2 domain, respectively. The type strain of *Ca. aechmeae* sp. nov. is UFMG-CM-Y6095^T (=BM 94^T=CBS 14578), Mycobank 819228.

Bromeliaceae is one of the most representative flowering plant families (58 genera, 3140 species) and makes up a large part of epiphytic species in neotropical forests [1, 2] and the fourth most diverse of the Atlantic Forest biome in Brazil [3]. The phylloplane and phytotelm from bromeliads are an important microhabitat for many groups of yeasts [4–15]. The growth of these micro-organisms depends mainly on plant-secreted metabolites or external source material falling on the sheet surface, usually inorganic nutrients [16]. Given that they have some characteristics of extreme environments, such as nutrient limitation, low or inconsistent water activity, sunlight exposure, temperature fluctuations and production of antimicrobial compounds, bromeliads are an important source for the search for new micro-organisms [17–19].

During a survey of yeasts associated with bromeliads in north-eastern Brazil, two novel species of basidiomycetous yeasts were isolated from the phylloplane and flowers of different bromeliads. The sequences of the internal transcribed spacer (ITS) region, and the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene showed that these species are genetically distinct from all currently accepted basidiomycetous yeasts.

Initially, two novel species belonging to the genus *Bullera* were described, but the description of novel species of the genera *Cryptococcus* and *Bullera* in more than one order of Tremellomycetes has generated even more difficulty in the systematic taxonomy of this group, confirming the high degree of polyphyly [20, 21]. The two novel species described herein, *Carlosrosaea hohenbergiae* sp. nov. and *Carlosrosaea aechmeae* sp. nov., are phylogenetically closely related to *Bullera vrieseae* [10]. In the original description, *B. vrieseae* was placed together with *Bullera sakaeratica* and *Bullera miyagiana* in a well-supported clade, but Liu *et al.* (2015) [22] did not support the relationships between the three *Bullera* species. In response to these needs and with the use of different genes [SSU rRNA, domains D1/D2 of the LSU rRNA and ITS regions (ITS1 and 2) of rRNA, including the 5.8S rRNA gene, in addition to four gene-

Author affiliations: [1]Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil; [2]Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, Av. Lourival Melo Mota, s/n, CEP 57072-900, Maceió, AL, Brazil.
***Correspondence:** Melissa Fontes Landell, melissa.landell@gmail.com
Keywords: bromeliads; basidiomycetous yeasts; new species.
Abbreviation: ITS, internal transcribed spacer.
The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the sequences of the ITS region and the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene of the type strain *Carlosrosaea hohenbergiae* UFMG-CM-Y405^T (=BSB 34^T=CBS 14563^T) are KX009091 and KX009073, and for the type strain *Carlosrosaea aechmeae* sp. nov. UFMG-CM-Y6095^T (=BM 94^T=CBS 14578) are KX009088 and KX009070, respectively.
One supplementary figure is available with the online Supplementary Material.

001856 © 2017 IUMS

encoding proteins, subunits of RNA polymerase II (RPB1 and RPB2), the translation elongation factor 1-α (TEF1) and the mitochondrial cytochrome b gene (CYTB) comprising nucleotide sequences, Liu *et al.* [22] reclassified *B. vrieseae* in the genus *Carlosrosaea* with a single species described (*Carlosrosaea vrieseae*), placing it in a monophyletic genus and a new classification for the other two *Bullera* species, *Trimorphomyces sakaeraticus* and *Sugitazyma miyagiana*, respectively. The three genera (*Carlosrosaea*, *Trimorphomyces* and *Sugitazyma*) are classified in the Trimorphomycetaceae. Although they represent independent lineages in this family, Liu *et al.* [23] proposed Trimorphomycetaceae as a family for a well-supported monophyletic lineage that includes the flavus clade and *Trimorphomyces papilionaceus*, *S. miyagiana* and *T. sakaeraticus*.

