

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE
LEVEDURAS ASSOCIADAS A BROMÉLIAS NO
PARQUE DE ITAPUÃ-VIAMÃO/RS.**

TESE DE DOUTORADO

MELISSA FONTES LANDELL

Orientador: Dra. Patricia Valente

Setembro, 2009

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE
LEVEDURAS ASSOCIADAS A BROMÉLIAS NO
PARQUE DE ITAPUÃ-VIAMÃO/RS.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (Área de concentração: Microbiologia de Ambientes Naturais e Antropogênicos), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Microbiologia.

MELISSA FONTES LANDELL

Bióloga / ULBRA

Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente/UFRGS

Orientador: Dra. Patricia Valente

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

L254c Landell, Melissa Fontes

Caracterização genética e avaliação da diversidade de leveduras associadas a bromélias no Parque de Itapuã-Viamão/RS / Melissa Fontes Landell. – 2009.

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. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

Orientação: Prof^a. Patricia Valente da Silva

1. Leveduras - classificação 2. Leveduras – genética 3. Bromélias
4. Biodiversidade 5. Parque Estadual de Itapuã (Viamão, RS) I. Silva, Patricia Valente da, orient. II. Título.

CDU 579.2 (043)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia - ICBS e no Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, do Centro de Biotecnologia, ambos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

À Professora Patricia Valente, minha querida orientadora, por toda a paciência, por compartilhar seus saberes, por me ensinar a pesquisar e criticar, por me aceitar, por apostar e acreditar em mim, por me escutar e aconselhar, por ser mais do que uma orientadora.

À Professora Marilene Vainstein por me “acolher” tão bem em seu laboratório, por acreditar e confiar em mim, me dando espaço, oportunidades e liberdade, além de um exemplo de pesquisadora.

À Professora Maria Lúcia Scroferneker pelas colaborações, por me ouvir e me aconselhar tantas vezes.

À Professora Marisa da Costa pela disposição na primeira orientação.

Aos Doutores Jesus Pais Ramos, Orílio Leoncini, Carlos Rosa e Marc-André Lachance pelas contribuições e colaborações.

Ao “Seu Jairo” do Parque de Itapuã, pelo auxílio e por tornar as manhãs de coletas no parque muito mais divertidas.

Às minhas adoradas amigas que conquistei durante esses quase quatro anos, Ângela Junges, Caru Silveira, Juli Crestani, Letícia Goulart, Lis Ribeiro e Simone Virtuoso, pela convivência, amizade, aprendizado, conversas e palavras amigas.

Aos meus queridos colegas e amigos dos laboratórios 220 e 217 do Centro de Biotecnologia, em especial, Josiane Faganello, Juliano Boldo, Bianca Gervini, Lívia Kmetzsch, Lucélia Santi, Walter Beys e Lusía Leal por todas as conversas, risadas e auxílios.

Às alunas de iniciação científica Raisia Billodre e Roberta Mello.

Ao Leonardo pelo apoio, ensinamentos, carinho, companheirismo, amor e paciência, por me fazer tão feliz.

À minha família e aos meus irmãos por sempre me apoiarem, e às minhas lindas sobrinhas por tornarem meus dias mais alegres.

Ao meu querido pai, meu exemplo, que sempre apoiou as minhas escolhas, que me ouviu, que me incentivou mesmo às custas de ausências e sacrifícios, que sempre tem palavras de carinho, pelo companheirismo, pela paciência, por seu amor incondicional.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução da tese e para minha formação.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A BROMÉLIAS NO PARQUE DE ITAPUÃ-VIAMÃO/RS.

Autor: Melissa Fontes Landell

Orientador: Prof. Dr. Patrícia Valente

¹RESUMO

Durante o período de abril de 2004 a fevereiro de 2007, foram coletadas 73 amostras de folhas de bromélias do Parque de Itapuã, Viamão, RS, com o objetivo de descrever as espécies de leveduras presentes, elucidar a ecologia destes microrganismos nesse habitat e avaliar o perfil enzimático das leveduras isoladas. Fragmentos das folhas foram submetidos a lavagens sucessivas com 0,5% Tween 20. Diluições decimais seriadas da última lavagem, amostras de água dos tanques de bromélias e de flores foram inoculadas em meio YM (levedura-malte) modificado e incubadas a 25°C por 5-7 dias. Representantes dos diferentes morfotipos foram selecionados, purificados e mantidos a 4°C até a caracterização molecular. Dos 178 isolados obtidos, 148 foram identificados por meio do seqüenciamento da região D1/D2 do rDNA e/ou ITS, sendo 6% de afinidade ascomicética e 94% de afinidade basidiomicética. Do total identificado, cerca de 61% são espécies ainda não descritas de leveduras. Os gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula* foram predominantes, seguidos por *Farysizyma* gen. nov. e *Sporobolomyces*. Dentre as leveduras já descritas, as espécies *Rhodotorula marina* (n=12), e *Cryptococcus flavescens* (n=16) foram as mais freqüentes. A espécie de afinidade basidiomicética denominada *Farysizyma itapuensis* foi descrita no presente trabalho e demonstrou ser freqüente (n=18). Além dessa espécie, foi descrita uma nova espécie de levedura basidiomicética pigmentada: *Cryptococcus bromeliarum* sp. nov.. Entre os ascomicetos, duas espécies novas foram identificadas e descritas, *Candida aechmeae* sp. nov. e *Candida vrieseae* sp. nov.. Alguns isolados designados como *Cryptococcus* sp. nov. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 e *Rhodotorula* sp. nov. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, entre outros menos frequentes, também pertencem a novas espécies e estão em processo de descrição. A diversidade e a riqueza de leveduras, calculadas pelo índice de Shannon-Weaver, foram maiores na Praia da Fora (H=3,471 e S=41) que na Praia da Pedreira (H=3,007 e S=32). Cento e quinze isolados tiveram sua capacidade para produzir enzimas amilase, celulase, proteinase e pectinase testadas, 107 foram testadas para hidrólise de azeite e 114 para tween 80. Desses, cerca de 13% foram positivos para amilase, 35,5% para proteinase, 17% para celulase, aproximadamente 3% para hidrólise de azeite e 72% para tween 80. Nenhum isolado apresentou resultado positivo para pectinase. Os resultados obtidos revelaram o grande potencial do filoplano de bromélias como substrato para o estudo e identificação de novas espécies de leveduras, assim como um bom substrato para o isolamento de leveduras produtoras de enzimas de interesse industrial.

¹ Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia de Ambientes Naturais e Antropogênicos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (186p). Setembro, 2009.

GENETIC CHARACTERIZATION AND ASSESSMENT OF THE DIVERSITY OF YEASTS ASSOCIATED WITH BROMELIADS IN ITAPUÃ PARK, VIAMÃO/RS.

Author: Melissa Fontes Landell

Advisor: Dr. Patricia Valente

²ABSTRACT

From April 2004 until February 2007, 73 samples of leaves of bromeliads were collected in Itapuã Park, Viamão, RS, with the objective of describing the yeast species present, elucidating the ecology of these microorganisms in this habitat and evaluating the enzymatic profile of yeasts isolates. Leaf pieces were submitted to successive washings with 0.5% Tween 20. Decimal serial dilutions from the last washing, samples of tank water, and flowers were inoculated in modified YM medium, and incubated at 25°C for 5-7 days. Representatives of different morphotypes were selected, purified and stored at 4°C until molecular characterization. Of the 178 isolates obtained, 148 were identified by sequencing the D1/D2 region of rDNA and / or ITS, being 6% of ascomycetous affinity and 94% of basidiomycetous affinity. Of the total identified, about 61% are undescribed yeast species. The genus *Cryptococcus* and *Rhodotorula* were predominant, followed by *Farysizyma* gen. nov. and *Sporobolomyces*. Among the yeasts already described, *Rhodotorula marina* (n = 12) and *Cryptococcus flavescens* (n = 16) were the most frequent. The species of basidiomycetous affinity named *Farysizyma itapuensis* was described in this work and proved to be frequent (n = 18). Besides this species, a new species of basidiomycetous pigmented yeast was also described: *Cryptococcus bromeliarum* sp. nov.. Among the ascomycetes, two new species were identified and described, *Candida aechmeae* sp. nov. and *Candida vrieseae* sp. nov.. Some isolates designated as *Cryptococcus* sp. nov. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11 and *Rhodotorula* sp. nov. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, among other less frequent, also belong to new species and are in the process of description. The diversity and richness of yeasts, calculated by the Shannon-Weaver index, were higher in Fora Beach (H = 3.471 and S = 41) than Pedreira Beach (H = 3.007 and S = 32). One hundred and fifteen isolates had their ability to produce amylase, proteinase, cellulase and pectinase tested, 107 isolates were tested for olive oil consumption and 114 for tween 80. Of these, 13% were positive for amylase, 35.5% for proteinase, 17% for cellulase, 3% for olive oil and 72% for Tween 80. No isolate was positive for pectinase. The results revealed the great potential of phylloplane bromeliads as a substrate for the study and identification of new species of yeasts, as well as a good substrate for the isolation of yeasts producing enzymes of industrial interest.

² Doctoral thesis in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (186p). September, 2009.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RELAÇÃO DE TABELAS..... | x |
| RELAÇÃO DE FIGURAS..... | xi |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xii |
| 1) INTRODUÇÃO..... | 01 |
| 2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 03 |
| 2.1 Mata Atlântica: modelo de diversidade..... | 03 |
| 2.2 Parque de Itapuã | 05 |
| 2.3 Bromélias: modelo de planta tropical..... | 06 |
| 2.4 Leveduras | 07 |
| 2.5 Leveduras no filoplano..... | 08 |
| 2.6 Presença de leveduras em bromélias..... | 11 |
| 2.7 Taxonomia convencional de leveduras..... | 12 |
| 2.8 Taxonomia molecular de leveduras..... | 13 |
| 2.9 Descrição de espécies novas de leveduras no Brasil..... | 20 |
| 2.10 Classificação de leveduras ascomicéticas..... | 21 |
| 2.11 Classificação de leveduras basidiomicéticas..... | 23 |
| 2.11.1 Pucciniomycotina..... | 23 |
| 2.11.2 Ustilaginomycotina..... | 25 |
| 2.11.3 Agaricomycotina..... | 25 |
| 2.12 Potencial biotecnológico de leveduras..... | 26 |
| 2.12.1 Enzimas..... | 26 |
| 2.12.2 Toxinas “killer”..... | 28 |
| 2.12.3 Outras substâncias bioativas..... | 30 |
| 2.13 Informações preliminares sobre leveduras isoladas de bromélias no Parque de Itapuã, Viamão – RS..... | 30 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 32 |
| 3.1 Locais de amostragem..... | 32 |
| 3.2 Plantas amostradas..... | 32 |
| 3.3 Coleta, isolamento e conservação dos isolados de bromélias..... | 32 |
| 3.3.1 A partir do filoplano, flores ou de tanques de bromélias..... | 32 |
| 3.3.2 A partir da parte interna das folhas (leveduras endofíticas)..... | 34 |
| 3.4 Caracterização molecular..... | 35 |
| 3.4.1 Extração de DNA genômico total..... | 35 |
| 3.4.2 Seqüenciamento das regiões D1/D2 do LSU rDNA e ITS..... | 35 |
| 3.4.3 Determinação de polimorfismo de regiões de mini e microsatélite (MSP-PCR)..... | 37 |
| 3.5 Caracterização convencional das prováveis espécies novas de leveduras.... | 38 |
| 3.5.1 Características macromorfológicas - Morfologia colonial..... | 38 |
| 3.5.2 Características micromorfológicas..... | 38 |
| 3.5.2.1 Morfologia celular..... | 38 |
| 3.5.2.2 Formação de ascosporos | 39 |
| 3.5.2.3 Formação de hifas e pseudohifas..... | 39 |
| 3.5.3 Testes bioquímicos/fisiológicos..... | 39 |
| 3.5.3.1 Testes de fermentação..... | 39 |
| 3.5.3.2 Assimilação de fontes de carbono..... | 40 |
| 3.5.3.3 Assimilação de fontes de nitrogênio..... | 41 |
| 3.5.3.4 Teste de Urease e Diazônio Azul B (DBB)..... | 42 |
| 3.5.3.5 Crescimento em diferentes temperaturas..... | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5.3.6 Teste de tolerância ao NaCl 10% e 16%..... | 43 |
| 3.5.3.7 Teste de tolerância à glicose 50%..... | 43 |
| 3.5.3.8 Produção de compostos amilóides..... | 44 |
| 3.6 Perfil enzimático..... | 44 |
| 3.6.1 Lipase/Esterase..... | 45 |
| 3.6.1.1 Hidrólise de azeite de oliva..... | 45 |
| 3.6.1.2 Hidrólise de Tween 80..... | 45 |
| 3.6.2 Polissacarases..... | 46 |
| 3.6.2.1 Amilase..... | 46 |
| 3.6.2.2 Celulase..... | 46 |
| 3.6.3 Protease..... | 47 |
| 3.6.3.1 Hidrólise de caseína..... | 47 |
| 3.6.4 Pectinase..... | 47 |
| 3.7 Determinação do índice de Shannon-Weaver e curva de rarefação..... | 47 |
| 3.8 Listagem dos meios de cultura utilizados..... | 48 |
| 4. CAPÍTULO 1: <i>Farysizyma</i> gen. nov., an anamorphic genus in the Ustilaginales to accommodate three novel epiphytic basidiomycetous yeast species from America, Europe and Asia..... | 49 |
| 4.1 Abstract..... | 50 |
| 4.2 Introduction..... | 50 |
| 4.3 Materials and methods..... | 51 |
| 4.3.1 Sample collection and yeast isolation..... | 51 |
| 4.3.2 Phenotypic identification of isolates..... | 51 |
| 4.3.3 Microsatellite-PCR fingerprinting..... | 51 |
| 4.3.4 DNA sequence analysis..... | 51 |
| 4.4 Results and discussion..... | 52 |
| 4.4.1 Latin diagnosis of <i>Farysizyma</i> A. Fonseca gen. nov. | 56 |
| 4.4.2 Description of <i>Farysizyma</i> A. Fonseca gen. nov. | 56 |
| 4.4.3 <i>Farysizyma acheniorum</i> (Buhagiar & J.A.Barnett) Á. Fonseca, comb. nov.. | 57 |
| 4.4.4 Latin diagnosis of <i>F. itapuensis</i> M.F.Landell & P.Valente sp. nov..... | 57 |
| 4.4.5 Description of <i>F. itapuensis</i> M.F. Landell & P. Valente sp. nov..... | 57 |
| 4.4.6 Latin diagnosis of <i>F. taiwaniana</i> P.-H.Wang, & S.-H.Yang sp. nov..... | 57 |
| 4.4.7 Description of <i>F. taiwaniana</i> P.-H. Wang, & S.-H. Yang sp. nov..... | 57 |
| 4.4.8 Latin diagnosis of <i>F. setubalensis</i> Á. Fonseca & J.Inácio sp. nov..... | 58 |
| 4.4.9 Description of <i>F. setubalensis</i> Á. Fonseca & J. Inácio sp. nov..... | 58 |
| 4.5 Acknowledgements..... | 58 |
| 4.6 References..... | 58 |
| 5. CAPÍTULO 2: <i>Cryptococcus bromeliarum</i> sp. nov., an orange coloured basidiomycetous yeast isolated from bromeliads in Brazil. | 60 |
| 5.1 Description of <i>C. bromeliarum</i> M.F. Landell & P. Valente sp. nov..... | 62 |
| 5.2 Latin diagnosis of <i>C. bromeliarum</i> M F. Landell et P.Valente sp. nov..... | 63 |
| 5.3 Acknowledgements..... | 64 |
| 5.4 References..... | 64 |
| 6. CAPÍTULO 3: <i>Candida aechmeae</i> sp. nov. and <i>Candida vrieseae</i> sp. nov., two new yeast species isolated from the phylloplane of bromeliads in Southern Brazil. | 65 |
| 6.1 Summary..... | 67 |
| 6.2 Introduction..... | 68 |
| 6.3 Materials and methods..... | 68 |
| 6.4 Results and discussion..... | 70 |

| | |
|--|-----|
| 6.4.1 Latin diagnosis of <i>C. aechmeae</i> sp. nov. M.F. Landell and P. Valente..... | 71 |
| 6.4.2 Description <i>C. aechmeae</i> sp. nov. M.F. Landell and P. Valente..... | 72 |
| 6.4.3 Latin diagnosis of <i>C. vrieseae</i> sp. nov. M.F. Landell and P. Valente..... | 73 |
| 6.4.4 Description <i>C. vrieseae</i> sp. nov. M.F. Landell and P. Valente..... | 74 |
| 6.5 Acknowledgements..... | 75 |
| 6.6 References..... | 75 |
| 7. CAPÍTULO 4: <i>Rhodotorula chungwhensis</i> sp. nov., a novel member of the order Cystobasidiales. | 81 |
| 7.1 Summary..... | 83 |
| 7.2 Introduction..... | 84 |
| 7.3 Materials and methods..... | 85 |
| 7.4 Results and discussion..... | 88 |
| 7.4.1 Latin diagnosis of <i>Rhodotorula chungwhensis</i> Shin, Valente & Landell sp. nov. | 93 |
| 7.4.2 Description of <i>R. chungwhensis</i> Shin, Valente & Landell sp. nov..... | 95 |
| 7.5 Acknowledgements..... | 97 |
| 7.6 References..... | 98 |
| 8. CAPÍTULO 5: Comunidade e perfil enzimático de leveduras associadas a bromélias. | 108 |
| 8.1 Comunidade de leveduras associadas a bromélias..... | 108 |
| 8.1.1 Taxonomia molecular de leveduras..... | 108 |
| 8.1.1.1 Filo Ascomycota..... | 108 |
| 8.1.1.1.1 Subfilo Saccharomycotina..... | 114 |
| 8.1.1.1.2 Subfilo Taphrinomycotina..... | 114 |
| 8.1.1.2 Filo Basidiomycota..... | 114 |
| 8.1.1.2.1 Subfilo Pucciniomycotina..... | 114 |
| 8.1.1.2.2 Subfilo Ustilaginomycotina..... | 115 |
| 8.1.1.2.3 Subfilo Agaricomycotina..... | 116 |
| 8.2 Diversidade de leveduras..... | 117 |
| 8.3 Perfil enzimático..... | 124 |
| 9. DISCUSSÃO | 131 |
| 9.1 Comunidade de leveduras associadas a bromélias..... | 131 |
| 9.2 Diversidade de leveduras..... | 136 |
| 9.3 Perfil enzimático..... | 139 |
| 10. CONCLUSÕES | 144 |
| 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 146 |
| 12. ANEXOS | 162 |
| 13. VITA | 167 |

RELAÇÃO DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|-----|
| Tabela 1: | Listagem com a identificação das espécies de leveduras e as espécies de bromélias de onde foram isoladas..... | 109 |
| Tabela 2: | Freqüência dos isolados obtidos de cada ponto de coleta amostrado (Praia da Pedreira e Praia de Fora)..... | 118 |
| Tabela 3: | Perfil enzimático das leveduras isoladas de bromélias..... | 125 |

RELAÇÃO DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|-----|
| Figura 1: | Filogenia e classificação do Filo Ascomycota..... | 22 |
| Figura 2: | Filogenia e classificação do Filo Basidiomycota..... | 24 |
| Figura 3: | Curva de rarefação de espécies diferentes de leveduras com o aumento do número de amostras..... | 122 |
| Figura 4: | Percentual de produção das enzimas por leveduras isoladas de bromélias..... | 129 |
| Figura 5: | Distribuição da produção das enzimas pelos diferentes grupos taxonômicos..... | 129 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection

CBiot: Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul

CBS: Centralbureau voor Schimmelcultures, Holanda

cm: Centímetro

DBB: diazonium blue B

DNA: Ácido desoxirribonucléico

ITS: Espaçador interno transcrito

mL: Mililitro

µL: Microlitro

NRRL: Coleção de culturas ARS, National Center for Agricultural Utilization Research, USA

pH: Logaritmo decimal do inverso da atividade de íons hidrogênio em uma solução

RNA: Ácido ribonucléico

s: segundo (segundos)

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

Tween 20: Polioxietileno Sorbitan Monolaurato

Tween 80: Polioxietileno-20-sorbitan monooleato

ULBRA: Universidade Luterana do Brasil

1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é uma das florestas mais ricas quanto a diversidade de organismos e, ao mesmo tempo, uma das mais ameaçadas, existindo inúmeras espécies, tanto no macroambiente como também em microambientes, que nunca foram catalogadas. Atualmente, o corte e desmatamento ilegal, a especulação imobiliária e a poluição ambiental são os principais fatores responsáveis pela extinção, que se iniciou com a extração do pau-brasil no ano de 1500. O nosso país, apesar de apresentar uma grande biodiversidade, possui poucas espécies novas de leveduras descritas e no que se refere à região sul, são praticamente inexistentes.

O Parque de Itapuã é um dos poucos locais onde a Mata Atlântica ainda é preservada na região metropolitana de Porto Alegre. Há uma grande diversidade de espécies de bromélias e estas por sua vez, acumulam água em seus tanques e em suas folhas. Elas são plantas endêmicas de Mata Atlântica e suas folhas e reservatórios de água (tanques) são ricos em nutrientes, tendo demonstrado portar uma larga diversidade de organismos graças à sua complexa estrutura trófica. Microrganismos podem ser encontrados em associação com diferentes partes das plantas, incluindo filoplano e tanques, por exemplo.

Sabe-se que leveduras e outros microrganismos têm interações saprofíticas com as plantas por estas apresentarem um grande número de nutrientes disponíveis, sejam oriundos da própria folha ou de outras fontes, que acumulam-se na superfície pela ação do vento, chuva, insetos, etc. Apesar da presença de leveduras associadas ao filoplano não ser um fato novo, pouco se sabe a respeito de sua interação com bromélias tanto quanto ao aspecto taxonômico e ecológico quanto ao seu potencial biotecnológico, fazendo-se necessário maiores estudos.

Baseado no exposto acima, este trabalho teve como objetivos:

- Analisar a diversidade de leveduras em uma área de Mata Atlântica (Parque de Itapuã) no estado do Rio Grande do Sul.
- Selecionar e descrever linhagens que representem possíveis espécies novas.
- Verificar a produção de enzimas extracelulares pelas leveduras isoladas e selecionar linhagens com boa produção.

Os resultados obtidos estão apresentados sob a forma de artigos preparados para publicação ou já publicados, cada um no formato exigido pela revista ao qual foram ou serão submetidos, denominados "Capítulos".

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mata Atlântica: modelo de diversidade

A Mata Atlântica está presente tanto na região de planaltos e serras do interior como na região litorânea, que vai do Rio Grande do Sul ao Rio Grande do Norte. Ao longo de toda a costa do Brasil, a sua extensão varia muito. Na chegada dos portugueses, em 1500, essa floresta se estendia contínua por mais de 1.300.000 km², ou cerca de 15% do território nacional, englobando 17 estados brasileiros. Apesar de toda essa área, cerca de 93% de sua formação original já foi devastada (Fundação SOS Mata Atlântica, 2009).

A definição de Mata Atlântica foi baseada em critérios botânicos e fitofisionômicos, juntamente com a natureza geológica e geográfica e, ainda, considerando as questões relativas à conservação ambiental. Esta definição foi posteriormente aprimorada e submetida ao Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, que a aprovou em 1992, estabelecendo o conceito de Domínio da Mata Atlântica. Desta forma, passaram a ter a denominação genérica de Mata Atlântica as áreas primitivamente ocupadas pelas formações vegetais constantes no Mapa de Vegetação do Brasil (IBGE, 1992). Sua região de ocorrência original abrangia integralmente ou parcialmente, dezessete estados do Brasil, do Piauí ao Rio Grande do Sul (Fundação SOS Mata Atlântica, 2009).

A destruição da Mata Atlântica começou com a chegada dos portugueses no ano de 1500. Embora anteriormente ocupada por grupos indígenas numerosos, como por exemplo os Tupinambás, que já praticavam a agricultura, os relatos da época não registram qualquer sinal de destruição da cobertura florestal. Segundo Holanda (1995), as descrições são de uma floresta intocada, de enorme riqueza natural.

Segundo Dean (1996), antes mesmo da exploração do ouro e das pedras preciosas, a existência de grandes quantidades de pau-brasil fez com que os arrendatários das terras assumissem a exploração enviando navios às costas brasileiras. O monopólio de exploração do pau-brasil só terminou em 1859. Contabilizaram-se mais de três séculos de extração predatória.

No entanto, sabe-se que essa exploração predatória não se limitou apenas à árvore do pau-brasil. Diversas madeiras de alto valor para a fabricação de móveis, construção naval, edificações e outras de uso nobre como canela, canjarana, jacarandá, araribá, pequi, peroba e urucurana, foram intensamente exploradas. A maioria das matas consideradas "primárias" e hoje colocadas sob a proteção das unidades de conservação foram destruídas já há dois séculos (Dean, 1996).

A Mata Atlântica sobrevive em apenas cerca de 7% do território que antes ocupava. Seus principais remanescentes localizam-se nos estados das regiões Sudeste e Sul, cobrindo parte da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira (Silva & Gomes, 2003; Simões & Lino, 2003).

Considerada como um dos mais ricos conjuntos de ecossistemas em termos de diversidade biológica do Planeta, a Mata Atlântica é composta de

uma série de paisagens bastante diversificadas, o que proporcionou uma diversificação ambiental muito significativa.

Em um país onde a biodiversidade é considerada a maior do planeta, há espécies que podem ter sido extintas antes mesmo de serem catalogadas e outras que, ao serem descobertas acabam entrando rapidamente para a lista das ameaçadas de extinção. Esta diversidade está relacionada à grande extensão territorial, juntamente com a diversidade geomorfológica e climática. O estudo e a identificação de espécies relacionadas, juntamente com a proteção, são as maiores garantias para estas áreas, evitando assim o que ocorreu onde a floresta já foi eliminada (Giullietti, 1992).

2.2 Parque de Itapuã

O Parque de Itapuã, entre os parques estaduais do Rio Grande do Sul, é o que apresenta a maior diversidade de ecossistemas, abrigando um número significativo de espécies raras e ameaçadas de extinção, o que o coloca numa posição privilegiada quanto à preservação ambiental, sendo uma importante unidade de conservação no estado. Está localizado no município de Viamão, Rio Grande do Sul, a 57Km de Porto Alegre (coordenadas aprox. 50º 50' e 51º 05' W e 30º 20' e 30º 27' S) e conta com uma área de 5.566 ha. Foi criado em 1973 e reaberto em 2002 para visitação de alguns pontos após mais de 10 anos fechado para que pudesse haver a recuperação da área, pois era uma região onde ocorria extração de granito e ocupação urbana desordenada. Abriga um número significativo de bromeliáceas (Rio Grande do Sul, 1997).

2.3 Bromélias: modelo de planta tropical

A família Bromeliaceae compreende plantas tipicamente tropicais e abundantes em ambientes de Mata Atlântica, que é considerada um dos centros de maior diversidade desta família, estimando-se 40% das espécies e 80% dos gêneros descritos, sendo que destes, 22% são restritos ao território brasileiro (Forzza, 2001, 2005). Elas sustentam um grande número de seres vivos que vão desde microrganismos até mamíferos, como mico-leão dourado e anfíbios, como algumas espécies de pererecas. As bromélias são plantas vasculares que contam atualmente com 56 gêneros e cerca de 3.086 espécies (Nunes, 2003; Luther, 2006). Existem representantes terrestres, rupícolas ou epífitas. As raízes servem, geralmente, apenas para fixação no caso das epífitas e, além da fixação, atuam na absorção de água e nutrientes nas terrestres. As folhas são espiraladas com bainhas amplas e flexíveis, que freqüentemente formam um recipiente no qual se acumulam água e detritos orgânicos (tanques), que podem ser ricos em microrganismos (Leme, 1984). Nos três tipos, sempre em maior ou menor quantidade, há a absorção de nutrientes pelos tricomas foliares, característica da família.

Três subfamílias são tradicionalmente aceitas em Bromeliaceae (Smith & Downs, 1979): Bromelioideae, Tillandsioideae e Pitcairnioideae, porém apenas as duas primeiras são monofiléticas (Horres *et al.* 2000). Baseando-se nas hipóteses filogenéticas obtidas, Givinish *et al.* (2007) propuseram uma nova divisão para a família onde os diferentes clados referentes às antigas Pitcairnioideae, são tratados com novas subfamílias e, assim, Bromeliaceae passa a ter então oito subfamílias: Brocchinioideae, Bromelioideae,

Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae.

Além da importância quanto ao papel ecológico, a importância econômica da família é destacada pelo uso como plantas ornamentais, sendo atualmente muito cultivadas e utilizadas em decorações de interior e projetos paisagísticos. Dessa maneira, a extração destas plantas de seus ambientes naturais coloca algumas espécies na lista de espécies ameaçadas. Várias espécies têm sido cultivadas comercialmente com as mais variadas finalidades. Pode-se destacar o fruto abacaxi (*Ananas comosus*), apreciado na alimentação, produção de bebidas e doces. Outra espécie de valor econômico é *Neoglaziovia variegata*, utilizada como produtora de fibras. Na medicina, tem-se o uso da enzima “bromelina”, presente em algumas espécies do gênero *Bromelia* (Moreira *et al.*, 2006). A escolha dessa planta para o presente trabalho foi devido ao fato de serem encontradas em grande número, de serem típicas de habitats de Mata Atlântica e possuírem uma importante cadeia trófica.

2.4 Leveduras

Leveduras são microrganismos integrantes do reino *Fungi*, possuindo características típicas dos fungos como presença de parede celular rígida, núcleo organizado com membrana nuclear, aclorofilados, nutrição heterotrófica por meio de absorção dos nutrientes, reprodução sexuada por meio de células especializadas denominadas esporos e ausência de motilidade. Elas se diferenciam dos demais fungos por possuírem um talo que é

predominantemente unicelular, realizarem a reprodução assexuada por brotamento ou fissão e não formarem corpos de frutificação (Kurtzman & Fell, 1998). Elas compreendem representantes dos Filos Ascomycota (leveduras ascomicéticas) e Basidiomycota (leveduras basidiomicéticas). Além das estruturas sexuadas (ascos nas ascomicéticas e basídios nas basidiomicéticas), outras características, fisiológicas, bioquímicas e moleculares, permitem a distinção entre leveduras dos dois grupos. Estas características são importantes na classificação de gêneros anamórficos, nos quais não se conhece a fase sexuada do respectivo ciclo de vida. As leveduras são encontradas em folhas, frutos, flores, grãos de cereais e outros substratos contendo açúcares. Mas também podem ser isoladas do ar, do solo, de águas de lagos, rios e mares; da pele e do intestino de animais, incluindo associações com insetos (Do Carmo-Souza, 1969; Lachance *et al.*, 2001, 2003; Rosa *et al.*, 2003; Pimentel *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2007; Fuentefria *et al.*, 2008).

2.5 Leveduras no filoplano

A superfície das plantas (filoplano) é considerada um habitat importante principalmente para uma grande variedade de espécies de leveduras, sendo que estas, juntamente com os fungos filamentosos, constituem o maior grupo da microbiota do filoplano (Andrews & Harris, 2000; Inácio *et al.*, 2002; 2005).

Esse tipo de associação pode ser dividida em transiente (inespecífica ou saprófitas epifítico efêmeros) ou permanente (epifíticos residentes, endofíticos ou patógenos). Durante muito tempo, a interação de microrganismos saprófitas

foi deixada de lado, devido ao interesse econômico em estudar fungos fitopatógenos e seus impactos na agricultura. Entretanto, nas últimas décadas, o interesse na microbiota saprofítica foi renovado, visto que esses parecem desempenhar um papel crucial na ciclagem de nutrientes e controle do tamanho da população que habita esse substrato (Fonseca & Inácio, 2006).

As bactérias são, geralmente, as primeiras colonizadoras do filopano, quando as condições ambientais como umidade e disponibilidade de água são favoráveis. As leveduras juntamente com o fungo dimórfico *Aureobasidium pullulans* parecem colonizar o filopano mais ativamente (Andrews & Harris, 2000; Fonseca & Inácio, 2006).

Os nutrientes que estão disponíveis no filopano, servindo de base ao desenvolvimento das populações de leveduras que ali colonizam, podem resultar de secreções das próprias folhas, naturais ou provenientes de feridas na cutícula (Tukey, 1971), ou de deposições pelo vento ou carreamento por insetos e outros organismos (Andrews & Harris, 2000). A espécie da planta e todo o ambiente físico/químico que a envolve condicionam as qualidades deste substrato e, assim, a biodiversidade das populações que aí se desenvolvem.

Boa parte das espécies de leveduras basidiomicéticas possui um potencial assimilativo amplo com relação às fontes de carbono quando comparada com as leveduras ascomicéticas, que se restringem a poucas fontes de carbono (Kurtzman & Fell, 1998). Além disso, algumas espécies apresentam características que favorecem a sua permanência no filopano, tais como produção de clamidósporos resistentes à dessecação, de balistosporos, cápsula mucóide, pigmentos carotenóides que auxiliam na proteção à luz solar.

Leveduras ascomicéticas são freqüentemente encontradas em substratos ou fontes ricas em açúcares simples, como frutos e seus insetos vetores, enquanto que as leveduras basidiomicéticas são ricamente encontradas em substratos que possuam componentes mais complexos, como folhas e solo (Santos *et al.*, 1996).

Os gêneros de leveduras basidiomicéticas mais comumente encontrados em associação ao filoplano são *Bensingtonia*, *Bullera*, *Cryptococcus*, *Erythrobasidium*, *Kockovaella*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces/Sporidiobolus* e de leveduras ascomicéticas são os gêneros *Candida*, *Debaryomyces* e *Taphrina* (Fonseca & Inácio, 2006). As leveduras ascomicéticas, embora sejam importantes colonizadoras do filoplano, são mais frequentemente isoladas a partir de outras partes das plantas, como as flores e os frutos (Phaff & Starmer, 1987).

A maioria das leveduras de afinidade ascomicética são mais tolerantes a ambientes extremos, por isso em habitats hipersalinos, mares e oceanos, com altas concentrações de açúcar (p.e. mel, flores) e ambientes ácidos, entre outros, a predominância será de leveduras ascomicéticas (Silva, 2003). As exceções seriam algumas espécies dos gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula*.

Silva (2003), estudando a ocorrência de leveduras no filoplano de diversas plantas, com metodologia para o isolamento a técnica de lavagens das folhas, observou uma predominância de leveduras basidiomicéticas (cerca de 90%). Entretanto, Fuentesfria (2004) estudou o filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*, com a técnica de *imprinting* para o isolamento das leveduras, encontrando uma variedade de espécies, com predominância de leveduras

ascomicéticas. Um aspecto que talvez pudesse justificar essa diferença encontrada poderia ser as diferentes metodologias de isolamento utilizadas nos dois trabalhos.

2.6 Presença de leveduras em bromélias

Araújo *et al.* (1998) encontraram na comunidade de leveduras do tanque de bromélias no Rio de Janeiro expostas à luz solar intensa uma predominância de leveduras com afinidade basidiomicética, enquanto que leveduras ascomicéticas foram prevalentes em bromélias localizadas na sombra.

Hagler *et al.* (1993) estudando a comunidade de leveduras e coliformes presentes no tanque de bromélias no Rio de Janeiro, encontraram em associação com *Neoregelia cruenta*, predominância de leveduras basidiomicéticas e do fungo dimórfico *Aureobasidium pullulans*. A bromélia *Quesnelia quesneliana* apresentou predominância de leveduras ascomicéticas.

Valente (2000) estudando leveduras isoladas a partir do filoplano de bromélias, também no Rio de Janeiro, por meio de identificação convencional e molecular, verificou a predominância de leveduras basidiomicéticas (54,6%), incluindo uma espécie de levedura não descrita, fenotipicamente similar a *Candida tenuis*.

Ruivo *et al.* (2005) descreveram duas espécies novas de leveduras, *Candida bromeliacearum* e *Candida ubatubensis*, isoladas a partir da água do

tanque da espécie de bromélia *Canistropsis seidelii* em ecossistema de restinga no sudeste do Brasil.

Embora estudos de leveduras em bromélias já sejam desenvolvidos há mais de uma década, pesquisas que envolvam a diversidade de leveduras associadas ao filoplano e a aplicação biotecnológica desses isolados ainda são uma novidade. Nenhum dos trabalhos citados anteriormente foi realizado na região sul do Brasil, enfatizando a importância do presente trabalho.

2.7 Taxonomia convencional de leveduras

Os métodos convencionais para caracterização taxonômica de leveduras são baseados em testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos, incluindo fermentação de diferentes açúcares, assimilação de diversas fontes de carbono e de nitrogênio, crescimento em diferentes temperaturas, sensibilidade à cicloheximida, urease e reação ao corante diazônio azul B (DBB), entre outros (Barnett *et al.*, 2000). Entretanto, a taxonomia convencional de leveduras nem sempre alcança uma identificação correta, muitas vezes não representando as relações filogenéticas entre diferentes grupos. Porém, deve ser utilizada em conjunto com os métodos moleculares, como por exemplo o seqüenciamento de genes conservados, no que é denominado Taxonomia Polifásica.

Além de todas as aplicações tecnológicas que podem surgir a partir de estudo de diversidade de leveduras, é importante ressaltar a grande carência de estudos focando diversidade, relacionando à ecologia, à biogeografia, à genética e à biologia de populações, principalmente em ambientes naturais.

O número de espécies de leveduras descritas até 1998 era de aproximadamente 700 (Kurtzman & Fell, 1998). Acredita-se que o número de espécies de leveduras reconhecidas pela comunidade científica deve se aproximar muito de 1200, e esse número pode representar apenas cerca de 1% de espécies na natureza (Mahdi *et al.*, 2008). Existe uma urgência na realização de estudos científicos da biodiversidade, visto que apenas uma pequena fração do total da diversidade da vida é conhecido e que a extinção de espécies está crescendo rapidamente (Lachance, 2006).

2.8 Taxonomia molecular de leveduras

Métodos moleculares vêm sendo cada vez mais usados como uma importante ferramenta auxiliar na identificação de leveduras, principalmente de espécies com difícil visualização de características micromorfológicas essenciais para identificação (Boundy-Mills, 2006). Além disso, é uma ferramenta indispensável na análise filogenética de leveduras (Kurtzman & Robnett, 1998).

Um dos primeiros métodos utilizado para o estudo da taxonomia de leveduras foi a determinação do conteúdo de GC (bases guanina-citosina) do DNA. Nesse caso, embora estudos recentes mostrem que a diferença de 1% no conteúdo de GC pode ser considerada um indicativo de que dois isolados pertençam a espécies diferentes, costuma-se aceitar 2% como valor básico (Gueho *et al.*, 1992; Silva, 2003). Este método tem a vantagem de não necessitar de amplificação por PCR, mas necessita de grandes quantidades de DNA (Boundy-Mills, 2006)

A hibridização DNA-DNA também tem sido utilizada, mas sua resolução é limitada para espécies irmãs e o resultado não pode ser usado diretamente para comparação com outras taxa em estudos posteriores (Valente *et al.*, 1999). Nesse caso, 70% de similaridade em ensaios de hibridização de DNA-DNA indica que dois isolados pertencem à mesma espécie (Poncet *et al.*, 1984; Vaughan-Martini *et al.*, 2000).

O rDNA é muito empregado em estudos taxonômicos devido à presença de regiões codificantes e não-codificantes, que evoluem em diferentes taxa, e também pelo fato de estar presente em todos os organismos, a partir de uma origem evolutiva comum (Valente *et al.*, 1999). A região gênica do rDNA possui as seguintes estruturas na disposição 5'-3': a região espaçadora externa (ETS), o gene 18S (SSU - small-subunit), a região espaçadora interna (ITS1), o gene 5.8S, uma segunda região espaçadora interna (ITS2) e o gene 26S (LSU - large-subunit). Este último gene apresenta as seqüências menos conservadas, em relação aos genes 18S e 5.8S e 5S, sendo a região de escolha para estudos de filogenia de espécies e grupos taxonômicos mais relacionados (Hamamoto *et al.*, 2002). A região D1/D2 do LSU rDNA de grande parte das leveduras conhecidas encontra-se seqüenciada e observou-se que essa região é capaz de diferenciar quase todas as espécies de leveduras testadas, visando estudos de taxonomia. A seqüência da região ITS muitas vezes também é utilizada nesse tipo de estudo, como complemento à análise da região D1/D2 do LSU rDNA, pois algumas espécies de leveduras apresentam esta última muito semelhante ou até mesmo idêntica (Kurtzman & Robnett, 1998; Valente *et al.*, 1999; Fell *et al.*, 2000; Silva, 2003).