In the present study, six yeast strains were isolated from bromeliads (Table 1) collected in three Atlantic Forest fragments in north-eastern Brazil. Phylogenetic analyses performed using sequences of ITS 1 and 2 and D1/D2 domains of the LSU rRNA gene show a close relationship between these species and *Ca. vrieseae* and significant differences in the number of substitutions. Given this, these strains are proposed as belonging to the second and third species of the genus *Carlosrosaea*, *Ca. hohenbergiae* sp. nov. and *Ca. aechmeae* sp. nov.

For isolation of yeasts, samples from different bromeliads were collected and immediately placed in sterile polyethylene bags, directly transported to the laboratory and washed with sterile distilled water. For yeast isolation from leaves and flowers, fragments of approximately 10 cm^2 were put in 50 ml Erlenmeyer flasks in a solution of sterile distilled water and shaken for 10 min. The water was replaced by 30 ml of Tween 20 (0.5 %), and vigorously shaken for 30 min twice [8]. Decimal dilutions from the last leaf wash were spread on YM agar (1 % glucose, 0.3 % malt extract, 0.3 % yeast extract, 0.5 % peptone, 2% agar), acidified to pH 4.0 with hydrochloric acid and containing chloramphenicol (400 mgl^{-1}) and incubated at 20–25 °C for up to 7 days.

Yeast isolates were purified by repeated streaking on YM agar plates and preserved at −20 °C or in agar slants for later identification. The yeasts were characterized by standard methods [24]. Carbon and nitrogen assimilation assays were carried out in solid plates.

The D1/D2 domains of the LSU rRNA gene were amplified with primers NL1 and NL4 and the ITS–5.8S region with primers ITS1 and ITS4 [25–27] [32], and PCR was performed as described by Lachance *et al.* [28]. The amplified DNAs of the strains were sequenced using protocol facilities from the Human Molecular Genetics Laboratory – Federal University of Pernambuco on an ABI 3130 Genetic Analyzer automated sequencing system using BigDye v3.1 and POP7 polymer (Life Technologies).

The sequences were compared with the GenBank database with the BLAST tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/) [29]. To estimate phylogenetic relationships, neighbour-joining ITS and D1/D2 trees were generated with the Kimura two-parameter model to correct for genetic distances [30] with the MEGA software, version 7 [33]. Gaps were excluded from the analysis. The robustness of trees was calculated with 1000 bootstrap pseudoreplicates [31]. The reference sequences for the trees were selected based on the phylogenetic relationships between members of the Tremellomycetes and in the classification proposed by Liu *et al.* [22].

All sequences generated in the present study were deposited at GenBank and accession numbers are shown in Table 1.

Table 1. List of strains, localities, substrates of isolation, dates of collection and DNA sequences used in this study

CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands; UFMG, Culture Collection of Microorganisms and Cells of the Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.

Yeast species	Strain (sequence accession nos.)	Other designation	Source, locality and biome	Date
Carlosrosaea hohenbergiae sp. nov.	UFMG-CM-Y405^T (KP203864*; KJ608554†)	CBS 14563^T; BSB 34^T	Leaf of *Hohenbergia ramageana* (Bromeliaceae), Serra da Barriga, União dos Palmares, Alagas, north-east Brazil, Atlantic Forest Biome	July 2013
	BSB 05 (KX009089*; KX009071†)	CBS 14579	Leaf of *Tillandsia* sp. (Bromeliaceae), Serra da Barriga, União dos Palmares, Alagas, north-east Brazil, Atlantic Forest Biome	July 2013
	BSB 16 (KX009090*; KX009072†)	UFMG-CM-Y6103	Leaf of *Portea leptantha* (Bromeliaceae), Serra da Barriga, União dos Palmares, Alagas, north-east Brazil, Atlantic Forest Biome	July 2013
	BM82 (KX009087*; KX009069†)	UFMG-CM-Y6094	Flower of *Canistrum alagoanum* (Bromeliaceae), Reserva ecológica de Murici, Murici, Alagoas, north-east Brazil, Atlantic Forest Biome	April 2014
	BSS 147 (KX009092*; KX009074†)	CBS 14564	Leaf of *Aechmea fulgens* (Bromeliaceae), Serra da Saudinha, Maceió, Alagoas, north-east Brazil, Atlantic Forest Biome	Feb 2015
Carlosrosaea aechmeae sp. nov.	UFMG-CM-Y6095^T (KX009088*; KX009070†)	CBS 14578^T; BM 94^T	Leaf of *Aechmea constantinii* (Bromeliaceae), Reserva ecológica de Murici, Murici, Alagoas, north-east Brazil, Atlantic Forest Biome	April 2014