A região ITS em geral é mais variável que a região D1/D2, no entanto também ocorrem algumas exceções (Scorzetti *et al.*, 2002) como nos casos das espécies do complexo que inclui *Sporidiobolus pararoseus* e *Trichosporon laibachii* / *T. multisporum*, sendo que essas duas últimas espécies apresentam seqüências de ITS idênticas e sete bases diferentes na região D1/D2 (Bai *et al.*, 2002).

Fell *et al.* (2000), estudando a sistemática molecular de leveduras basidiomicéticas, viram que a maioria das espécies pode ser identificada usando a análise da região D1/D2, entretanto, a região ITS teve que ser utilizada para distinguir espécies intimamente relacionadas, sendo essa região recomendada como ferramenta adicional na diferenciação de espécies e linhagens de leveduras com afinidade basidiomicética.

Scorzetti *et al.* (2002) confirmam que a combinação das análises das seqüências das regiões D1/D2 e ITS é recomendada para identificação de espécies, enquanto que para a definição de espécies é necessário ainda informações biológicas clássicas, como caracterização fenotípica e ciclo de vida.

Além dessas regiões transcritas, espaçadores intergênicos (NTS ou IGS) que separam as cópias *em tandem* do rDNA nos cromossomos e que não são transcritos também podem ser utilizados (Valente *et al.* 1999; Silva, 2003).

Embora o sequenciamento, como explicado acima, seja considerado o método ideal para a identificação de leveduras, sua aplicação em trabalhos nos quais há um grande número de isolados, como os de Ecologia Microbiana, é inviável. Diversos métodos de genotipagem têm sido propostos como

ferramentas iniciais nos protocolos de identificação, visando o agrupamento dos isolados obtidos e a seleção de representantes de cada grupo para posterior identificação via sequenciamento. Muitos desses trabalhos lidam com ecologia de leveduras na produção de bebidas fermentadas e outros alimentos, mas alguns abordam a ecologia em ambientes naturais (Gadanhó *et al.*, 2003; Suezawa *et al.*, 2008).

As técnicas de fingerprinting como, por exemplo, o Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (Random primer amplification polymorphic DNA - RAPD) também podem ser utilizadas na taxonomia de leveduras. Essa técnica consiste na amplificação com uso de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) de seqüências curtas e arbitrárias que se anelam ao DNA-molde, produzindo um perfil de fragmentos típico para a linhagem ou a espécie, dependendo do oligonucleotídeo escolhido (Mehta *et al.*, 2002). Nesse caso, os dados devem ser tabulados e uma matriz de similaridade deve ser calculada para a posterior construção de dendrogramas.

A técnica de Polimorfismo pelo tamanho dos fragmentos amplificados (Amplified fragment length polymorphism - AFLP) se baseia na restrição enzimática do DNA genômico, ligação de adaptadores a alguns dos fragmentos gerados e amplificação por PCR dos fragmentos que possuam adaptadores. Os fragmentos são separados por eletroforese, sendo que os padrões gerados possuem poder discriminatório para diferenciação de linhagens ou de espécies (Barros-Lopes *et al.*, 1999; Flores-Barríos *et al.*, 2005). Esta técnica não é muito difundida por causa do custo associado à aquisição dos adaptadores, o que torna o seu uso restrito em trabalhos de ecologia microbiana, porém tem

sido bastante utilizada em programas de melhoramento genético de plantas e animais (Marques *et al.*, 2002) e em isolados clínicos (Barreto de Oliveira *et al.*, 2004; Litvintseva, *et al.*, 2005).

O Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (Restriction fragment length polymorphism – RFLP) pode ser utilizado da mesma forma que RAPD e AFLP. Esta técnica consiste na clivagem com enzimas de restrição de amostras de DNA e separação dos produtos de clivagem por eletroforese (Carvalho *et al.*, 2005; Boundy-Mills, 2006). Entretanto, essa técnica pode ser aplicada a seqüências específicas, previamente amplificadas por PCR, permitindo uma melhor análise. O padrão de RFLP do DNA mitocondrial (mtDNA) ou somente parte (mtSSU rDNA) dele tem sido utilizado (Yamamoto *et al.*, 1995), permitindo uma distinção de subespécies. Segundo Gené *et al.* (1996), essa técnica pode ser aplicada para o entendimento das relações entre anamorfos e teleomorfos. Uma das técnicas mais utilizadas para agrupamento genotípico de isolados é a análise do polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) de amplicons correspondentes às regiões ITS e D1/D2. A maioria dos trabalhos que utiliza essa abordagem é feita com leveduras isoladas de processos fermentativos, sendo realizado o RFLP do amplicon referente à região ITS e posterior comparação dos resultados obtidos com um banco de dados de leveduras normalmente isoladas daquele tipo de substrato (Carvalho *et al.*, 2005). Nos casos em que a identificação com a utilização direta do padrão de RFLP não é possível, representantes dos padrões não identificados são selecionados para sequenciamento da região D1/D2 (Granchi *et al.*, 1999; Martorell *et al.*, 2005; Coton *et al.*, 2006). Baleiras-Couto *et al.* (2005) utilizaram

RFLP da região D1/D2 para agrupar as leveduras isoladas de fermentação de vinho tinto, obtendo 19 perfis diferentes. Representantes de cada um desses perfis tiveram a região D1/D2 sequenciada, visando a sua identificação.

Uma variação do RFLP, a Análise de restrição de DNA ribossômico amplificado (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis - ARDRA), tem sido utilizada. Esta técnica está baseada em padrões de restrição enzimática do rDNA, por este ser universalmente distribuído e com alto grau de conservação, sendo o mais adequado para estudo de diversidade e análises filogenéticas de procariotos e eucariotos (Massol-Deya *et al.*, 1995; Reis Junior *et al.*, 2004).

Outra metodologia que pode ser utilizada é a eletroforese em campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE), que consiste na migração dos cromossomos em gel de agarose submetido a um campo elétrico de diferentes direções, embora a alta variabilidade intra-específica possa resultar em dificuldades para a taxonomia de leveduras. A utilização da técnica, aliada à hibridização de sondas obtidas de genes conservados, pode facilitar a identificação de espécies e caracterizar o polimorfismo cromossômico em determinados grupos (Marques *et al.*, 2002).

A utilização da análise de polimorfismo de micro e mini-satélites (Microsatellite – primed – MSP-PCR) está baseada na amplificação de regiões repetitivas que se organizam em tandem no DNA, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para esse fim. Após a reação de PCR, os amplicons são separados em gel de agarose, possibilitando a análise dos resultados. O uso desta técnica para estudos de taxonomia e de diversidade de leveduras tem crescido significativamente, permitindo a caracterização de isolados clínicos e

ambientais de diferentes espécies de fungos (Meyer *et al.*, 1999; Silva, 2003; Lasker & Ran, 2004; Nascimento *et al.*, 2004). Esta técnica, assim como o RFLP e AFLP, tem poder discriminatório para diferenciar linhagens ou espécies, dependendo dos iniciadores utilizados e das bandas analisadas. Vários trabalhos que abordam a identificação molecular de leveduras isoladas de filoplano realizam o agrupamento dos isolados de acordo com o perfil obtido pelo MSP-PCR, com posterior seleção de representantes de cada grupo para sequenciamento da região D1/D2 (Inácio *et al.*, 2002, 2005). Segundo Gadanho (2001), os resultados obtidos por meio desta técnica indicam que este método é apropriado para a caracterização de grandes grupos de isolados por causa de sua simplicidade e boa reprodutibilidade.

Um dos maiores problemas para a avaliação do papel das leveduras em estudos ecológicos é a dificuldade para o conhecimento da sua diversidade. A presença de células de leveduras viáveis mas não cultiváveis têm sido relatada (Divol & Lonvaud-Funel, 2005; Rantsiou *et al.*, 2005), porém essa abordagem ainda não é difundida em estudos de ecologia de leveduras, entre outros motivos, por detectar apenas as espécies dominantes presentes no substrato (Cocolin *et al.*, 2000). A metodologia proposta neste trabalho (isolamento das culturas de leveduras, seguido por sequenciamento das regiões D1/D2 e ITS e em alguns casos, agrupamento dos diferentes perfis genotípicos por MSP-PCR) possui a vantagem de facilitar a identificação mais precisa dos isolados obtidos, além de possibilitar a detecção das espécies raras, devido ao cuidado com o esforço amostral e a caracterização genética da população de leveduras.

Para uma correta identificação utilizando a seqüências de genes conservados, se faz necessária uma base de dados confiável para a comparação das seqüências. Atualmente, para leveduras o GenBank vem sendo utilizado, embora erros decorrentes de informações imprecisas dos depositantes das seqüências possam ser observados.

Todas as características apresentadas por uma levedura, seja fenotípica, genotípica ou de ecologia / diversidade devem ser levadas em conta na hora da definição de uma espécie, principalmente quando não se conhece a fase sexuada do seu ciclo de vida.

2.9 Descrição de espécies novas no Brasil

Trabalhos que estejam focados na descrição de espécies novas estão cada vez mais difundidos fora do nosso país (Fungsin *et al.*, 2001; 2002; Inácio *et al.*, 2002; Bai *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2003; Inácio & Fonseca, 2004; Wang & Bai, 2004; Wang *et al.*, 2004; Knutsen *et al.*, 2008; Fidalgo-Jiménez *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2008; Margesin & Fell, 2008; Satoh & Makimura, 2008; Takashima *et al.*, 2009; Nagatsuka *et al.*, 2009). Trabalhos no Brasil com esse enfoque são recentes e foram principalmente desenvolvidos a partir década de 90 (Rosa *et al.*, 1999; Carreiro *et al.*, 2004; Ruivo *et al.*, 2005; 2006; Rosa *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2009a, 2009b), todos realizados em regiões de Mata Atlântica nas regiões Sudeste e Norte, sendo que em outras regiões são praticamente inexistentes.

A descrição de novas espécies e novos *taxa* de leveduras, juntamente com estudos ecológicos, são necessários para compreender a colonização e

distribuição de leveduras em diferentes ecossistemas e substratos (Morais *et al.*, 2006). Além disso, o isolamento de novas espécies também pode ser considerado um método de preservação dessas espécies, já que eles podem, e devem, ser mantidos em laboratório e enviados para coleções de microrganismos.

2.10 Classificação de leveduras ascomicéticas

Atualmente, o Filo Ascomycota, por meio de análises filogenéticas das sequências de RNA ou DNA ribossômicos de leveduras e fungos filamentosos, está dividido em três subfilos: Pezizomycotina, Saccharomycotina e Taphrinomycotina (Figura 1). O subfilo Pezizomycotina (Euascomycetes), é composto majoritariamente por fungos filamentosos e alguns fungos dimórficos, onde quase todas as espécies produzem corpos de frutificação. Já o subfilo Saccharomycotina (Hemiascomycetes) é um grupo monofilético, que está composto quase que inteiramente por leveduras. Por fim, o subfilo Taphrinomycotina (Arquiascomycetes) é um grupo relativamente heterogêneo, composto por exemplo, pelos gêneros *Taphrina*, *Neolecta*, *Pneumocystis* e *Schizosaccharomyces* (Hibbet *et al.*, 2007).

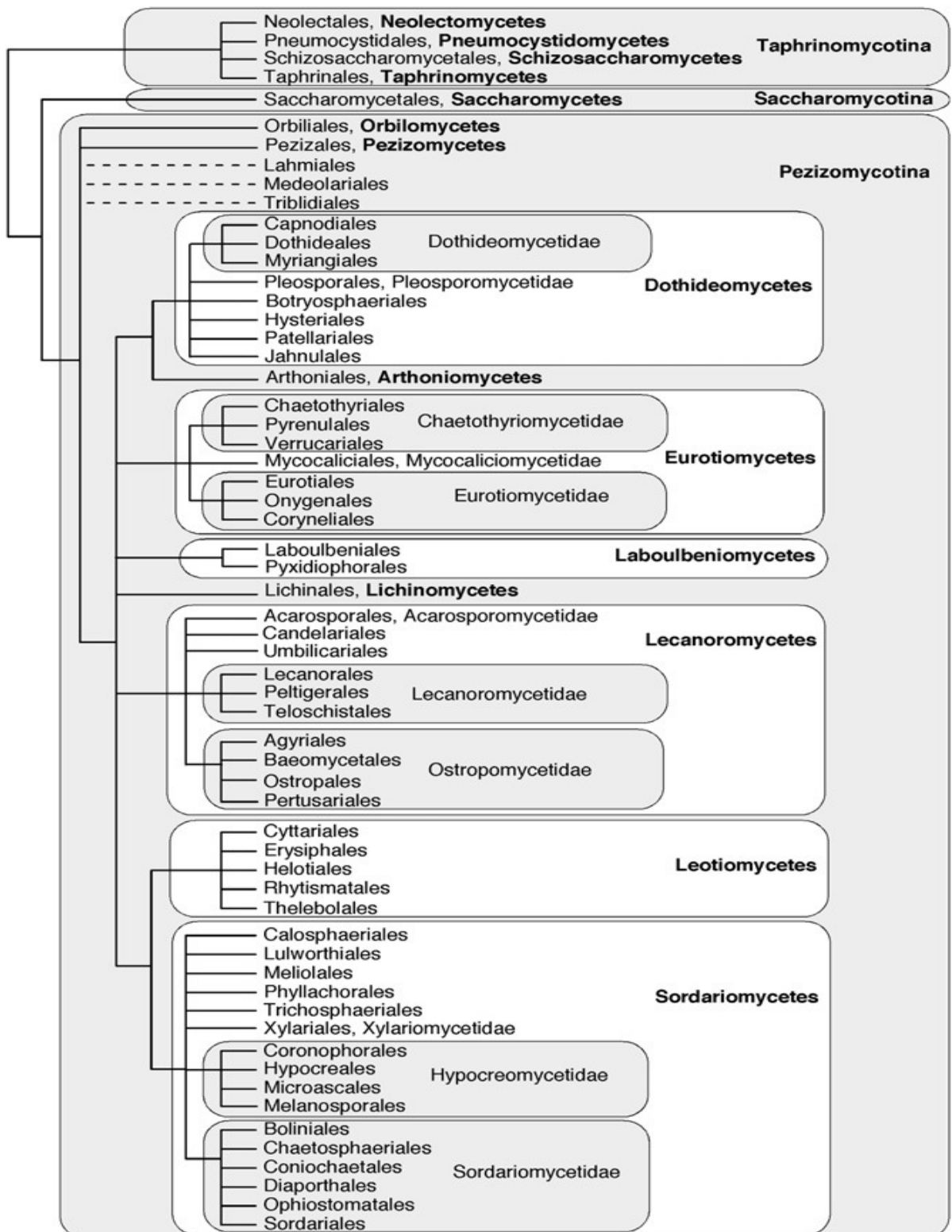


Figura 1: Filogenia e classificação do Filo Ascomycota (Hibbet *et al.*, 2007).

2.11 Classificação de leveduras basidiomicéticas

O filo Basidiomycota está dividido atualmente em três subfilos: Pucciniomycotina (Urediniomycetes), Ustilaginomycotina (Ustilaginomycetes) e Agaricomycotina (Hymenomycetes) (Figura 2) (Hibbet *et al.*, 2007). As leveduras basidiomicéticas fazem parte do grupo mais diversificado do filo (Fell *et al.*, 1992; Guého *et al.*, 1993; Swann & Taylor 1995) e estão presentes nos três subfilos. As leveduras basidiomicéticas são, assim, polifiléticas, apresentando grande heterogeneidade em seus ciclos de vida, entre outras características (Fell *et al.*, 2001).

2.11.1 Pucciniomycotina

O subfilo Pucciniomycotina contém espécies de fungos em que as hifas, quando produzidas, são caracterizadas pela formação de septos com poros simples únicos. As espécies teleomórficas produzem basídios septados transversalmente ou não septados, e as paredes celulares apresentam manose como açúcar mais abundante. Seus membros geralmente não assimilam inositol como fonte de carbono e não produzem compostos amilóides (Fell *et al.*, 2001).

Compreende três classes em que se encontram espécies de leveduras: Agaricostilbomycetes, Cystobasidiomycetes e Microbotryomycetes (Figura 2). A distribuição das leveduras em diferentes grupos reflete a natureza polifilética de muitos dos gêneros, principalmente os anamórficos, cuja classificação foi baseada em características morfológicas e fenotípicas. Por exemplo, espécies pertencentes ao gênero *Rhodotorula* distribuem-se pelas três classes (Silva, 2003).

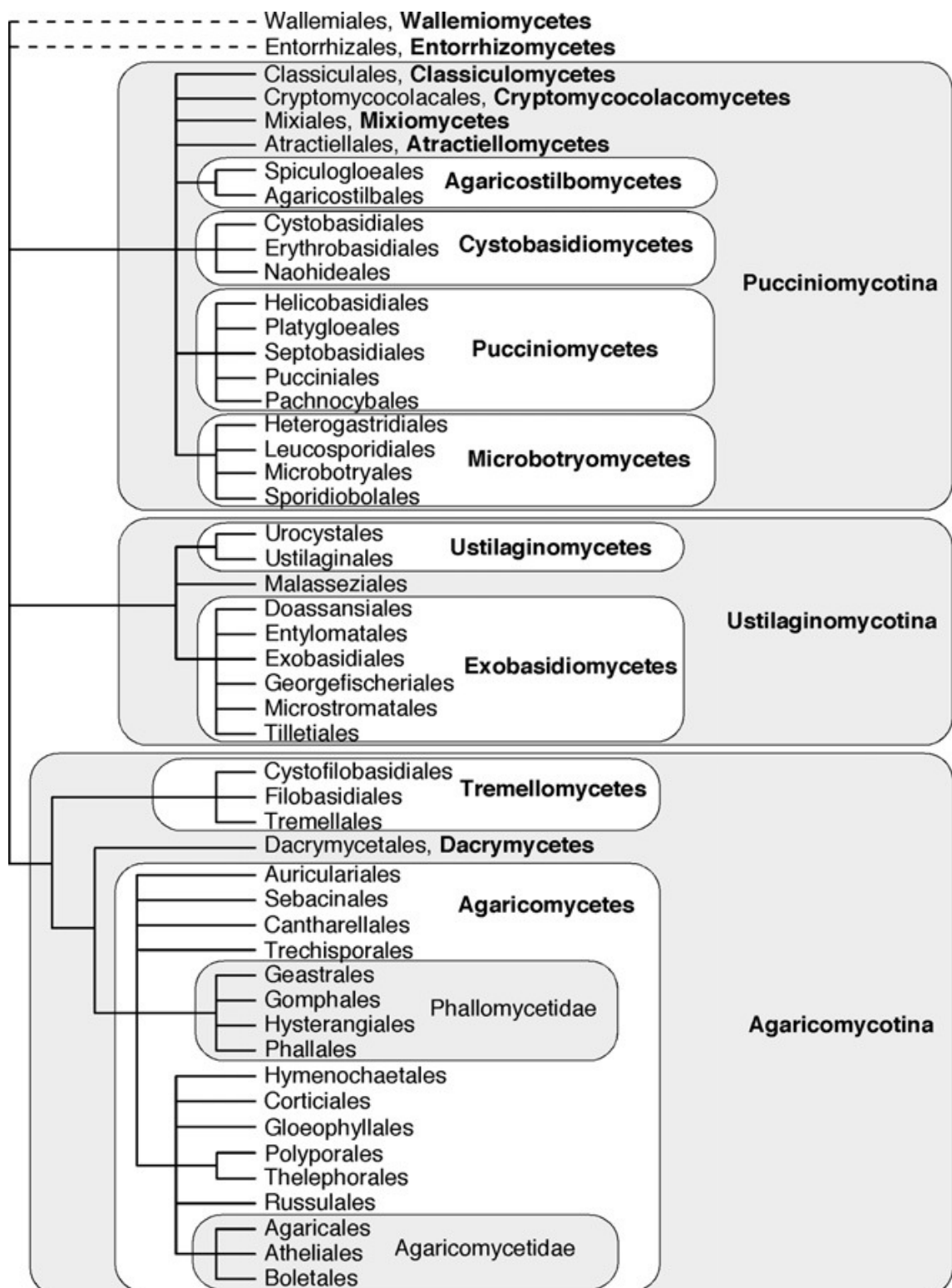


Figura 2: Filogenia e classificação do Filo Basidiomycota (Hibbet *et al.*, 2007).