*ITS region.

†D1/D2 region.

PROPOSAL OF TWO NOVEL SPECIES

Sequence comparisons of the ITS region and the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene indicated that all strains belong to two novel yeast species within the genus *Carlosrosaea* with an affinity to *Ca. vrieseae* (Fig. 1). *Ca. hohenbergiae* sp. nov. differs from this species by 69 and 12 nucleotide substitutions in the ITS and D1/D2 domains, respectively. *Ca. aechmeae* sp. nov. differs from *Ca. hohenbergiae* sp. nov. and *Ca. vrieseae* by 36 and 65 nucleotide substitutions in the ITS, and by 12 and 15 in the D1/D2 domain, respectively.

Pairwise comparisons between the sequences demonstrated that all *Ca. hohenbergiae* sp. nov. strains had greater than 99 % similarity in the D1/D2 region (0–4 substitutions and 0–1 indels) and 99–100 % in the ITS region (0 substitutions and 0–1 indels).

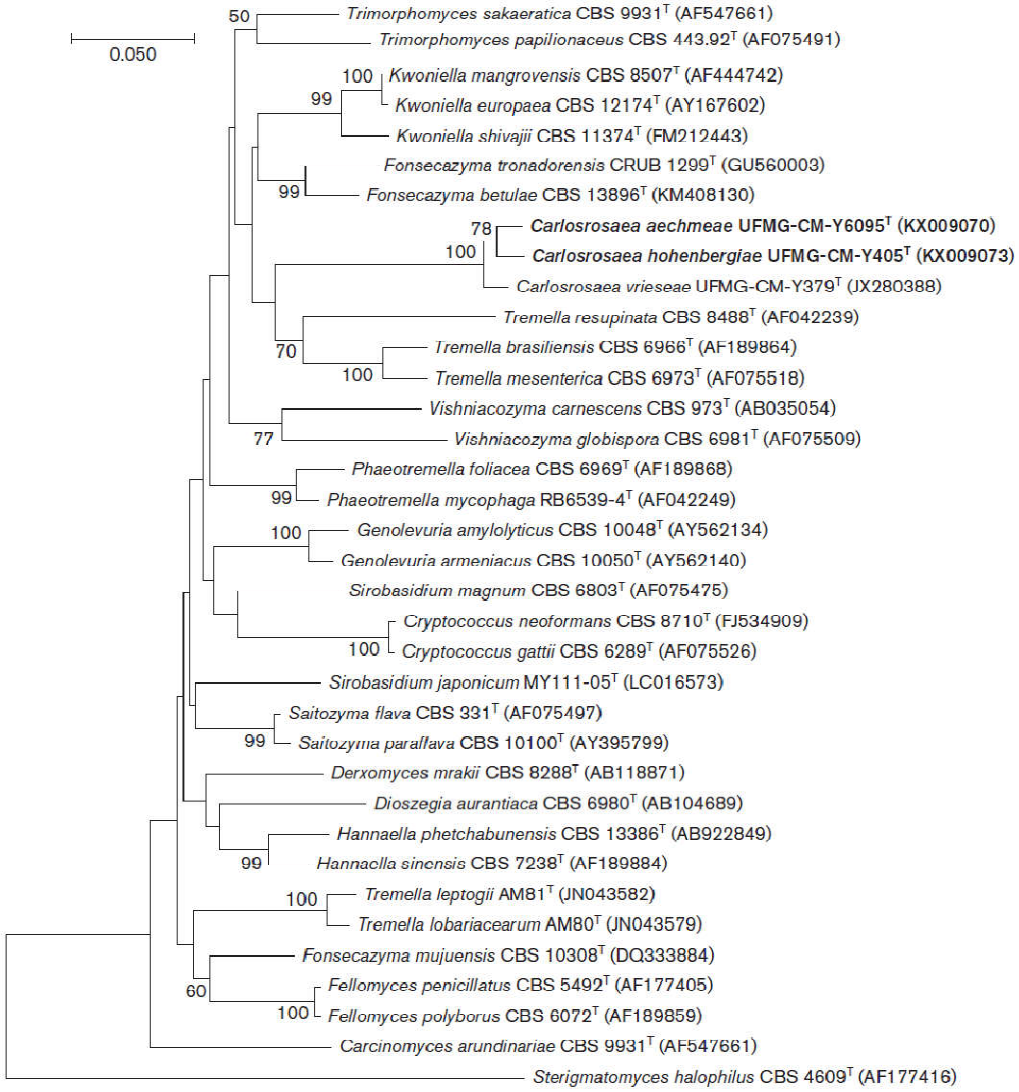


Fig. 1. Phylogenetic placement of *Carlosrosaea hohenbergiae* sp. nov. and *Carlosrosaea aechmeae* sp. nov. within the family Trimorphomycetaceae obtained by neighbour-joining (Kimura's two-parameter distance method) ≥ of the D1/D2 domain. Bootstrap values of ≥50 % are shown (1000 replicates). Bar, 0.05 substitutions per nucleotide position.

Table 2. Selected physiological/biochemical test responses for differentiation of the two novel species of *Carlosrosaea* and their closest relative