2.11.2 Ustilaginomycotina

A parede celular apresenta glicose como açúcar predominante, seguido da presença de manose e galactose e ausência de xilose (Fell *et al.*, 2001). Nesse subfilo está incluída a maioria dos carvões (como por exemplo espécies das ordens Ustilaginales e Tilletiales) e algumas leveduras, tais como *Pseudozyma antarctica*, *Rhodotorula bacarum*, *Rhodotorula phylloplana* e espécies dos gêneros *Sympodiomyopsis*, *Tilletiopsis* e *Malassezia*. Todas estas espécies, com exceção do gênero *Malassezia*, parecem ser encontradas em associação com plantas, apesar de não existir qualquer informação sobre a possibilidade de serem simplesmente saprófitas ou estados leveduriformes de fungos dimórficos fitopatogênicos (Fell *et al.*, 2001; Silva, 2003).

2.11.3 Agaricomycotina

Os membros desse grupo apresentam hifas com septos complexos, com doliporos. A glicose é açúcar predominante na parede celular, seguido por manose e xilose. Geralmente, os membros desse grupo são capazes de assimilar inositol e de produzir compostos amilóides (Fell *et al.*, 2001).

A classe Tremellomycetes inclui leveduras nas ordens Tremellales, Filobasidiales e Cystofilobasidiales. Na classificação atual, Trichosporonales foi inserido na ordem Tremellales (Hibbet *et al.*, 2007). O gênero *Cryptococcus* é um gênero polifilético e ocorre em todas as ordens da classe.

A ordem Tremellales constitui um grupo heterogêneo (Fell *et al.*, 2000; Scorzetti *et al.*, 2002). Inclui, por exemplo, os gêneros de leveduras *Bullera*,

Bulleromyces, *Cryptococcus*, *Fellomyces*, *Kockovaella*, *Tremella*, e *Sirobasidium*.

Os membros dos Trichosporonales, como dito anteriormente, estão inseridos na ordem Tremellales. O gênero *Trichosporon* é caracterizado pela formação de artroconídeos e inclui espécies importantes do ponto de vista clínico, tais como *Trichosporon asahii*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon inkin*, *Trichosporon mucoides* e *Trichosporon insectorum*, espécie isolada a partir do estômago de insetos no Panamá e de queijo no Brasil (Fuentefria *et al.*, 2008).

A ordem Filobasidiales inclui espécies dos gêneros *Cryptococcus*, *Filobasidiella*, *Filobasidium*. Já a ordem Cystofilobasidiales inclui a espécie *Guehomyces pullulans* e outros gêneros como por exemplo, *Cystofilobasidium*, *Mrakia*, *Udeniomyces*, *Xanthophyllomyces* e *Itersonilia* (Silva, 2003; Hibbet *et al.*, 2007).

2.12 Potencial biotecnológico de leveduras

2.12.1 Enzimas

O uso de microrganismos como fonte biotecnológica de enzimas extracelulares de interesse industrial tem sido estimulado. Eles representam uma excelente fonte de enzimas devido a sua grande diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética. A triagem de microrganismos com potencial para uso biotecnológico se inicia com a seleção do microrganismo que possui a característica desejada (Steele & Stowers, 1991). Essa seleção pode ser realizada a partir de coleções de culturas ou a partir de substratos

naturais presentes no meio ambiente. Entretanto, a estratégia utilizada para a seleção pode variar. Caso o objetivo seja isolar microrganismos que possuam diferentes capacidades para uso biotecnológico, como, por exemplo, capacidade de produzir diferentes enzimas, uma estratégia indireta de isolamento é normalmente adotada. Nesta estratégia, procede-se ao isolamento geral de microrganismos da amostra, que depois são testados com relação à capacidade de gerar os produtos ou as atividades desejadas. Desta forma, possibilita-se a criação de coleções de cultura de microrganismos que possam, posteriormente, ser testadas para a verificação de outras características de interesse industrial. Após esta primeira etapa de seleção do microrganismo, é realizada a otimização do processo de produção para posterior utilização em larga escala.

O uso de fungos e leveduras como recursos biotecnológicos para produção de enzimas relevantes industrialmente tem estimulado o interesse na exploração da atividade enzimática destes microrganismos. Estes produtos oriundos de microrganismos que ocorrem naturalmente, apresentam a vantagem de serem mais facilmente aceitos e aprovados para comercialização do que os oriundos de microrganismos manipulados geneticamente (Steele & Stowers, 1991).

A descoberta de novas leveduras, sua preservação e sua correta classificação são imprescindíveis para que a nossa diversidade de leveduras seja bem utilizada, mantida e transformada em riquezas em benefício do nosso próprio país. Além disso, por apresentar uma imensa versatilidade metabólica e facilidade de manipulação genética, são uma excelente fonte de substâncias

bioativas, incluindo enzimas e outros metabólitos que desempenham importante papel ecológico e muito utilizadas em processos industriais (Russo *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.* 2004; Strauss *et al.*, 2001). Dentre estes compostos estão as proteases, celulasas, lipases, celobiasas, xilanases, esterases, entre outras.

A maioria dos trabalhos sobre avaliação da capacidade de produção de enzimas de interesse biotecnológico por leveduras possui como foco o estudo da produção de vinho. Leveduras pertencentes a outras espécies que não as do gênero *Saccharomyces* produzem uma grande variedade de enzimas extracelulares que podem ser utilizadas no início da fermentação para favorecer a formação de sabores (Strauss *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2004).

Estudos focalizados na capacidade enzimática de leveduras do ambiente são pouco freqüentes, mas têm demonstrado que leveduras isoladas de ambientes tropicais representam uma fonte de várias enzimas com potencial para uso industrial (Abranches *et al.*, 1997; Braga, *et al.*, 1998; Buzzini & Martini, 2002; Fuentesfria & Valente, 2005; Brizzio *et al.*, 2007).

2.12.2 Toxinas “killer”

Algumas leveduras têm a capacidade de secretar componentes proteínicos com ação antifúngica (fungicida ou fungistática), denominado “fenômeno killer” em leveduras (Golubev, 2006). A sensibilidade à toxina pode ser específica, onde somente as células que contém receptores para as toxinas são sensíveis a elas (Ganter & Starmer, 1992; Golubev *et al.*, 2002; Schmitt & Breinig, 2002; 2006; Golubev, 2006).

Até hoje o fenômeno “*killer*” de *Sacharomyces cereviseae* é o mais estudado, mas linhagens produtoras de toxinas *killer* foram também isoladas de diversos gêneros como *Candida*, *Cryptococcus*, *Hanseniospora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces*, *Trichosporon*, entre outras, incluindo leveduras de interesses ambiental, industrial e químico (Chen *et al*, 2000; Fuentefria *et al.*, 2008).

A produção dessas proteínas pode exercer uma importante influência nas comunidades de leveduras, modificando a composição de espécies do substrato a favor das produtoras e permitindo que elas se estabeleçam com mais sucesso em detrimento das outras leveduras sensíveis (Fredlund, *et al.*, 2002).

Além disso, novas tecnologias têm sido criadas para o uso de processos biológicos na indústria alimentícia (Palpacelli *et al.*, 1991) e na biotipagem de microrganismos de importância clínica (Buzzini *et al.*, 2007; Fuentefria *et al.*, 2006; 2007).

Segundo Fuentefria (2007), a aplicação biotecnológica de leveduras produtoras de toxinas “*killer*” vem crescendo consideravelmente, como agentes antifúngicos, linhagens iniciadoras de processos fermentativos, agentes de biocontrole e como marcadores epidemiológicos para discriminação de linhagens patogênicas.

2.12.3 Outras substâncias bioativas

Espécies dos gêneros *Candida*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus* também têm sido exploradas por sua capacidade de acumular lipídios dentro de suas células, tendo ampla utilização na indústria (Buzzini & Martini, 2006).

As leveduras basidiomicéticas muitas vezes produzem pigmentos carotenóides. Esses pigmentos apresentam excelente aplicação nas indústrias farmacêutica, química e de alimentos (Buzzini & Martini, 2006; Olson, 1989; Krinsky, 1994; Nishimo *et al.*, 1999). Já foi relatada em leveduras basidiomicéticas dos gêneros *Rhodotorula/Rhodospiridium* e *Sporobolomyces/Sporidiobolus* a produção de β -caroteno, γ -caroteno, toruleno e torularodina (Johnson & Schroeder, 1995).

A produção de compostos orgânicos voláteis (VOCs) por leveduras dos gêneros *Sporobolomyces*, *Candida* e *Debaryomyces* também já foi relatada (Endrizzi *et al.*, 1996; Spinnler *et al.*, 2001; Wache *et al.*, 2001). Estes compostos são muito utilizados nas indústrias química, farmacêutica, alimentos e cosmética (Berger & Drawert, 1987; Cheetham, 1997).

2.13 Informações preliminares sobre leveduras isoladas de bromélias no Parque de Itapuã, Viamão – RS.

Landell *et al.* (2006), utilizando metodologia convencional para a identificação dos isolados, obtiveram um total de 138 isolados de leveduras, sendo 13% leveduras de afinidade ascomicética e 87% de afinidade basidiomicética. Os gêneros *Candida* e *Debaryomyces* foram os mais frequentes no grupo de leveduras ascomicéticas, sendo a espécie

Debaryomyces hansenii a mais encontrada. Entre os basidiomicetos, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces/ Sporodiobolus*, com as espécies *Sporobolomyces roseus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula* sp. nov., e *Sporobolomyces salmonicolor* foram mais frequentes. Vários isolados obtidos representam possíveis espécies novas, sendo que dezesseis foram confirmados como pertencentes a duas espécies ainda não descritas, por meio do sequenciamento das regiões D1/D2 do LSU e ITS. A diversidade e a riqueza de leveduras foram maiores na Praia da Pedreira que na Praia de Fora.

Além disso, em um estudo preliminar, abordando produção de enzimas por essas leveduras isoladas de bromélias (Landell *et al.*, 2005), testou-se 81 isolados, onde 37% foram capazes de produzir a enzima β -galactosidase (lactase), 60,5% celobiase, 39,5% amilase, 45,7% capazes de hidrolisar caseína e 12,4% capazes de hidrolisar gelatina, demonstrando o grande potencial para uso industrial das leveduras isoladas de bromélias.

Além dos resultados citados acima, durante o trabalho de mestrado (Landell, 2006), foi obtido um grupo grande de fungos leveduriformes (n=34) que também tiveram o perfil enzimático testado, apresentando resultados bastante promissores.

Informações preliminares obtidas durante os trabalhos Landell *et al.*, 2005; Landell, 2006; Landell *et al.*, 2006, demonstraram que esse substrato apresenta uma grande diversidade de leveduras, além de ser um bom substrato para o isolamento de espécies novas de leveduras e com um grande potencial para aplicação biotecnológica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais de amostragem

Foram escolhidos dois locais de amostragem no Parque Estadual de Itapuã / Viamão – RS (30°20' a 30°27' S; 50°50' a 51°05' W), a Trilha do Araçá / Praia da Pedreira e Trilha da Betânea / Praia de Fora. O clima é subtropical úmido (Cfa), com temperatura e precipitação média anual de 19,5°C e 1347mm, respectivamente (Estação Meteorológica de Porto Alegre).

3.2 Plantas amostradas

Foram selecionadas 11 espécies de bromélias: *Aechmea recurvata* (n=13), *Bilbergia nutans* (n=2), *Dyckia* sp. (n=1), *Vriesea friburgensis* (n=16), *Vriesea gigantea* (n=8), *Vriesea procera* (n=3), *Tillandsia stricta* (n=2), *Tillandsia crocata* (n=3), *Tillandsia gardneri* (n=7), *Tillandsia geminiflora* (n=10), *Bromelia antiacantha* (n=8), totalizando 73 amostras (36 amostras no ponto 1 – Trilha do Araçá / Praia da Pedreira - e 37 amostras no ponto 2 – Trilha da Betânea / Praia de Fora).

3.3 Coleta, isolamento e conservação dos isolados de bromélias

3.3.1 A partir do filoplano, flores ou de tanques de bromélias

As amostras de bromélias foram coletadas durante o período de 05 de abril de 2004 a 25 de maio de 2007, perfazendo um total de sete coletas. As coletas realizadas nos anos de 2004 e 2005 correspondem ao trabalho realizado na dissertação de Mestrado (Landell, 2006).

Folhas maduras das bromélias foram assepticamente coletadas em sacos plásticos estéreis, transportadas para o laboratório e processadas em até cinco horas. Quando presentes, flores e águas dos tanques também foram coletadas. As folhas foram lavadas com água destilada estéril previamente ao processamento, para retirada da poeira acumulada e outros artefatos eventualmente presentes. Após, foram cortados assepticamente pedaços de 10cm^2 e colocados em frascos Erlenmeyers com 50mL de água destilada estéril e mantidos em agitador mecânico (“shaker”) por 10 minutos a 180 rpm. Esta água foi descartada e 30mL de uma solução de 0,5% Tween 20 foi acrescida ao frasco, mantidos em agitador mecânico novamente por mais 30 min, também a 180 rpm. Para a dissociação das leveduras ainda remanescentes da superfície foliar, este procedimento foi repetido por mais duas vezes na primeira coleta e por mais uma vez nas coletas seguintes. Feita a última lavagem, foram realizadas diluições decimais seriadas até 10^{-2} e estas foram semeadas em duplicata pela técnica de espalhamento de superfície em meio YM (ver Tabela 1 – Anexos) acrescido de 0,04% cloranfenicol pH 4,0 e incubadas a $22-25^{\circ}\text{C}$ por 5-7 dias. As flores foram coletadas assepticamente em sacos plásticos individuais e processadas como as folhas ou em alguns casos, foram maceradas, com auxílio de pistilo, em frascos acrescidos de água destilada estéril, semeadas em meio YM acrescido de 0,04% cloranfenicol (pH 4,0) e incubadas a $22-25^{\circ}\text{C}$ por 5-7 dias. As águas de tanques das bromélias foram coletadas assepticamente em tubos estéreis, com o auxílio de pipetas estéreis e diluídas até 10^{-2} , sendo posteriormente semeadas da mesma forma e no mesmo meio utilizado para o processamento das folhas e flores. Após o

período de incubação, colônias de leveduras de cada tipo morfológico foram selecionadas e purificadas duas vezes consecutivas pela técnica do esgotamento em Ágar YEPG (ver Tabela 1 – Anexos), conservadas em tubos de ensaio contendo Ágar GYMP (ver Tabela 1 – Anexos), cobertos por uma camada de vaselina estéril e mantidos em geladeira.

3.3.2 A partir da parte interna das folhas (Leveduras endofíticas)

As folhas foram coletadas assepticamente em sacos plásticos estéreis e transportadas para o laboratório para o processamento. O processamento das amostras foi realizado de acordo com Sobral (2003). Elas foram previamente lavadas com água destilada estéril, para retirada da poeira acumulada e outros artefatos eventualmente presentes. Após, foram cortadas em pedaços de aproximadamente 10cm², secas em fluxo laminar, pesadas e lavadas em etanol 70% por um minuto, hipoclorito de sódio 2% por três minutos, novamente com etanol 70% por um minuto e, para finalizar as lavagens, em água destilada estéril por duas vezes consecutivas, sendo que a última lavagem foi mantida em agitador mecânico por 30 min. Depois do procedimento de lavagem, as folhas foram maceradas em frascos tipo cadinho e as diluições 10⁻¹ e 10⁻² foram semeadas, em duplicata, pela técnica de espalhamento de superfície em meio YM acrescido de 0,04% cloranfenicol (pH 4,0), sendo incubadas a 22-25 °C por 5-7 dias. Após este período de incubação, colônias de leveduras que cresceram nas placas foram isoladas e realizado o mesmo procedimento descrito no item 3.3.1.

3.4 Caracterização molecular

3.4.1 Extração de DNA genômico total

Para a extração de DNA, as leveduras foram esgotadas em placas de Petri, com meio Ágar YEPG, e incubadas por 3-7 dias a 23-25°C. Depois de selecionadas as colônias isoladas, estas foram inoculadas em 0,5 mL de tampão de lise celular (0,15M NaCl / 50mM Tris-HCl / 10mM EDTA / 2% SDS / pH=8,0) e incubadas por uma hora a 65°C. Em seguida, adicionou-se 1 volume de fenol-clorofórmio (1:1) e as amostras foram centrifugadas por 3 min a 12000 X g, o sobrenadante foi purificado duas vezes consecutivas com clorofórmio, centrifugadas por 15 min a 12000 X g. Após essa etapa, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde o DNA foi precipitado com isopropanol p.a. e centrifugado por 20 min a 12000 X g. O DNA foi lavado em etanol a 70%, seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 100 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl pH=7,6 / 1mM EDTA pH=8,0) e estocado em geladeira ou a -20°C até seu uso. A quantidade e a qualidade do DNA obtido foram verificadas após eletroforese do DNA em gel de agarose 0,8 - 1% (p/ vol).

3.4.2 Sequenciamento da regiões D1/D2 do LSU rDNA e ITS.

Para amplificação da região D1/D2 do LSU rDNA foram 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') (O'DONNELL, 1993). Para a reação de amplificação foi utilizado um volume final de 25µL contendo 20 – 30 ng de DNA, 1 U *Taq* polimerase (Invitrogen), 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 2,5

mM MgCl₂. O programa de amplificação constituiu em um passo de desnaturação inicial a 94 °C durante 3 min, seguido de 33 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 seg a 56 °C e 1 min a 72 °C, com uma extensão final de 72 °C durante 6 min.

Para amplificação da região ITS, que compreende os espaçadores intergênicos ITS1 e ITS2 e o gene do rRNA 5.8S foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). A reação de amplificação para essa região foi semelhante à reação para amplificação da região D1/D2 do LSU rDNA, apenas com a substituição dos oligonucleotídeos iniciadores. O programa de amplificação constituiu em um passo de desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, seguido de 30 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 7 min.

Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados por precipitação com RNA transportador (tRNA), onde adicionou-se ao produto de amplificação 1 µL de tRNA (1 µg/µL) e 2,5 volumes de etanol absoluto (4 °C). Após, incubou-se por 16h a -20 °C, seguido por uma etapa de centrifugação a 13000 rpm por 30 min; o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 70% e centrifugado por 3 min. Deixou-se secar o precipitado e ressuspendeu-se em tampão TE. A quantificação das amostras foi realizada em gel de agarose 1%.

Para reação de sequenciamento foi utilizado um volume final de 10 µL, contendo 80 ng/ µL de DNA para região D1/D2 e 70 ng/ µL para a região ITS, e 5 pmol dos oligonucleotídeos. Foi utilizado o kit DYEnamic™ ET Dye

Terminator Cycle Sequencing (MegaBACE), empregando o sequenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences).

As sequências foram obtidas por meio do programa STADEN Package (Staden *et al.*, 2000), alinhadas por meio do programa MEGA, version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) e analisadas no programa BLAST Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) (Altschul *et al.*, 1997), disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. As árvores filogenéticas foram construídas pela análise Neighbour-Joining ou Máxima Parcimônia utilizando o programa MEGA 4.

3.4.3 Determinação de polimorfismo de regiões de mini e micro-satélite (MSP-PCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram: M13 (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') e (GTG)₅ (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3'). Para a reação de amplificação foi utilizado um volume final de 25µL contendo 20 – 30 ng de DNA, 1 U *Taq* polimerase (Invitrogen), 20 pmol de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,5 mM MgCl₂ e 3mM Mg(C₂H₃O₂)₂. O programa de amplificação constituiu em um passo de desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 20 seg a 94°C, 1 min a 50°C e 20 seg a 72°C, com uma extensão final de 72°C durante 6 min. O padrão de bandas obtido foi verificado após eletroforese do DNA em gel de agarose 2% (p/ vol) a 70V por 5h.

3.5 Caracterização convencional das espécies novas de leveduras

As espécies leveduras foram caracterizadas fenotipicamente seguindo características morfológicas e fisiológicas (Yarrow, 1998).

3.5.1 Características macromorfológicas - Morfologia colonial

Foram observadas as características coloniais como cor (branca, creme, amarelada, laranja, rosa, vermelha, marrom, preta), brilho (brilhante, opaca), forma (circular, oval ou fusiforme), margem (regular, irregular, lobada ou com raízes), superfície (lisa ou rugosa), elevação (plana, convexa, umbonada ou vulcão) e consistência (cremosa, mucóide, butirosa, membranosa, esfarelada, dura, seca), segundo Yarrow (1998).

3.5.2 Características micromorfológicas

3.5.2.1 Morfologia celular

Foram realizadas lâminas a fresco a partir do crescimento de culturas em Ágar YEPG com no máximo uma semana de incubação a 22-25°C e a observação foi feita em microscopia óptica com aumento de 400 a 1000X. As características celulares observados foram: forma e tamanho da célula, presença de pseudomicélio, tipo de reprodução assexuada (brotamento e/ou fissão) e, caso seja por brotamento, tipo de brotamento (multipolar, bipolar, unipolar), presença de ascosporos e de balistosporos, segundo Barnett *et al.* (2000) e Yarrow (1998).

3.5.2.2 Formação de ascosporos

A verificação da produção de ascosporos pelas leveduras com afinidade ascomicética foi realizada utilizando como meio para induzir a sua produção Ágar acetato e Ágar V8 (ver Tabela 1- Anexos) e incubação a 22-25°C por até um mês. Em microscopia óptica, foram observadas a presença ou ausência de conjugação, forma e número de ascósporos por asca e liberação ou não de esporos logo após a sua formação.

3.5.2.3 Formação de hifas e pseudohifas

O microcultivo (cultivo em lâmina) ou a técnica de Dalmau Plate foram as técnicas escolhidas para observação de pseudohifa ou de hifa verdadeira, utilizando o meio de cultura Ágar Fubá (ver Tabela 1- Anexos).

3.5.3 Testes bioquímicos/fisiológicos

3.5.3.1 Testes de fermentação

Verificou-se a capacidade de cada levedura fermentar a glicose e, em alguns casos, a galactose, sacarose, lactose e maltose. Antes de realizar cada teste, as culturas foram crescidas em Ágar YEPG para obtenção de células metabolicamente ativas. Estas culturas foram, posteriormente, inoculadas em tubos de ensaios com meio para fermentação contendo tubos de Durham invertidos no seu interior. Os tubos de fermentação foram lidos regularmente em 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 e 21 dias após a inoculação. A produção de gás foi confirmada pelo seu acúmulo nos tubos de Durham. A leitura foi considerada negativa quando não houve acúmulo de gás ou quando apenas foram

observadas algumas bolhas de gás no tubo de Durham, +1 quando apenas 1/3 do tubo de Durham estava ocupado por gás, +2 quando o gás estiver presente em 2/3 do tubo e +3 quando o tubo de Durham encontrou-se cheio de gás. As linhagens cujas leituras registraram-se +2 ou +3 foram consideradas fermentadoras. As culturas que tiveram resultado positivo para fermentação de glicose foram testadas para fermentação de galactose, sacarose, lactose e de maltose (Yarrow, 1998; Barnett *et al.*, 2000).

3.5.3.2 Assimilação de fontes de carbono

A capacidade de assimilação de diferentes fontes carbonadas pelas leveduras foi verificada, tendo sido utilizadas as seguintes fontes: glicose, galactose, ribose, xilose, L-arabinose, D-arabinose, ramnose, maltose, trealose, celobiose, salicina, lactose, rafinose, sacarose, inulina, amido solúvel, glicerol, eritritol, ribitol, glucitol, manitol, inositol, N-acetil-glicosamina, citrato, lactato, succinato, gluconato, tween 20, tween 80 e melibiose. Esta habilidade de assimilar ou não diferentes fontes de carbono permite a distinção das espécies de acordo com o seu padrão assimilativo. O método de réplica em placas (Barnett *et al.*, 2000) foi o método escolhido neste trabalho. As linhagens metabolicamente ativas foram inoculadas em tubos contendo 2 mL de água destilada estéril por 24-48h, até uma densidade de 0,5 medida pelo cartão de Wickerham, para que as leveduras esgotassem suas fontes energéticas. Após esse período, uma alíquota de 400µL de cada levedura foi adicionada em cada um dos poços da base do aparelho utilizado para esta técnica (replicador de Steer), permitindo que vinte e cinco leveduras fossem testadas por vez. Placas

contendo as fontes de carbono descritas acima, adicionadas de Yeast Nitrogen Base (YNB) e ágar, foram inoculadas com as leveduras a serem testadas e incubadas por 21 dias a 22-25°C (Yarrow, 1998; Barnett *et al.*,2000). Como controle positivo foi usada a placa com meio YNB e glicose, e como controle negativo uma placa apenas com YNB e ágar (ver Tabela 1- Anexos).

3.5.3.3 Assimilação de fontes de nitrogênio

Para a assimilação de fontes de nitrogenadas foram utilizados nitrato de sódio, nitrito de sódio, lisina, etilamina, creatina e creatinina, como únicas fontes de nitrogênio, utilizando a mesma técnica de réplica em placas do teste de assimilação de fontes de carbono, com exceção do nitrito de sódio. As linhagens foram inoculadas, a partir de culturas recentes em Ágar YEPG, em tubos contendo 2mL de água destilada estéril, por 24-48h, para que as leveduras esgotassem suas fontes energéticas. A densidade do inóculo nos tubos com água estéril foi medida pelo cartão de Wickerham (densidade 0,5). Ao mesmo tempo, foi preparado meio contendo YCB 1,17% com 2% de ágar e as fontes de nitrogênio testadas a uma concentração de 0,078% para nitrato, 0,064% para etilamina, 0,056% para lisina, 0,078% para creatina e creatinina. Para o teste de assimilação de nitrito de sódio, foi realizada a técnica de auxanograma, onde as linhagens previamente inoculadas em água destilada estéril, por 24-48h, para esgotamento de suas fontes energéticas, foram inoculadas em YCB 1,17% e ágar 2% pela técnica de “*pour-plate*”, em seguida adicionou-se pequena quantidade de nitrito de sódio sobre a superfície do meio de cultura. Incubadas por até 7 dias a 22-25°C. O resultado positivo foi

evidenciado pelo crescimento da levedura na superfície do meio de cultura e ao redor do inóculo do nitrito.

3.5.3.4 Teste de Urease e Diazônio Azul B (DBB)

As linhagens foram inoculadas a partir de culturas recentes e metabolicamente ativas em tubos contendo o meio Ágar Uréia. Inicialmente autoclavou-se todos os constituintes (ver Tabela 1 - Anexos) nos tubos com 2,25mL cada, com exceção da uréia que foi esterilizada por filtração em filtros de celulose de 0,22 μ m. Após esterilização do meio de cultura, adicionou-se 0,25mL de uréia filtrada (estoque 10%), homogeneizou-se e inclinou-se os tubos, deixando solidificar. Os tubos de ensaio foram inoculados e incubados por 3 dias a 22-25°C, sendo realizadas leituras diariamente. A atividade da enzima urease, quando presente, aumenta a alcalinidade do meio de cultura, provocando alteração inicial do indicador de pH de rosa para branca (Neufeld, 1999; Barnett *et al.*, 2000).

Após a leitura da urease, as culturas foram incubadas a 60°C por cerca de 18 horas, sendo posteriormente adicionadas sobre o inóculo cerca de 1mL de uma solução contendo o corante Diazônio Azul B (DBB) tamponado com Tris-HCL 1M para um pH 7.0. As culturas que adquiriram uma coloração avermelhada após o contato com o reagente DBB foram consideradas positivas. Os isolados que não desenvolveram coloração avermelhada foram considerados negativos (Hagler & Ahearn, 1981).

3.5.3.5 Crescimento em diferentes temperaturas

O teste de crescimento em diferentes temperaturas foi realizado com a utilização do meio caldo YEPG. Após a inoculação, os tubos foram incubados em banho-maria nas temperaturas de 30, 37, 40 e 42°C por até quatro dias, sendo a leitura realizada diariamente pelo grau de turvação, de acordo com a escala de Wickerham (Yarrow, 1998; Barnett *et al.*, 2000).

3.5.3.6 Teste de tolerância ao NaCl 10% e 16%

Avaliou-se a capacidade de crescimento das leveduras, durante 21 dias, em duas concentrações de soluções salinas hipertônicas; NaCl 10% e 16%. O meio utilizado foi o caldo ou Ágar YEPG modificado (acrescido de NaCl nas concentrações citadas acima). Para controle positivo, utilizou-se o meio sem NaCl, incubação a 22-25 °C por 21 dias, sendo a leitura realizada de sete em sete dias pelo grau de turvação, de acordo com a escala de Wickerham ou pelo crescimento na superfície do meio sólido (Barnett *et al.*, 2000).

3.5.3.7 Teste de tolerância à glicose 50%

Seguindo o teste de tolerância a soluções hipertônicas, foi testada a capacidade da levedura de crescer em meio com alta concentração de glicose (solução glicosilada hipertônica). O meio utilizado foi o caldo ou Ágar YEPG modificado (acrescido de glicose 50%). Para controle positivo, utilizou-se o meio com glicose 2%, incubação a 22-25 °C por 21 dias, sendo a leitura realizada de sete em sete dias pelo grau de turvação, de acordo com a escala

de Wickerham ou pelo crescimento na superfície do meio sólido (Barnett *et al.*, 2000).

3.5.3.8 Produção de compostos amilóides

Para avaliar esta característica, adicionou-se uma solução de lugol (solução de iodo com iodeto de potássio 1:5) à placa com crescimento positivo da amostra em meio sólido contendo YNB com glicose. O resultado positivo foi evidenciado pela formação de um complexo esverdeado a azulado na colônia, devido à reação do composto amilóide com a solução de iodo.

3.6 Perfil enzimático

Todos os isolados testados (n=115 para amilase, celulase, proteinase e pectinase; n=107 para hidrólise de azeite e n=114 para tween 80) foram previamente cultivados em Ágar YEPG por 24-48h para verificação da pureza das culturas e obtenção de células metabolicamente ativas. Placas com os substratos enzimáticos correspondentes foram avaliadas semiquantitativamente para a presença ou ausência de atividade enzimática e seus resultados classificados de acordo com o halo de atividade enzimática em meio sólido. As escalas em centímetros dos diâmetros de difusão das enzimas foram classificadas como: fraca atividade, quando menor ou igual a 0,5cm (w), atividade positiva quando for maior que 0,5 cm (+), e forte atividade quando for maior ou igual a 1cm (++) com a finalidade de selecionar as linhagens que foram melhores produtoras das respectivas enzimas. Estes limites foram padronizados empiricamente, utilizando linhagens previamente reconhecidas

como boas produtoras, fracas produtoras e não produtoras de cada enzima analisada.

3.6.1.2 Lipase/Esterase

3.6.1.2.1 Hidrólise de Azeite de oliva

Foi utilizado meio de Gorodkowa (ver Tabela 1- Anexos). Após esterilização por autoclavação, suplementou-se o meio com 5% de azeite de oliva esterilizado por filtração em filtros de celulose 0,22 μ m, agitou-se e distribuiu-se por placas de Petri. Cada levedura foi inoculada e as placas incubadas por 7 dias a 22-25°C. A revelação da atividade lipolítica foi feita com uma solução saturada de sulfato de cobre (30%) por 10 min, correspondendo um resultado positivo ao desenvolvimento de um halo azulado em redor da cultura.

3.6.1.2.2 Hidrólise de Tween 80

Foi utilizado o mesmo meio de Gorodkowa suplementado com 0,01% de cloreto de cálcio e 2,5% de Tween 80. Após a semeadura das leveduras, as placas foram incubadas por 7 dias a 22-25°C. O resultado positivo foi evidenciado pela precipitação de sais de cálcio em redor das culturas, formados pela liberação dos ácidos graxos, ou pela formação de um precipitado menos denso à volta da cultura, devido à hidrólise completa dos ácidos graxos.

3.6.1.3 Polissacarases

3.6.1.3.1 Amilase

A atividade amilolítica dos isolados foi verificada por meio da degradação do amido solúvel (Buzzini & Martini, 2002; Strauss *et al.*, 2001). Após 7 dias de incubação adicionou-se uma solução de lugol à placa de Ágar Amido (ver Tabela 1 - Anexos), observando-se, após um período de 30 minutos, um nítido halo amarelado ou rosado ao redor do crescimento das linhagens consideradas positivas. O restante do meio torna-se corado de violeta. A reação se deve pela captura do iodo pelas duas moléculas polissacarídeas (amilose e amilopectina) constituintes da estrutura básica do amido, formando um composto escuro (MacFaddin & Lippincott, 2000).

3.6.1.3.2 Celulase

A atividade celulolásica foi testada em meio com carboximetilcelulose 1% (Ver Tabela 1 -Anexos). Cada levedura foi semeada em um quadrante da placa de Petri e incubada por 7 dias a 22-25°C. A revelação foi realizada com uma solução 0,003% de vermelho congo durante 15 min, seguida de lavagem com solução 1M de cloreto de sódio. A hidrólise de carboximetilcelulose foi detectada pela formação de um halo com tom amarelado ao redor da cultura da levedura.

3.6.1.4 Protease

3.6.1.4.1 Hidrólise de caseína

A atividade caseinolítica foi testada em placas de Petri contendo o meio Ágar caseína, ajustado para pH 7,0 com KOH 5N (Braga *et al.*, 1998; Strauss *et al.*, 2001; Trindade *et al.*, 2002). A revelação foi realizada após sete dias de incubação a 22-25°C, com a adição de HCl 1N na superfície do meio deixando reagir com a caseína por um período de 1 hora. O resultado positivo foi considerado quando ao redor do inóculo surgiu um halo transparente devido à hidrólise da caseína, circundado por um fundo com coloração esbranquiçada correspondendo à área onde a caseína não tinha sido hidrolisada, sendo, portanto, desnaturada por ação do ácido clorídrico.

3.6.1.5 Pectinase

A atividade da enzima pectinase foi testada em placas de Petri contendo o meio Ágar Pectina (ver tabela 1- Anexos) (Santi, 2005). A revelação foi realizada após sete dias de incubação a 22-25°C, com a adição de uma solução de vermelho de Rutênio 0,02%. O resultado positivo é evidenciado por meio de um halo de degradação (translúcido) ao redor da colônia.

3.7 Determinação do índice de Shannon-Weaver e curva de rarefação

A análise dos resultados de diversidade de espécies encontradas nos dois pontos do Parque de Itapuã foi feita por meio do cálculo do índice de Shannon-Weaver, que relata o número de espécies e a importância relativa

individual das espécies (Shannon & Weaver, 1963) e de curvas de rarefação, que permitem comparar amostras para as quais o resultado do isolamento foi desigual, com um número muito variável de contagens totais, devido ao grande número de espécies raras encontradas nesse substrato.

3.8 Listagem de meios de cultura utilizados

Os meios de cultura utilizados estão listados na Tabela 1 (Anexos).

4. CAPÍTULO 1:

***Farysizyma* gen.nov., an anamorphic genus in the Ustilaginales to accommodate three novel epiphytic basidiomycetous yeast species from America, Europe and Asia.**

Publicado na revista:

FEMS Yeast Research

(2008), 8, 499 – 508.



RESEARCH ARTICLE

***Farysizyma* gen. nov., an anamorphic genus in the *Ustilaginales* to accommodate three novel epiphytic basidiomycetous yeast species from America, Europe and Asia**

João Inácio¹, Melissa Fontes Landell², Patrícia Valente², Pi-Han Wang³, Yen-Ting Wang⁴, Shan-Hua Yang⁵, Jessamyn S. Manson⁶, Marc-André Lachance⁷, Carlos A. Rosa⁸ & Álvaro Fonseca¹

¹Centro de Recursos Microbiológicos (CREM), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica, Portugal; ²Departamento de Microbiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ³Department of Life Science, Tunghai University, Taichung, Taiwan, Republic of China; ⁴Cheng Hsin General Hospital, Taipei, Taiwan, Republic of China; ⁵Department of Microbiology, Soochow University, Taipei, Taiwan, Republic of China; ⁶Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada; ⁷Department of Biology, University of Western Ontario, London, ON, Canada; and ⁸Departamento de Microbiologia, ICB, CP, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Correspondence: Álvaro Fonseca, DCV, FCT/UNL, Quinta da Torre, 2829-516 Caparica, Portugal. Tel.: +351 212948500; fax: +351 212948530; e-mail: amrf@fct.unl.pt

Received 10 August 2007; revised 15 January 2008; accepted 16 January 2008.
First published online 1 April 2008.

DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00377.x

Editor: Teun Boekhout

Keywords

phylloplane; basidiomycetous yeasts; Ustilaginomycotina; *Farysizyma*.

Abstract

Among many isolates that resulted from four independent surveys of yeasts associated with plants in Brazil, the USA, Portugal and Taiwan, we have characterized eighteen basidiomycetous strains, two of which were conspecific with the type strain of *Rhodotorula acheniorum*, whereas the remaining sixteen isolates appeared not to correspond to any previously described species. Microsatellite-PCR fingerprinting with primers M13 and (GTG)₅ confirmed that the latter strains formed three genetically distinct groups. Each group was considered to represent a distinct species based on nucleotide sequences of the D1/D2 domains of the 26S rRNA gene and the internal transcribed spacer (ITS) region. Phylogenetic analyses of sequence data placed the putative novel species in a clade with *R. acheniorum* and the dimorphic smut fungus *Farysia chardoniana*. A novel anamorphic genus, *Farysizyma*, is created to accommodate the three undescribed species, which were named *Farysizyma itapuensis*, *Farysizyma setubalensis* and *Farysizyma taiwaniana*. A new combination, *Farysizyma acheniorum*, is proposed for *R. acheniorum*, which may represent the yeast-phase anamorph of *Farysia thuemenii*.

Introduction

Basidiomycetous yeasts are found in three major lineages: Hymenomycetes, Urediniomycetes and Ustilaginomycetes (Fell *et al.*, 2000; Scorzetti *et al.*, 2002). Recently, Bauer *et al.* (2006) proposed a new classification scheme for basidiomycetous fungi in three subphyla: the Agaricomycotina, the Pucciniomycotina and the Ustilaginomycotina, which replaced the Hymenomycetes, Urediniomycetes and Ustilaginomycetes, respectively, *sensu* Swann & Taylor (1995). The Ustilaginomycotina comprise more than 1400, mainly phytoparasitic, fungal species (e.g. smuts and smut-allied fungi) that have a type B secondary structure of the 5S rRNA and a cell wall carbohydrate composition with dominance of glucose and absence of xylose (Bauer *et al.*, 2006). The phylogeny and classification of Ustilaginomycotina have been recently revised in the light of multigene analyses by

Begerow *et al.* (2006). A few yeast species are included in the Ustilaginomycotina (e.g. *Pseudozyma* spp., *Rhodotorula acheniorum* and *Rhodotorula bacarum*) and are usually found on plant surfaces. Some authors reported the isolation of ustilaginomycetous yeasts also from clinical samples (Sugita *et al.*, 2003). Several other ustilaginomycetous species have biotechnological and/or agricultural importance (Grigorova *et al.*, 1999; Avis & Bélanger, 2002; Martinez-Espinoza *et al.*, 2002; Feldbrügge *et al.*, 2004).

Among many isolates obtained in the course of four independent surveys of yeasts associated with plants in Brazil, the USA, Portugal and Taiwan, we have selected 18 ustilaginomycetous strains that displayed similar phenotypic and genotypic traits. This paper deals with characterization of those isolates and with the formal description of the new taxa created to accommodate the majority of those strains.