+, Positive; –, negative; v, variable.

Characteristic	*Ca. hohenbergiae*	*Ca. aechmeae*	*Ca. vrieseae**
Carbon source			
Inulin	+	+	v
Sucrose	v	–	v
Raffinose	+	+	v
D-Galactose	+	+	v
Trehalose	+	+	v
Soluble starch	v	+	v
Salicin	v	+	v
L-Rhamnose	+	+	v
D-Arabinose	+	+	v
Erythritol	v	–	–
Glycerol	–	–	v
Sorbitol	+	+	v
Lactate	–	–	v
Succinic acid	v	–	v
Citrate	–	–	v
N-Acetylglucosamine	+	+	v
Tween 20	v	–	+
Tween 80	v	–	+
Nitrogen source			
Nitrate	v	–	–
Nitrite	–	–	v
Cadaverine	–	+	+
Starch-like compounds	+	+	–

*Data are taken from Landell *et al.* [10].

The neighbour-joining tree from D1/D2 sequences (Fig. 1) and ITS sequences (Fig. S1, available in the online Supplementary Material) confirmed the six isolates as representing two distinct novel species within the genus *Carlosrosaea*.

The two novel species can be distinguished from each other based on the assimilation of sucrose and erythritol, which are variable for *Ca. hohenbergiae* sp. nov. but negative for *Ca. aechmeae*. *Ca. hohenbergiae* is variable for soluble starch and salicin whereas *Ca. aechmeae* is positive. Cadaverine is assimilated by *Ca. aechmeae*. However, a marked difference occurs with respect to the production of starch-like compounds, for which *Ca. vrieseae* is negative and the two novel species are positive. The physiological/biochemical differences between *Ca. hohenbergiae*, *Ca. aechmeae* and *Ca. vrieseae* are shown in Table 2.