Materials and methods

Sample collection and yeast isolation

Leaf samples of the bromeliads *Dyckia* sp., *Tillandsia gardneri*, *Tillandsia geminiflora*, *Vriesea friburgensis* and *Vriesea procera* (*Bromeliaceae*) were aseptically collected from two locations in Itapuã Park (Pedreira Beach and Betânia Trail), near Porto Alegre, Rio Grande do Sul State, South of Brazil (approximate coordinates: 30°22' S, 51°04' W). Leaves of *Cistus albidus* (*Cistaceae*) were collected at two sites in the Arrábida Natural Park, a Mediterranean-type ecosystem, south of Lisbon, Portugal (approximate coordinates: 38°27' N, 9°02' W). Leaves of *Daphniphyllum glaucescens* ssp. *oldhamii* (*Daphniphyllaceae*) were collected at NanJen-Shan Natural Reserve, Taiwan (approximate coordinates: 22°40' N, 120°29' E). Yeast isolation was based on the plating of leaf washings onto solid culture media, with some differences among the Brazilian, Portuguese and Taiwanese surveys. Bromeliad leaves collected in Brazil were first gently washed with sterile distilled water for 10 min, which was then replaced by a 0.5% Tween 20 solution and vigorously agitated for an additional 30 min. Decimal dilutions of the resultant suspension were spread onto YM agar (1% glucose, 0.3% malt extract, 0.3% yeast extract, 0.5% peptone and 2% agar), supplemented with 0.04% chloramphenicol and acidified to pH 4.0. *Cistus albidus* leaves were cut into small fragments and washed vigorously in 10 mL of sterile Ringer's solution (NaCl 0.45%) for 1 min. Decimal dilutions were spread onto MYP agar (malt extract 0.7%, soytone 0.25%, yeast extract 0.05% and agar 1.5%), supplemented with 0.05% chloramphenicol and 0.004% Rose Bengal. *Daphniphyllum glaucescens* ssp. *oldhamii* leaves were washed and agitated for 30 min in sterile distilled water and aliquots were spread on acidified YM agar plates. Pooled samples of nectar from *Gelsemium rankinii* (*Gelsemiaceae*) were collected in a backyard garden in Valdosta, GA (approximate coordinates: 30°51' N, 83°17' W), and plated on YM agar plates with 0.05% chloramphenicol. Plates were incubated at room temperature and representative colonies of the different morphological types, including the ustilaginomycetous yeasts treated in this report, were purified and maintained on agar slants at 4 °C. More details about the Portuguese yeast survey can be found elsewhere (Inácio *et al.*, 2002). Some background on the significance of yeasts in the nectar of *Gelsemium* has been published (Manson *et al.*, 2007).

Phenotypic identification of isolates

Phenotypic characterization and identification of the Brazilian, Portuguese and North American isolates were performed according to Yarrow (1998) and the keys presented in Kurtzman & Fell (1998), Barnett *et al.* (2000), and/or the computer program YEASTCOMPARE (Ciriello & Lachance, Uni-

versity of Western Ontario, London, ON). Some isolates were further characterized by determination of the assimilation profile of aldaric acids and aromatic compounds (Fonseca, 1992; Sampaio, 1994). The Taiwanese isolate was phenotypically characterized with the MicroLogTM (Biolog) and BCCMTM/Allev 2.00 yeast identification systems (Robert *et al.*, 1997). Evaluation of eventual mating compatibility was performed by mixing pairs of cultures on corn meal agar.

Microsatellite-PCR fingerprinting

Genomic DNA isolation and microsatellite-PCR fingerprinting using the primers M13 (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') and (GTG)₅ followed the protocols described elsewhere (Sampaio *et al.*, 2001). Gel electrophoresis images were acquired with the KODAK DIGITAL SCIENCE ID IMAGE ANALYSIS software (Rochester, NY) and analyzed with GELCOMP (version 4.1, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) using the Pearson's correlation coefficient. Dendrograms were computed using the UPGMA clustering method.

DNA sequence analysis

The internal transcribed spacer (ITS) ribosomal DNA region, which includes the ITS1 and ITS2 spacers and the 5.8S rRNA gene, and the D1/D2 domains of the 26S (or LSU) rRNA gene were PCR amplified as described previously (Lachance *et al.*, 1999). The resulting amplicons were concentrated and cleaned with either Qiaquick PCR columns (Qiagen, Chatsworth, CA) or GFX Band Purification Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Cycle sequencing employed standard protocols with the following primers: NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') and NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') for the D1/D2 domains; ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') and ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') for the ITS region. Primers used for amplification and sequencing of rRNA gene were developed by other authors (see <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>). Sequences were obtained with either an ALFexpress II DNA Analyser (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) or an ABI DNA Sequencer (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. Sequences were aligned with the CLUSTAL algorithm of MEGALIGN (DNASTAR Inc., Madison, WI). Phylogenetic trees were computed with PAUP version 4.0b8 (Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA) using the neighbour-joining method and the Kimura two-parameter model for calculating distances. Gaps were treated as missing data. Nucleotide sequences were deposited in GenBank under the accession numbers given in Table 1. Additional sequences were retrieved from GenBank (accession numbers are indicated on the phylogenetic trees).

Results and discussion

Four independent surveys of yeasts associated with the phylloplane of several plants in Brazil, Portugal and Taiwan, and with nectar of flowers in the USA yielded many isolates, 18 of which are herein described (Table 1). Analysis of microsatellite-PCR DNA fingerprints with primers M13 and (GTG)₅ led to grouping of the majority of those strains in four distinct clusters (Fig. 1). Clusters A and B included two Portuguese isolates each, whereas the Taiwanese isolate TOH1-2 presented a unique microsatellite-PCR profile. The major cluster C included all eleven bromeliad isolates from Brazil, with strains BI238 and BI181 having slightly deviating microsatellite-PCR profiles. The North American

isolates were not analyzed by microsatellite-PCR fingerprinting. The analysis of the sequences from the D1/D2 (Fig. 2) and ITS (data not shown) regions revealed that each microsatellite-PCR group corresponded to a distinct yeast species. All three species appeared to be phylogenetically related to *R. acheniorum*, in a clade within the *Ustilaginales* that also includes the smut fungus *Farysia chardoniana* ('*Farysia* clade', Fig. 2). Two of the isolates from *C. albidus* leaves appeared to represent *R. acheniorum* (3CVF5 and 5CVFe5, microsatellite-PCR cluster B), as they had D1/D2 and ITS sequences identical to those of the type strain of this species (CBS 6386). Isolates 5CSFe9 and 3CVF35 (microsatellite-PCR cluster A) seemed to represent an undescribed species, as they presented divergent D1/D2

Table 1. List of strains and DNA sequences used in this study

| Species | Strain* | Other collections | Origin | GeneBank accession no. | |
|---|---------------------|-------------------------|---|------------------------|----------|
| | | | | D1/D2 | ITS |
| <i>Farysizyma acheniorum</i> comb. nov. | 3CVF5 | CBS 10244 | <i>Cistus albidus</i> leaves, Fonte do Veado (Arrábida Natural Park, Portugal) | EU002860 | EU002887 |
| | 5CVFe5 | CBS 10243 | <i>Cistus albidus</i> leaves, Fonte do Veado (Arrábida Natural Park, Portugal) | EU002859 | – |
| <i>F. itapuensis</i> sp. nov. | BI120 ^T | CBS 10428, NRRL Y-48116 | <i>Vriesea friburgensis</i> leaves, Pedreira Beach (Itapuã Park, Brazil) | DQ767831 | DQ767831 |
| | BI52 | – | <i>V. friburgensis</i> leaves, Pedreira Beach (Itapuã Park, Brazil) | – | – |
| | BI63 | CBS 10425, NRRL Y-48114 | <i>V. procera</i> leaves, Pedreira Beach (Itapuã Park, Brazil) | – | – |
| | BI77 | CBS 10426, NRRL Y-48115 | <i>Tillandsia gardneri</i> leaves, Pedreira Beach (Itapuã Park, Brazil) | – | – |
| | BI109 | – | <i>V. friburgensis</i> leaves, Betânia Trail (Itapuã Park, Brazil) | – | – |
| | BI224 | – | <i>T. geminiflora</i> leaves, Pedreira Beach (Itapuã Park, Brazil) | – | – |
| | BI229 | – | <i>V. friburgensis</i> leaves, Betânia Trail (Itapuã Park, Brazil) | – | – |
| | BI154 | – | <i>T. geminiflora</i> leaves, Betânia Trail (Itapuã Park, Brazil) | – | – |
| | BI235 | CBS 10430, NRRL Y-48118 | <i>V. friburgensis</i> leaves, Betânia Trail (Itapuã Park, Brazil) | DQ784567 | – |
| | BI181 | CBS 10429, NRRL Y-48117 | <i>Dyckia</i> sp. leaves, Betânia Trail (Itapuã Park, Brazil) | DQ784568 | DQ855949 |
| | BI238 | CBS 10431, NRRL Y-48119 | <i>V. friburgensis</i> leaves, Betânia Trail (Itapuã Park, Brazil) | DQ784569 | DQ855950 |
| | UWOPS 07JM104.2 | – | Nectar from <i>Gelsemium rankinii</i> (Georgia, USA) | EU024553 | EU024553 |
| | UWOPS 07JM104.3 | – | Nectar from <i>Gelsemium rankinii</i> (Georgia, USA) | – | – |
| <i>F. setubalensis</i> sp. nov. | 3CVF35 ^T | CBS 10241, PYCC 5952 | <i>Cistus albidus</i> leaves, Fonte do Veado (Arrábida Natural Park, Portugal) | EU002857 | EU002888 |
| | 5CSFe9 | CBS 10242 | <i>Cistus albidus</i> leaves, Mata do Solitário (Arrábida Natural Park, Portugal) | EU002858 | EU002889 |
| <i>F. taiwaniana</i> sp. nov. | TOH1-2 ^T | CBS 9927, BCRC 23028 | <i>Daphniphyllum glaucescens</i> ssp. <i>oldhamii</i> leaves, NanJen-Shan Natural Reserve of Taiwan | AY551270 | AY555071 |

*Type strain, T.

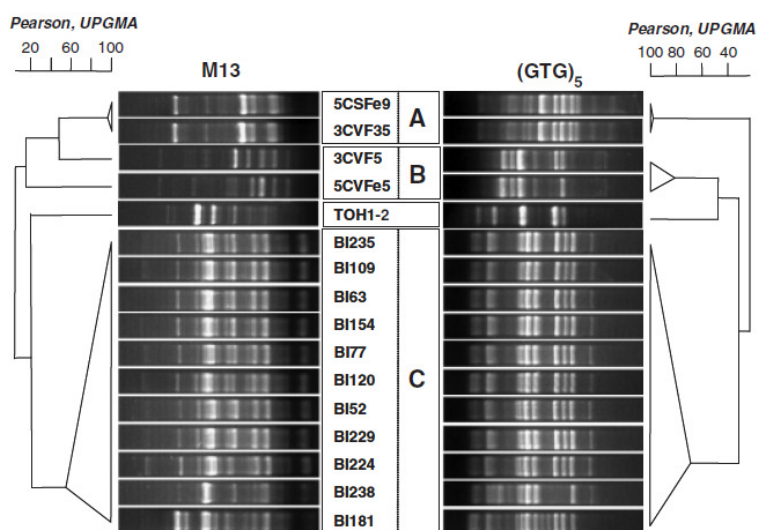


Fig. 1. MSP-PCR fingerprinting of ustilaginomycetous phyloplane isolates: DNA banding patterns obtained with primers M13 and (GTG)₅ and resulting dendrograms using Pearson's coefficient and the UPGMA clustering method.

and ITS sequences relative to their nearest neighbors (e.g. 14 mismatches to *R. acheniorum* in D1/D2). The single Taiwanese strain also presented unique D1/D2 and ITS sequences and was thus deemed to represent another novel species (four and more than 30 mismatches to strain BI120 in D1/D2 and ITS region, respectively). Following the same criteria (microsatellite-PCR cluster C, Fig. 1; see also Fig. 2), the 11 Brazilian strains appeared to represent yet a different species. Strains BI238 and BI181 had one mismatch in the D1/D2 region in comparison to all the other Brazilian isolates (Fig. 2), but identical ITS sequences (data not shown). The North American isolates (represented by strain UWOPS 07JM104.2) had two nucleotide substitutions in D1/D2 and two others in ITS compared with strain BI120 (data not shown). However this was not considered enough to exclude them from the same new species, because the morphological and physiological/biochemical profiles were identical (Table 2). Mating reactions between multiple strains within each species were negative.

The genus *Rhodotorula* is polyphyletic, with most of its members, including the type species *Rhodotorula glutinis*, distributed among several lineages within the Pucciniomycotina (Fell & Stanzell-Tallman, 1998; Bauer et al., 2006). However, a few species are placed in the Ustilaginomycotina: *R. acheniorum* in the Ustilaginales and *R. bacarum* and *Rhodotorula phylloplana* in the Microstromatales (Sampaio, 2004). The gene sequences accumulated in public databases (mainly from rRNA gene regions) have provided the basis for molecular phylogenetic analyses that have clearly shown the polyphyletic nature of *Rhodotorula*, as well as of other anamorphic genera (e.g. Scorzetti et al., 2002). Because holding on to the current circumscription of polyphyletic genera for the sake of taxonomic stability is no longer

warranted (e.g. Sampaio, 2004; Okoli et al., 2007), we decided not to include the novel species in *Rhodotorula*. Another option would be to accommodate them in the genus *Pseudozyma* that comprises yeast-like anamorphs closely related to species of *Sporisorium* and *Ustilago* (e.g. Boekhout & Fell, 1998; Sampaio, 2004). However, on the basis of molecular phylogenetic analyses (Fig. 2), our novel species, as well as *R. acheniorum* (see also Sampaio, 2004), are only distantly related to the species in the above-mentioned genera, which belong to the Ustilaginaceae (*sensu* Begerow et al., 2006). In fact, members of the 'Farysia clade' appear to belong to a sister lineage within the Ustilaginales, which contains smut genera such as *Schizonella* and *Stegocinctractia*, and may correspond to a redefined circumscription of Anthracoideaceae according to Begerow et al. (2006). Moreover, unlike *Pseudozyma* species (e.g. Boekhout & Fell, 1998), the novel taxa do not produce abundant true hyphae or assimilate inositol. A third possibility would be to include the novel species in the genus *Farysia* Raciborski due to the observed phylogenetic proximity to *F. chardoniana* (Fig. 2). However, all of our isolates originated from apparently healthy leaves or flowers of plants totally unrelated to the known *Farysia* hosts, i.e. *Carex* spp. (Vánky, 2002). Because anamorph/teleomorph connections could not be established for the three novel species from the molecular analyses (Fig. 2), the anamorph genus *Farysizyma* gen. nov. is hereby created to accommodate them, a proposal allowed by article 59 of the International Code of Botanical Nomenclature (St Louis Code). Proposal of novel anamorphic genera for putative yeast states of dimorphic plant parasites is not unprecedented and a parallel may be drawn with the teleomorph/anamorph genus pairs *Ustilago/Pseudozyma* (Boekhout, 1995) and *Taphrina/Lalaria* (Inácio et al.,

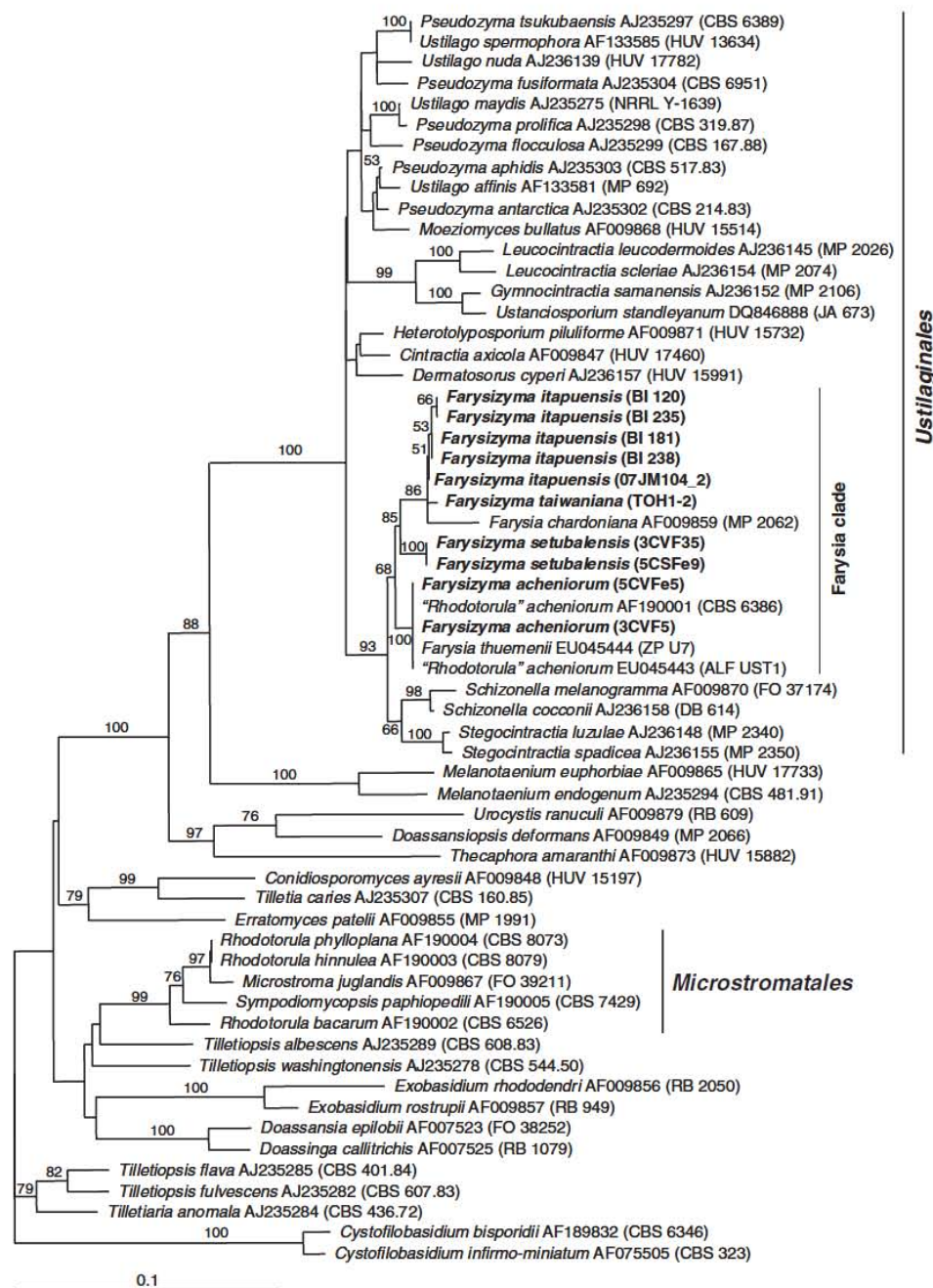


Fig. 2. Phylogenetic tree of representative phylloplane isolates and of selected species of the Ustilaginomycota obtained by neighbor-joining analysis of 26S rRNA gene (D1/D2 domains) sequences using PAUP 4.0b8. The numbers given on the branches are the frequencies (> 50%) with which a given branch appeared in 1000 bootstrap replications. *Cystofilobasidium* spp. were used as outgroup. Sequences determined by the authors of the present study are typed in boldface. Additional sequences were retrieved from GenBank (species names followed by the corresponding accession number and strain number between parentheses).

Table 2. Physiological/biochemical test responses of the newly proposed species and of *Farysizyma acheniorum*

| Test responses* | <i>Farysizyma acheniorum</i> [†] | <i>Farysizyma setubalensis</i> [‡] | <i>Farysizyma taiwaniana</i> [§] | <i>Farysizyma itapuensis</i> [¶] |
|------------------------------------|---|---|---|---|
| Glucose fermentation | – | – | – | – |
| Carbon sources | | | | |
| D-Glucose | + | + | + | + |
| D-Galactose | + | + | + | + |
| L-Sorbose | – | – | – | –, W |
| D-Glucosamine | – | – | – | –, D |
| D-Ribose | + | D | W | + |
| D-Xylose | + | + | + | + |
| L-Arabinose | + | +, D | + | + |
| D-Arabinose | V | +, D | W | V |
| L-Rhamnose | – | – | – | –, W |
| Sucrose | + | + | + | + |
| Maltose | + | +, D | + | + |
| α,α Trehalose | + | + | + | V |
| Methyl- α -D-glucoside | D | – | – | ND |
| Cellobiose | + | D | W | V |
| Salicin | – | D, W | – | –, W |
| Melibiose | + | – | + | +, W |
| Lactose | V | D | W | + |
| Raffinose | + | + | + | + |
| Melezitose | + | + | + | + |
| Inulin | – | – | W | V |
| Soluble starch | – | – | ND | V |
| Glycerol | + | D | W | + |
| Erythritol | + | +, D | W | + |
| Ribitol | D | + | – | –, D |
| Xylitol | + | – | W | W, D |
| D-Glucitol | + | + | + | +, W |
| D-Mannitol | + | + | + | +, W |
| Galactitol | D, – | – | – | W, D |
| Inositol | – | – | – | – |
| Glucono-D-lactone | V | – | W | ND |
| D-Gluconic acid | – | D, – | W | + |
| D-Glucuronic acid | V | + | – | ND |
| D-Lactic acid | + | + | W | V |
| Succinic acid | + | + | + | + |
| Citric acid | + | + | W | –, W |
| Methanol | – | – | – | – |
| Ethanol | + | + | – | –, W |
| L-Malic acid | + | + | ND | ND |
| L-Tartaric acid | – | – | ND | ND |
| N-sources | | | | |
| Nitrate | + | + | – | V |
| Nitrite | + | + | ND | + |
| Ethylamine | + | +, D | ND | – |
| L-Lysine | V | + | ND | + |
| Cadaverine | + | + | ND | ND |
| Creatine | – | – | ND | – |
| Creatinine | – | – | ND | – |
| Other tests | | | | |
| Growth in vitamin-free medium | – | – | ND | ND |
| Growth with 50% glucose | ND | ND | – | – |
| Growth with 0.01% cycloheximide | D, – | –, D | ND | ND |
| Growth with 0.1% cycloheximide | – | – | ND | ND |
| Splitting of arbutin | V | + | – | ND |
| Formation of starch-like compounds | – | – | – | – |
| Hydrolysis of urea | + | + | + | + |

Table 2. Continued.

| Test responses* | <i>Farysizyma acheniorum</i> [†] | <i>Farysizyma setubalensis</i> [‡] | <i>Farysizyma taiwaniana</i> [§] | <i>Farysizyma itapuensis</i> [¶] |
|---------------------------------------|---|---|---|---|
| Colour reaction with Diazonium Blue B | + | + | + | + |
| Growth at 25 °C | + | + | + | + |
| Growth at 30 °C | – | – | ND | – |
| Growth at 37 °C | ND | ND | – | – |

*Test results: +, positive; D, delayed positive; W, weak; –, negative; V, variable; ND, not determined.

[†]Responses for the following strains: CBS 6386^T, 3CVF5 and 5CVFe5.

[‡]Responses for the following strains: 3CVF35 and 5CSFe9.

[§]Responses for the following strain: TOH1-2.

[¶]Responses for the following strains: BI120, BI63, BI77, BI235, BI181, BI238, BI52, BI109, BI154, BI224, BI229, UWOPS 07JM104.2 and UWOPS 07JM104.3.

2004). In those cases the teleomorphs are also dimorphic plant parasites that have a plant pathogenic mycelial phase and a saprobic yeast phase, and the anamorphs are phylogenetically related yeasts that are found as epiphytes on plants other than the teleomorph hosts. The species name *Farysizyma setubalensis* sp. nov. is proposed for the Portuguese strains (5CSFe9 and 3CVF35), *F. taiwaniana* sp. nov. for the single Taiwanese strain (TOH1-2) and *F. itapuensis* sp. nov. for the Brazilian and the North American strains (Table 1). Another observation that suggests a connection between the novel taxa and *Farysia* is the fact that strain ZP U7, isolated from teliospores of *Farysia thuemenii* (J.P. Sampaio, pers. commun.), had a D1/D2 sequence identical to that of the type strain of *R. acheniorum* (Fig. 2), thus suggesting that *R. acheniorum* could represent the yeast-phase anamorph of *F. thuemenii*. However, inoculation experiments would be required to verify this hypothesis and the remaining strains identified as *R. acheniorum* originated from plants (viz. *C. albidus* and *Fragaria* spp.; Table 1; see also below) unrelated to the hosts of *F. thuemenii* (*Carex* spp.). *Rhodotorula acheniorum* is thus transferred to the newly proposed genus under a new combination, *F. acheniorum* comb. nov. In spite of the relatively low bootstrap value for the 'Farysia clade' in the phylogenetic analyses depicted in Fig. 2, we found that all the sequenced strains of *Farysia* and *Farysizyma* species had a signature sequence in the D1 region (ATGCA, starting at the homologous position 255 of the *Saccharomyces cerevisiae* LSU rRNA gene; GenBank no. J01355), which constitutes a synapomorphy for members of the clade.

The physiological profiles of the three novel species as well as that of *F. acheniorum* are very similar (Table 2). *Farysizyma setubalensis* can be differentiated from *F. acheniorum*, *F. taiwaniana* and *F. itapuensis* by the inability to assimilate melibiose and xylitol as carbon sources. *Farysizyma acheniorum* is unable to assimilate D-gluconic acid, in contrast to *F. taiwaniana* and *F. itapuensis*. The latter two species can be differentiated by the ability to assimilate galactitol.

Species of *Farysizyma* appear to occur as epiphytes on different plants, often as phylloplane colonists (Table 1), where they may represent common inhabitants. Regarding *F. acheniorum* (formerly *R. acheniorum*), strains deposited at the CBS collection, CBS 6384 and CBS 6386, were also isolated from plant sources (fruits of *Fragaria vesca*, wild strawberries; UK). A third strain isolated from leaves of *Callistemon viminalis* (*Myrtaceae*) in Australia (CBS 8078), was previously considered a representative of *R. acheniorum* (Barnett *et al.*, 2000), but a D1/D2 sequence available in the CBS yeast database (www.cbs.knaw.nl/yeast/BioloMICS.aspx) suggests that it does not belong to *F. acheniorum* (data not shown). A fourth presumptive *F. acheniorum* strain, ALF UST1 (D1/D2 sequence available in GenBank; see Fig. 2) was also isolated from garden strawberries (*Fragaria × anassa*) in Portugal (J.P. Sampaio, pers. commun.).

Latin diagnosis of *Farysizyma* Á. Fonseca gen. nov.

Genus epiphyticorum et anamorphicorum fungorum Ustilaginalium Farysiae speciebus affinium. Cellulae zymoidea enteroblastice gemmantes. Hyphae septatae non formantur. Ballistoconidia nulla. Inositolum non assimilatur. Productio compositorum amylosimilium nulla. Assimilatio kalii nitratii variabilis. Typus *Farysizyma itapuensis* M. F. Landell et P. Valente sp. nov.

Etymology: the genus name refers to the fact that the species included therein are either yeast-phase anamorphs of the smut genus *Farysia* or closely related epiphytic yeasts, as suggested by the molecular phylogenetic evidence.

Description of *Farysizyma* Á. Fonseca gen. nov.

Genus of epiphytic and anamorphic fungi that belongs to the *Ustilaginales* and is closely related to species of the genus *Farysia*. Yeast cells reproduce by enteroblastic budding. Septate hyphae are not formed. Ballistoconidia are absent. Inositol is not assimilated. Starch-like compounds are not

formed. Nitrate assimilation is variable. Type species: *Farysizyma itapuensis* M.F. Landell & P. Valente sp. nov.

***Farysizyma acheniorum* (Buhagiar & J.A. Barnett) Á. Fonseca, comb. nov.**

Basionym: *Sterigmatomyces acheniorum* Buhagiar R.W.M. & J.A. Barnett; in *J Gen Microbiol* 77:78 (1973); type strain: CBS 6386. Synonym: *R. acheniorum* (Buhagiar & J.A. Barnett) Rodrigues de Miranda, in von Arx et al., *Stud Mycol* 14:28 (1977). Novel strains: CBS 10244 (3CVF5), CBS 10244 (5CVF5; see Table 1 and Fig. 2); ALF UST1 (from strawberries, see Fig. 2).

Latin diagnosis of *Farysizyma itapuensis* M.F. Landell & P. Valente sp. nov.

Status teleomorphosis incognitus. In liquido YM, post dies 3 ad 25 °C, cellulae vegetativae ovoideae, ellipsoideae vel elongatae, 2.3–7.7 µm × 1.5–2.3 µm, singulae aut binae. Pellicula formatur post dies 14. Hyphae et pseudohyphae non formatur. Ballistoconidia nulla. Fermentatio nulla. In tabula (Table 2) characteres biochemices physiologicesque declarates sunt. Characteres moleculares (culturae typi): sequentia acidi nucleici 'rDNA ITS' et '26S (D1/D2)', DQ767831, in collectione sequentiarum acidi nucleici NCBI (GenBank) deposita est. Typus: BI120 (= CBS 10428^T; NRRL Y-48116^T) isolatus ex *V. friburgensis* in Brasilia.

Description of *F. itapuensis* M.F. Landell & P. Valente sp. nov.

Etymology: *Farysizyma itapuensis* – this Latin-derived epithet refers to the fact that the type strain was isolated in Itapuã Park (Rio Grande do Sul, Brazil).

Teleomorphic state unknown. In YM broth after 3 days at 25 °C, the vegetative cells are ovoid, ellipsoidal to elongate 2.3–7.7 µm × 1.5–2.3 µm, occur singly, in parent–bud pairs. A pellicle is formed after 14 days. On GYP agar, after 7 days at 25 °C, the streak culture is butyrous, cream, plain, undulate and with regular margin, brilliant. After 14 days the colonies dry up and become yellow dark. In Dalmau plate cultures on corn meal agar after 2 weeks true hyphae are not formed. Ballistoconidia are not formed. Glucose fermentation is absent. Physiological and biochemical characteristics are presented in Table 2. Results of additional physiological tests for strains UWOPS 07JM104.2 and UWOPS 07JM104.3: growth in *N*-acetyl-D-glucosamine; weak growth in methyl-α-D-glucoside and 2-keto-D-gluconate; delayed growth in glucono D-lactone and D-glucuronic acid; no growth in hexadecane; growth in cadaverine; delayed growth in 0.01% cycloheximide; no growth in 0.1% cycloheximide; weak growth in vitamin-free medium; growth without aminoacids; no growth in 1% acetic acid or

16% NaCl; no acid production or lipase activity; negative or delayed gelatin liquefaction. Molecular characteristics (type strain): sequence of the ITS region and D1/D2 domains of the rRNA gene 26S deposited in NCBI (GenBank accession DQ767831). Type strain: BI120 (= CBS 10428^T; NRRL Y-48116^T). The type strain BI120 as well as strains BI52, BI63, BI77, BI109, BI154, BI181, BI224, BI229, BI235 and BI238 were isolated from leaves of the bromeliads in Itapuã Park, Rio Grande do Sul/Brazil and have been deposited in the Centraalbureau voor Schimmecultures and ARS Yeast Culture Collections (Table 1). Strains UWOPS 07JM104.2 and UWOPS 07JM104.3 were isolated from nectar of *Gelsemium rankinii* in GA, USA (Table 1).

Latin diagnosis of *Farysizyma taiwaniana* P.-H. Wang, Y.-T. Wang & S.-H. Yang sp. nov.

Status teleomorphosis incognitus. In medio liquido YM post 3 dies ad 26 °C, cellulae ovoideae vel ellipsoideae 3–4 × 1–2 µm, singulae aut binae. Hyphae et pseudohyphae non formatur. Fermentatio nulla. In tabula (Table 2) characteres biochemices physiologicesque declarates sunt. Characteres moleculares (culturae typi): sequentiae acidi nucleici 'rDNA 26S (D1/D2)', AY551270, et 'rDNA ITS', AY555071, in collectione sequentiarum acidi nucleici NCBI (GenBank) depositae sunt. Typus: TOH1-2 (= CBS 9927^T, BCRC 23028^T) isolatus ex *D. glaucescens* in Formosa.

Description of *F. taiwaniana* P.-H. Wang, Y.-T. Wang & S.-H. Yang sp. nov.

Etymology: *Farysizyma taiwaniana* – this Latin-derived epithet refers to the fact that the species was isolated in Taiwan (NanJen-Shan Natural Reserve).

Teleomorphic state unknown. In YM broth after 3 days growth at 26 °C, the cells are ovoid to ellipsoid, occur singly or in pairs and measure 3–4 µm × 1–2 µm. Budding is unipolar, bipolar or multilateral. TOH1-2 give rise to convex, circular, mot, smooth cream butyrous colony, presence of carotenoid pigments, no fermentation, no ballistospores. No sexual state is observed from pure culture plated on YM agar or malt agar. Under these conditions, no hyphae or pseudohyphae are formed. After 7 days Dalmau plate culture on corn meal agar, neither pseudomycelium nor true mycelium was produced. Physiological and biochemical characteristics are presented in Table 2. Results of additional physiological tests: growth in 2-keto-D-gluconate and propane-1,2-diol; weak growth in L-arabinitol; no growth in D-galacturonate, 5-keto-D-gluconate and butane-2,3-diol. Molecular characteristics (type strain): sequences of the D1/D2 domains of the rRNA gene 26S and of the ITS region deposited in NCBI (GenBank accessions: AY551270 and AY555071, respectively). Type strain: TOH1-2 (= CBS 9927^T, BCRC 23028^T). The type

strain was isolated from the phylloplane of *D. glaucescens* ssp. *oldhamii* in NanJen-Shan Natural Reserve of Taiwan.

Latin diagnosis of *Farysizyma setubalensis*

Á. Fonseca & J. Inácio sp. nov.

Status teleomorphosis incognitus. In medio liquido YM post 3 dies ad 25 °C, cellulae elongatae vel ellipsoideae 3.7–4.5 × 1.1–1.5 µm. Hyphae et pseudohyphae non formatur. Fermentatio nulla. In tabula (Table 2) characteres biochemices physiologicesque declarates sunt. Characteres moleculares (culturae typi): sequentiae acidi nucleici 'rDNA 26S (D1/D2)', EU002857, et 'rDNA ITS', EU002888, in collectione sequentiarum acidi nucleici NCBI (GenBank) depositae sunt. Typus: 3CVF35 (= CBS 10241^T, PYCC 5952) isolatus ex *C. albidus* in Lusitania.

Description of *F. setubalensis* Á. Fonseca & J. Inácio sp. nov.

Etymology: *Farysizyma setubalensis* – this Latin-derived epithet refers to the fact that the species was isolated in the Setúbal region (Portugal).

Teleomorph state unknown. After 3 days at 25 °C in YM broth the cells are ellipsoidal or elongate, 3.7–4.5 µm × 1.1–1.5 µm. After 5–7 days at 25 °C in MYP agar, the cultures are pale to dark brownish cream. No hyphae or pseudohyphae were observed. Physiological and biochemical characteristics are presented in Table 2. Molecular characteristics (type strain): sequences of the D1/D2 domains of the rRNA gene 26S and of the ITS region deposited in NCBI (GenBank accessions: EU002857 and EU002888, respectively). Type strain: 3CVF35 (= CBS 10241^T, PYCC 5952). The type strain as well as strain 5CSFe9 (= CBS 10242) were isolated from the phylloplane of *C. albidus* in the Arrábida Natural Park, Portugal (Table 1).

Acknowledgements

M.E.L. and P.V. acknowledge financial support from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (Fapergs – process no. 02/1754-0) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – process no. 477528/2003-1). M.E.L. received a fellowship from CNPq. J.I. holds a Post-doc fellowship (SFRH/BPD/18453/2004) from Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal. The Portuguese yeast survey was partially supported by project contract no. Praxis XXI/2/2.1/BIA/413/94 (Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal). P.H.W. was funded by the National Science Council, Taiwan (NSC 92-2621-B-031-001). The North American work was funded by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to M.-A.L. and J.D. Thompson. We are also grateful to Pierre Evrard at BCCM/MUCL

Industrial Fungi & Yeasts Collection, Belgium, for assisting with the Allev analysis, and to José Paulo Sampaio at Centro de Recursos Microbiológicos, Portugal, for depositing D1/D2 sequences of strains ZPU7 and ALFUST1 in GenBank and sharing unpublished observations on strain ZPU7. We thank Michael Weiss (University of Tübingen, Germany) for correcting the Latin diagnosis of the novel genus. J.S.M. thanks J. Pascarella and H. Coiner for field assistance.

References

- Avis TJ & Bélanger RR (2002) Mechanisms and means of detection of biocontrol activity of *Pseudozyma* yeasts against plant-pathogenic fungi. *FEMS Yeast Res* 2: 5–8.
- Barnett JA, Payne RW & Yarrow D (2000) *Yeasts: Characteristics and Identification*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bauer R, Begerow D, Sampaio JP, Weiß M & Oberwinkler F (2006) The simple-septate basidiomycetes: a synopsis. *Mycol Progress* 5: 41–66.
- Begerow D, Stoll M & Bauer R (2006) A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia* 98: 906–916.
- Boekhout T (1995) *Pseudozyma* Bandoni emend. Boekhout, a genus for yeast-like anamorphs of *Ustilaginales*. *J Gen Appl Microbiol* 41: 359–366.
- Boekhout T & Fell JW (1998) *Pseudozyma* Bandoni emend. Boekhout and a comparison with the yeast state of *Ustilago maydis* (de Candolle) Corda. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 790–797. Elsevier Science Pub, Amsterdam.
- Feldbrügge M, Kämper J, Steinberg G & Kahmann R (2004) Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Op Microbiol* 7: 666–672.
- Fell JW & Stanzell-Tallman A (1998) *Rhodotorula* F. C. Harrison. *The Yeasts, a Taxonomic study*, 4th edn (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 800–827. Elsevier Science Pub, Amsterdam.
- Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G & Stanzell-Tallman A (2000) Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 1351–1371.
- Fonseca A (1992) Utilization of tartaric acid and related compounds by yeasts: taxonomic implications. *Can J Microbiol* 38: 1242–1251.
- Grigorova D, Pavlova K & Panchev I (1999) Preparation and preliminary characterization of exopolysaccharides by yeast *Rhodotorula acheniorum* MC. *Appl Biochem Biotechnol* 81: 181–191.
- Inácio J, Pereira P, Carvalho M, Fonseca Á, Amaral-Collaco MT & Spencer-Martins I (2002) Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a mediterranean-type ecosystem in Portugal. *Microb Ecol* 44: 344–353.
- Inácio J, Rodrigues MG, Sobral P & Fonseca Á (2004) Characterisation and classification of phylloplane yeasts from

- Portugal related to the genus *Taphrina* and description of five novel *Lalaria* species. *FEMS Yeast Res* **4**: 541–555.
- Kurtzman CP & Fell JW (1998) *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th edn. Elsevier Science Pub, Amsterdam.
- Lachance MA, Bowles JM, Starmer WT & Barker JSF (1999) *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian *Hibiscus* flowers. *Can J Microbiol* **45**: 172–177.
- Manson JS, Lachance MA & Thomson JD (2007) *Candida gelsemii* sp. nov., a yeast of the *Metschnikowiaceae* clade isolated from nectar of the poisonous Carolina Jessamine. *Antonie van Leeuwenhoek* **92**: 37–42.
- Martinez-Espinoza AD, Garcia-Pedrajas MD & Gold SE (2002) The *Ustilaginales* as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol* **35**: 1–20.
- Okoli I, Oyeka CA, Kwon-Chung KJ et al. (2007) *Cryptotrichosporon anacardii* gen.nov., sp.nov., a new trichosporonoid capsulate basidiomycetous yeast from Nigeria that is able to form melanin on niger seed agar. *FEMS Yeast Res* **7**: 339–350.
- Robert V, Evrard P & Hennebert GL (1997) BCCMTM/Allev 2.00 an automated system for the identification of yeasts. *Mycotaxon* **64**: 455–463.
- Sampaio JP (1994) Utilization of low molecular weight lignin-related aromatic compounds for the selective isolation of yeasts: *Rhodotorula vanillica*, a new basidiomycetous yeast species. *Syst Appl Microbiol* **17**: 613–619.
- Sampaio JP (2004) Diversity, phylogeny and classification of basidiomycetous yeasts. *Frontiers in Basidiomycote Mycology* (Agerer R, Blanz P & Piepenbring M, eds), pp. 49–80. IHW – Verlag, Germany.
- Sampaio JP, Gadanho M, Santos S, Duarte FL, Pais C, Fonseca Á & Fell JW (2001) Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 687–697.
- Scorzetti G, Fell JW, Fonseca A & Statzell-Tallman A (2002) Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res* **2**: 495–517.
- Sugita T, Takashima M, Poonwan N, Mekha N, Malaithao K, Thungmuthasawat B, Prasarn S, Luangsook P & Kudo T (2003) The first isolation of Ustilaginomycetous anamorphic yeasts, *Pseudozyma* species, from patient's blood and a description of two new species: *P. parantarctica* and *P. thailandica*. *Microbiol Immunol* **47**: 183–190.
- Swann EC & Taylor JW (1995) Phylogenetic perspectives on basidiomycete systematics: evidence from the 18S rRNA gene. *Can J Bot* **73**: S862–S868.
- Vánky K (2002) *Illustrated Genera of Smut Fungi*, 2nd edn. APS Press, St Paul.
- Yarrow D (1998) Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeasts. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th edn (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 77–100. Elsevier Sci. Pub, Amsterdam.