The strains of *Ca. hohenbergiae* were tested alone or in pairs on cornmeal agar, malt extract agar, glucose-yeast extract agar and yeast extract malt extract agar at 25 °C for 21 days, but no signs of sexual reproduction were detected.

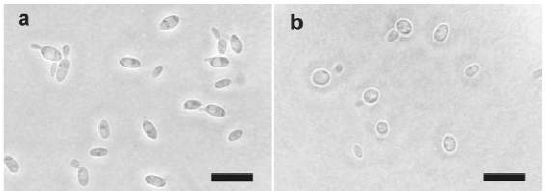


Fig. 2. Cells of *Carlosrosaea hohenbergiae* sp. nov. (a) and of *Carlosrosaea aechmeae* sp. nov. (b) on YPD agar after 5 days at 25 °C. Bars, 5 µm.

Previously, the only species of the genus *Carlosrosaea* has been isolated from water tanks and phylloplane of bromeliads [10], indicating that the substrate of this plant is a good source for the exploration of other species of the genus and other genera [4–15].

DESCRIPTION OF *CARLOSROSAEA HOHENBERGIAE* SP. NOV. FELIX, NAVARRO, PAULINO, BROETTO AND LANDELL

Carlosrosaea hohenbergiae sp. nov. (ho.hen.ber'gi.ae. N.L. gen. n. *hohenbergiae* of *Hohenbergia*, the bromeliad genus from which the type strain was isolated). The Mycobank number is MB 819227.

In YEPD broth after 5 days at 25 °C, cells are globose to ovoid and occur singly or in pairs (1.0–2.8×2.2–5.7 µm) (Fig. 2a). On YM agar after 3 days at 25 °C, colonies are smooth, mucous to butyrous, glistening and cream-coloured. After 3 weeks in Dalmau plate culture on cornmeal agar, pseudohyphae and true hyphae are not formed. Sexual reproduction is not observed. Ballistoconidia production is absent, and glucose fermentation ability is negative. The following carbon compounds are assimilated: D-glucose, galactose, D-ribose, sucrose (variable), D-xylose, L-arabinose, D-arabinose, L-rhamnose, maltose, trehalose, cellobiose, salicin (variable), melibiose, lactose, raffinose, melezitose, inulin, starch (variable), erythritol (variable), D-glucitol, D-mannitol, *myo*-inositol, D-galacturonate, succinic acid (variable), gluconic acid, L-arabinitol, *N*-acetylglucosamine, Tween 20 (variable) and Tween 80 (variable). No growth with glycerol, citrate or lactate. Nitrogen compounds are assimilated: sodium nitrate (variable) and lysine. No growth with cadaverine, creatine, creatinine, ethylamine or sodium nitrite. Growth at 25 and 30 °C is positive. Growth is not observed on GYP with 10 % (w/v) NaCl. Production of starch-like compounds is positive. Urease activity is positive. Diazonium blue B reaction is positive.

The type strain is UFMG-CM-Y405^{T} (=BSB 34^{T}=CBS 14563^{T}), isolated from phylloplane of the bromeliad *Hohenbergia ramageana* in Alagoas, Brazil. It is permanently preserved in a metabolically inactive state.

DESCRIPTION OF *CARLOSROSAEA AECHMEAE* SP. NOV. FELIX, NAVARRO, PAULINO, BROETTO AND LANDELL

Carlosrosaea aechmeae sp. nov. (aech.me'ae. N.L. gen. n. *aechmeae* of *Aechmea*, the bromeliad genus from which the type strain was isolated). The Mycobank number is MB 819228.

In YEPD broth after 5 days at 25 °C, cells are globose to ovoid and occur singly or in pairs (1.1–3.4×1.8–4.5 µm) (Fig. 2b). On YM agar after 3 days at 25 °C, colonies are smooth, butyrous to mucous, glistening and cream-coloured. After 3 weeks in Dalmau plate culture on cornmeal agar, pseudohyphae and true hyphae are not formed. Sexual reproduction is not observed. Ballistoconidia production is absent. Glucose fermentation ability is negative. The following carbon compounds are assimilated: D-glucose, galactose, D-ribose, D-xylose, L-arabinose, D-arabinose, L-ramnose, maltose, trehalose, cellobiose, salicin, melibiose, lactose, raffinose, melezitose, inulin, starch, D-glucitol, D-mannitol, *myo*-inositol, D-galacturonate, L-arabinitol, galactitol and *N*-acetylglucosamine. No growth with sucrose, *meso*-erythritol, glucanate, succinic acid, glycerol, citrate, lactate Tween 20 or Tween 80. Nitrogen compounds are assimilated: cadaverine and lysine. No growth with creatine, creatinine, ethylamine, sodium nitrate or sodium nitrite. Growth at 25 and 30 °C is positive. Growth is not observed on GYP with 10 % (w/v) NaCl. The production of starch-like compounds, urease activity and diazonium blue B reaction are positive.

The type strain is UFMG-CM-Y6095^T (=BM 94^T=CBS 14578^T), isolated from phylloplane of the bromeliad *Aechmea constantinii* in Alagoas, Brazil. It is permanently preserved in a metabolically inactive state.

Funding information
This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (CNPq) (process number 475378/2013-0).

Acknowledgements
We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (CNPq, process numbers 475378/2013-0 and 408718/2013-7), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio) and Memorial Parque Zumbi dos Palmares and Usina Caeté – Grupo Carlos Lyra.

Conflicts of interest
The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. **Zotz G.** The systematic distribution of vascular epiphytes - a critical update. *Bot J Linn Soc* 2013;171:453–481.
2. **Givnish TJ, Barfuss MH, van Ee B, Riina R, Schulte K *et al.*** Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Mol Phylogenet Evol* 2014;71:55–78.
3. **Basílio GA, Barbosa DEF, Furtado SG, Silva FR, Menini Neto L.** Community ecology of epiphytic Bromeliaceae in a remnant of Atlantic forest in zona da mata, minas gerais state, Brazil. *Hoehnea* 2015;42:21–31.
4. **Araújo FV, Rosa CA, Freitas LF, Lachance MA, Vaughan-Martini A *et al.*** *Kazachstania bromeliacearum* sp. nov., a yeast species from water tanks of bromeliads. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012;62:1002–1006.
5. **Inácio J, Landell MF, Valente P, Wang PH, Wang YT *et al.*** *Farysizyma* gen. nov., an anamorphic genus in the *Ustilaginales* to accommodate three novel epiphytic basidiomycetous yeast species from America, Europe and Asia. *FEMS Yeast Res* 2008;8:499–508.
6. **Ruivo CC, Lachance MA, Rosa CA, Bacci M, Pagnocca FC.** *Candida bromeliacearum* sp. nov. and *Candida ubatubensis* sp. nov., two yeast species isolated from the water tanks of *Canistropsis seidelii* (Bromeliaceae). *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:2213–2217.
7. **Landell MF, Inácio J, Fonseca A, Vainstein MH, Valente P.** *Cryptococcus bromeliarum* sp. nov., an orange-coloured basidiomycetous yeast isolated from bromeliads in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:910–913.
8. **Landell MF, Billodre R, Ramos JP, Leoncini O, Vainstein MH *et al.*** *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* 2010;60:244–248.
9. **Landell MF, Brandão LR, Barbosa AC, Ramos JP, Safar SV *et al.*** *Hannaella pagnoccae* sp. nov., a tremellaceous yeast species isolated from plants and soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:1970–1977.
10. **Landell MF, Brandão LR, Safar SV, Gomes FC, Félix CR *et al.*** *Bullera vrieseae* sp. nov., a tremellaceous yeast species isolated from bromeliads. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:2466–2471.
11. **Safar SV, Gomes FC, Marques AR, Lachance MA, Rosa CA.** *Kazachstania rupicola* sp. nov., a yeast species isolated from water tanks of a bromeliad in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;63:1165–1168.
12. **Sousa FM, Morais PB, Lachance MA, Rosa CA.** *Hagleromyces* gen. nov., a yeast genus in the Saccharomycetaceae, and description of *Hagleromyces aurorensis* sp. nov., isolated from water tanks of bromeliads. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:2915–2918.
13. **Gomes FC, Safar SV, Marques AR, Medeiros AO, Santos AR *et al.*** The diversity and extracellular enzymatic activities 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. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2015;107:597–611.
14. **Gomes F, Safar S, Santos A, Lachance M, Rosa C.** *Kockovaella libkindii* sp. nov., a yeast species isolated from water tanks of bromeliad. *Int J Syst Microbiol* 2016;66:5066–5069.
15. **Machado Pagani D, Brandão LR, Santos AR, Felix CR, Pais Ramos J *et al.*** *Papiliotrema leoncinii* sp. nov. and *Papiliotrema miconiae* sp. nov., two tremellaceous yeast species from Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:1799–1806.
16. **Limtong S, Koowadjanakul N, Jindamorakot S, Yongmanitchai W, Nakase T.** *Candida sirachaensis* sp. nov. and *Candida sakaeoensis* sp. nov. two anamorphic yeast species from phylloplane in Thailand. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2012;102:221–229.
17. **Camacho-Hernández IL, Chávez-Velázquez JA, Uribe-Beltrán MJ, Ríos-Morgan A, Delgado-Vargas F.** Antifungal activity of fruit pulp extract from *Bromelia pinguin*. *Fitoterapia* 2002;73:411–413.
18. **Looby CI, Eaton WD.** Effects of *Bromelia* pinguin (Bromeliaceae) on soil ecosystem function and fungal diversity in the lowland forests of Costa Rica. *BMC Ecol* 2014.
19. **Raffauf R *et al.*** Diterpenoid and flavonoid constituents of *Bromelia pinguin* L. *J Org Chem* 1981;46:1094–1098.
20. **Boekhout T, Fonseca Á, Sampaio JS, Bandoni RJ, Fell JW *et al.*** Discussion of teleomorphic and anamorphic basidiomycetous yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW and Boekhout T (editors). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5th ed, vol. III. Elsevier; 2011. pp. 1339–1372.

21. **Fonseca Á, Boekhout T, Fell JW.** *Cryptococcus* Vuillemin (1901). In: Kurtzman CP, Fell JW and Boekhout T (editors). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5th ed, vol. III. Elsevier; 2011. pp. 1661–1737.
22. **Liu XZ, Wang QM, Göker M, Groenewald M, Kachalkin AV *et al.*** Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. *Stud Mycol* 2015a;81:85–147.
23. **Liu XZ, Wang QM, Theelen B, Groenewald M, Bai FY *et al.*** Phylogeny of Tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses. *Stud Mycol* 2015b;81:1–26.
24. **Kurtzman CP, Fell FW, Boekhout T, Robert V.** Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW and Boekhout T (editors). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5th ed, vol. I. Elsevier; 2011. pp. 87–110.
25. **White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (editors). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, USA: Academic Press; 1990. pp. 315–322.
26. **O'Donnell K.** *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR and Taylor JW (editors). *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. Wallingford, UK: CAB International; 1993. pp. 225–233.
27. **Kurtzman CP, Robnett CJ.** Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1998;73:331–371.
28. **Lachance MA, Bowles JM, Starmer WT, Barker JS.** *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian *Hibiscus* flowers. *Can J Microbiol* 1999;45:172–177.
29. **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403–410.
30. **Kimura M.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111–120.
31. **Felsenstein J.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783–791.
32. **Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A.** Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1351–1371.
33. **Kumar S, Stecher G, Tamura K.** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33:1870–1874.

Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

Find out more and submit your article at microbiologyresearch.org.