5. CAPÍTULO 2:

***Cryptococcus bromeliarum* sp. nov., an orange coloured basidiomycetous yeast isolated from bromeliads in Brazil**

Publicado na revista:

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

(2009), 59, 910 - 913

Cryptococcus bromeliarum sp. nov., an orange-coloured basidiomycetous yeast isolated from bromeliads in Brazil

Melissa Fontes Landell,^{1,2} João Inacio,³ Álvaro Fonseca,³
Marilene H. Vainstein^{1,2} and Patricia Valente^{1,2}

Correspondence

Patricia Valente

patricia.valente@ufrgs.br

¹Departamento de Microbiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS), Brazil

²Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS), Brazil

³Centro de Recursos Microbiológicos (CREM), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica, Portugal

During a survey of yeasts associated with the phylloplane of several bromeliad species in Itapuã Park in southern Brazil, we isolated four orange-coloured strains which were found to represent a novel anamorphic tremellaceous (Tremellales, Agaricomycotina, Basidiomycota) yeast species, *Cryptococcus bromeliarum* sp. nov. (type strain BI20^T = CBS 10424^T = NRRL Y-48112^T). PCR-fingerprinting profiles of the four strains with primers M13 and (GTG)₅ were almost identical, which suggested conspecificity among the isolates. On the basis of D1/D2 26S rDNA sequence analysis, *C. bromeliarum* is phylogenetically closely related to other orange-coloured *Cryptococcus* species, namely *Cryptococcus armeniacus*, *C. amylolyticus*, *C. tibetensis* and *C. cistialbidi*, but differed from these species by at least six nucleotide substitutions and was thus considered a separate species. Physiological differences from *C. armeniacus*, *C. amylolyticus* and *C. cistialbidi* included the inability of *C. bromeliarum* to assimilate citrate and to form starch-like compounds. Differentiation from *C. tibetensis* can be achieved by the ability of the latter to assimilate ethylamine.

In recent years, Inácio *et al.* (2005) and Wang *et al.* (2007) have described novel tremellaceous yeast species with orange-coloured colonies, a characteristic that was previously considered rare among these yeasts. Four of these species were classified in the genus *Cryptococcus*, mainly due to their phenotypic characteristics and their placement on phylogenetic trees constructed on the basis of D1/D2 26S rDNA sequence analysis. *Cryptococcus cistialbidi* and *Cryptococcus amylolyticus* were isolated from leaves of *Cistus albidus*, while *Cryptococcus armeniacus* was a culture contaminant from air, all of them isolated in Portugal (Inácio *et al.*, 2005). Phylogenetic analysis of the D1/D2 sequences of these species demonstrated that *C. cistialbidi* appears to be loosely connected to the Aurantia clade of *Tremella*, whereas the other two species seem to be sister species that are not linked to any particular clade of the Tremellales. *Cryptococcus tibetensis*, isolated from leaves of different plants in Tibet, formed a well-supported clade with *C. armeniacus* and *C. amylolyticus* (Wang *et al.*, 2007).

Abbreviation: ITS, internal transcribed spacer.

The GenBank/EMBL/DDJB accession numbers for the sequences of the D1/D2 domain of the 26S rDNA and the ITS region of strain BI20^T are DQ784566 and EU386359, respectively.

During a survey of yeasts associated with the phylloplane of bromeliads in the south of Brazil, four orange-coloured isolates were obtained that belong to this clade (Landell *et al.*, 2006). As they could not be assigned to any known species, we propose to accommodate these strains in a novel species, *Cryptococcus bromeliarum* sp. nov.

Samples of the bromeliads *Vriesea procera*, *Vriesea friburgensis* and *Tillandsia gardneri* were collected in April and May 2004 in Pedreira Beach in Itapuã Park in southern Brazil (approx. coordinates 30° 22' S 51° 04' W). The leaves were processed as described previously (Landell *et al.*, 2006). Representative colonies of the different morphological types were purified and maintained on agar slants at 4 °C, covered with sterile mineral oil. Strain BI20^T was obtained from leaves of *V. procera*, strain BI68 from *V. friburgensis* and strains BI79 and BI133 from *T. gardneri*. Phenotypic characterization of the isolates was performed according to Yarrow (1998) and Barnett *et al.* (2000).

The D1/D2 domains of the 26S rDNA and the internal transcribed spacer (ITS) region of strain BI20^T were amplified by PCR as described previously (Lachance *et al.*, 1999). The resulting amplicons were concentrated and purified with either Qiaquick PCR columns (Qiagen) or

the GFX Band Purification kit (Amersham Biosciences). Cycle sequencing employed standard protocols with primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') and NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') for the D1/D2 domains and ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') for the ITS region. Sequences were obtained with either an ALFexpress II DNA Analyser (Amersham Pharmacia Biotech) or an ABI DNA Sequencer (Applied Biosystems), according to the manufacturers' instructions. Sequences were aligned with the CLUSTAL algorithm of MEGALIGN (DNASTAR). Phylogenetic trees were computed with MEGA 4.0 using the neighbour-joining method (Tamura *et al.*, 2007). Gaps were treated as missing data.

PCR fingerprinting followed the protocols described in Sampaio *et al.* (2001), using the primers M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT) and (GTG)₅. Gel electrophoresis images were acquired with the GelDoc XR System software (Bio-Rad).

The four strains isolated from bromeliad species presented a unique combination of characteristics: production of orange-coloured colonies, assimilation of inositol and inability to produce ballistoconidia. PCR-fingerprinting profiles with primers M13 and (GTG)₅ were almost identical, suggesting conspecificity (Fig. 1). Sequencing of isolate BI20^T confirmed that they belong to a previously undescribed species, with 6 substitutions in the D1/D2 26S rDNA and 8 substitutions in the ITS region compared with the closest sequence match, *C. armeniacus* PYCC 5855^T (Fig. 2). The novel species *C. bromeliarum* is phylogeneti-

cally close to *C. armeniacus*, *C. amylolyticus* and *C. tibetensis*, three orange-coloured *Cryptococcus* species that form an isolated cluster in the Tremellales (Fig. 2). Trees constructed using maximum-parsimony showed a similar topology to those constructed using neighbour-joining (not shown). The relatedness to the Aurantia/*C. cistialbidi* clade has low bootstrap support. *C. bromeliarum* differs from *C. amylolyticus*, *C. cistialbidi* and *C. tibetensis* by 22, 42 and 16 nucleotide substitutions in the D1/D2 region, respectively, and also differs from *C. tibetensis* by 46 substitutions plus several deletions in the ITS region. ITS sequences from the other species are not available in GenBank. Physiological differentiation from *C. armeniacus*, *C. amylolyticus* and *C. cistialbidi* is possible by means of negative citrate assimilation and no formation of starch-like compounds, while differentiation from *C. tibetensis* can be achieved by negative ethylamine assimilation (Table 1).

Inácio *et al.* (2005) chose to include *C. armeniacus* and *C. amylolyticus*, as well as *C. cistialbidi*, in the genus *Cryptococcus* because the species fit its current delineation closely, in spite of the loose definition of the genus. Wang *et al.* (2007) included *C. tibetensis* in the same genus because it clustered with *C. armeniacus* and *C. amylolyticus* in the D1/D2 phylogenetic tree, but both groups of authors suggest that this cluster could represent a new yeast genus. *C. bromeliarum* is the fourth described species in the *C. armeniacus* clade. A better circumscription of this clade would clearly benefit from the description of additional species in this group of orange-coloured tremellaceous yeasts, as well as the determination of sequences from additional genes that could provide the necessary phylogenetic support for the creation of a new genus.

C. bromeliarum was isolated from different bromeliads (*V. procera*, *V. friburgensis* and *T. gardneri*) on a trail located at Pedreira Beach in Itapuã Park. Although sampling was performed from the same bromeliads at another site in the park (Fora Beach), we were unable to find any representatives of *C. bromeliarum*. More sampling should be performed in order to confirm whether *C. bromeliarum* really has a limited distribution in the park, information that is crucial for the study of its ecology.

Description of *Cryptococcus bromeliarum* M. F. Landell & P. Valente sp. nov.

Cryptococcus bromeliarum (bro.me'li.ar.um. N.L. masc. adj. *bromeliarum* associated with bromelias, the substrate from which the first strains were isolated).

In GYP broth after 7 days at 25 °C, vegetative cells are ellipsoidal and ovoid, 3 × 6 µm, and occur singly, in parent-bud pairs. Sexual reproduction has not been observed. Sediment is formed. On GYP agar, after 1 week at 25 °C, the streak culture is light orange in colour, the surface is glossy and smooth, the texture is mucous and margins are entire. In Dalmau plate culture, true hyphae are not formed. Ballistoconidia are not produced. Fermentation ability is negative. Assimilation of carbon

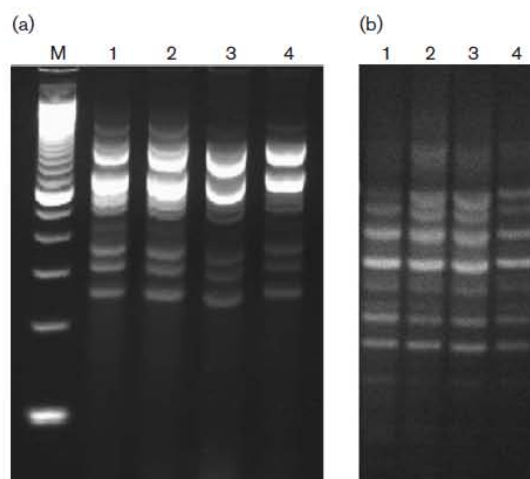


Fig. 1. PCR fingerprinting of strains of *Cryptococcus bromeliarum* sp. nov. (a) DNA banding patterns obtained with primer (GTG)₅. Lanes: M, markers (1 kb Plus DNA ladder); 1, strain BI20^T; 2, strain BI68; 3, strain BI79; 4, strain BI133. (b) DNA banding patterns obtained with primer M13. Lanes: 1, strain BI20^T; 2, strain BI68; 3, strain BI79; 4, strain BI133.

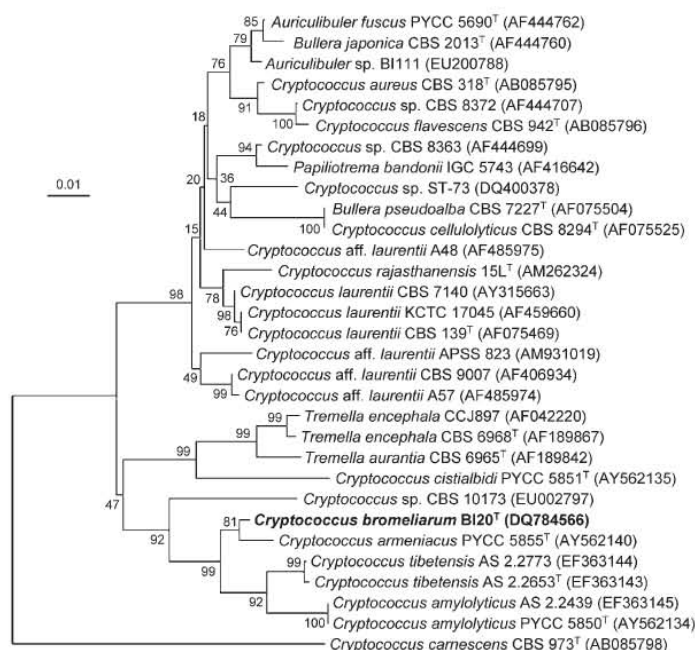


Fig. 2. Phylogenetic tree based on sequences of the D1/D2 region of the 26S rDNA showing the phylogenetic placement of *C. bromelium* sp. nov. BI20^T. The tree was obtained by neighbour-joining analysis using MEGA 4.0. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

compounds: *N*-acetylglucosamine, *D*-arabinose, *L*-arabinose, cellobiose (variable), galactose, *D*-glucitol, *D*-gluconic acid, *D*-glucosamine (variable), *D*-glucose, glycerol (variable), inositol, lactose, maltose, mannitol, melezitose, melibiose, raffinose, *L*-rhamnose, ribitol (variable), ribose,

Table 1. Differential physiological characteristics of *C. bromelium* sp. nov. compared with related orange-coloured species

Species: 1, *C. bromelium* sp. nov. (data for strains BI20^T, BI68, BI79 and BI133); 2, *C. armeniacus*; 3, *C. amylolyticus*; 4, *C. tibetensis*; 5, *C. cistialbidi*. Data for reference species were taken from Wang *et al.* (2007) (*C. tibetensis*) and Inácio *et al.* (2005) (remaining species). +, Positive; D, delayed; w, weak; -, negative; v, variable; ND, no data available.

| Characteristic | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------------------------|---------|---|---|---------|------|
| Assimilation of: | | | | | |
| Cellobiose | v | + | + | + | + |
| Citrate | - | D | + | - | + |
| Galactitol | -(w, D) | w | D | v | + |
| <i>D</i> -Gluconate | + | D | D | ND | -(D) |
| <i>D</i> -Glucosamine | v | + | + | +(D) | + |
| Glycerol | v | w | D | - | D |
| Ribitol | +(-, D) | D | + | +(D) | + |
| Soluble starch | v | w | + | +(D, w) | - |
| Ethylamine | - | - | + | + | - |
| Lysine | v | D | + | -(w) | + |
| Nitrite | v | - | + | - | - |
| Production of starch-like compounds | - | + | + | - | + |

salicin (variable), soluble starch (variable), succinic acid, sucrose, trehalose, xylitol and xylose are assimilated; no growth occurs on acetone, citrate, *meso*-erythritol, ethanol, ethyl acetate, galactitol, hexadecane, inulin, lactate, methanol, 2-propanol or *L*-sorbose. Assimilation of nitrogen compounds: lysine (variable) and sodium nitrite (variable) are assimilated; no growth on creatine, creatinine, ethylamine or sodium nitrate. No growth at 37 °C or on 1% acetic acid. Acid formation is negative. Gelatin liquefaction is negative and casein hydrolysis is positive. No growth on GYP broth with 10 or 16% NaCl or on 50% glucose/yeast extract/peptone agar. Production of starch-like compounds is negative. Urease activity is positive. Diazonium blue B reaction is positive.

The type strain, BI20^T, and three other strains (BI68, BI79 and BI133) were isolated from leaves of bromeliads in Itapuã Park, Rio Grande do Sul, Brazil. Strains BI20 and BI79 have been deposited in the Yeast Collection of the Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, and the ARS Culture Collection, Peoria, IL, USA, as CBS 10424^T = NRRL Y-48112^T and CBS 10427 = NRRL Y-48113, respectively.

Latin diagnosis of *Cryptococcus bromelium* M. F. Landell et P. Valente sp. nov.

In medium liquido dextrosum et peptonum et extractum fermenti continente post 7 dies ad 25 °C cellulae vegetativae ellipsoideae et ovoideae, 3 × 6 µm, singulae vel binae. Sedimentum formatur. Cultura in GYP agar post dies 7 ad 25 °C mucosescens, aurantiaca, glabra, nitida et margo

integer. In Dalmau plate *nec mycelium nec pseudomycelium formatur*. *Ballistosporae nullae*. *Fermentatio nulla*. *N-Acetylglucosaminum, acidum gluconicum, acidum succinicum, amyllum solubile (variabile), D-arabinosum, L-arabinosum, cellobiosum (variabile), galactosum, D-glucitolum, glucosaminum (variabile), glucosum, glycerolum (variabile), inositolum, lactosum, maltosum, D-mannitolum, melezitosum, melibiosum, raffinose, L-rhamnosum, ribitolum (variabile), D-ribosum, salicinum (variabile), sucrosam, trehalosum, xylitolum, D-xylosum assimilantur*. *Acetonum, citratum, erythritolum, ethanolum, galactitolum, hexadecanum, inulinum, DL-lactatum, methanolum, 2-propanolum, L-sorbosum non assimilantur*. *Lysinum (variabile) et natrii nitritum (variabile) assimilantur, sed non creatinum, creatinum, ethylaminum, et natrii nitratum*. *Non crescit in 37 °C. In medio cum 50 % glucoso non crescit. In medio cum 10 % et 16 % NaCl non crescit. Materia amyloidea iodophila non formatur. Ureum finditur. Reactio Diazonii coerulei B positivum*.

Typus: BI20^T (=NRRL Y-48112^T =CBS 10424^T), *designat stirpem typicam*. *Isolata ex folio bromeliaceae, Itapuã Park, Brazil. Preservatus in* Centraalbureau voor Schimmecultures, Utrecht, The Netherlands *et in* ARS Culture Collection, Peoria, IL, USA.

Acknowledgements

The authors thank Dr Carlos Rosa for the confirmation of some biochemical tests and Professor Marc-André Lachance for preliminary sequencing of the D1/D2 region of strain BI20^T. We are also grateful for financial support from FAPERGS (grant no. 02/1754-0) and from

CNPq (grant no. 477528/2003-1). M. F. L. received a fellowship from CAPES.

References

- Barnett, J. A., Payne, R. W. & Yarrow, D. (2000). *Yeasts, Characteristics and Identification*, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press.
- Inácio, J., Portugal, L., Spencer-Martins, I. & Fonseca, A. (2005). Phylloplane yeasts from Portugal: seven novel anamorphic species in the Tremellales lineage of the Hymenomycetes (Basidiomycota) producing orange-coloured colonies. *FEMS Yeast Res* 5, 1167–1183.
- Lachance, M.-A., Bowles, J. M., Starmer, W. T. & Barker, J. S. F. (1999). *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian *Hibiscus* flowers. *Can J Microbiol* 45, 172–177.
- Landell, M. F., Mautone, J. N. & Valente, P. (2006). Biodiversity of yeasts associated to bromeliads in Itapuã Park, Viamão/RS. *Biociencias* 14, 144–149 in Portuguese with English abstract.
- Sampaio, J. P., Gadanho, M., Santos, S., Duarte, F. L., Pais, C., Fonseca, A. & Fell, J. W. (2001). Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospiridium*: *Rhodospiridium kratochvilovae* and related anamorphic species. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 687–697.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596–1599.
- Wang, Q.-M., Wang, S.-A., Jia, J.-H. & Bai, F.-Y. (2007). *Cryptococcus tibetensis* sp. nov., a novel basidiomycetous anamorphic yeast species isolated from plant leaves. *J Gen Appl Microbiol* 53, 281–285.
- Yarrow, D. (1998). Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 4th edn, pp. 77–100. Edited by C. P. Kurtzman & J. W. Fell. Amsterdam: Elsevier Science.

6. CAPÍTULO 3:

***Candida aechmeae* sp. nov. and *Candida vrieseae* sp. nov. two new yeast species isolated from the phylloplane of bromeliads in Southern Brazil.**

Artigo aceito para publicação na revista (*in Press*):

**International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
(2009), 59, in Press.**

1 ***Candida aechmeae* sp. nov. and *Candida vrieseae* sp. nov. two new yeast**
2 **species isolated from the phylloplane of bromeliads in Southern Brazil.**

3
4
5 Melissa Fontes Landell^{a,b*}, Raisal Billodre^a, Jesus P. Ramos^c, Orílio Leoncini^d,
6 Marilene H. Vainstein^{a,b}, Patrícia Valente^{a,b}.

7 ^aDepartamento de Microbiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do
8 Sul, Porto Alegre – RS, Brazil.

9 ^bCentro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto
10 Alegre – RS, Brazil.

11 ^cFundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro – RJ, Brazil.

12 ^dInstituto do Câncer, Rio de Janeiro – RJ, Brazil.

13
14 * Correspondence to: Melissa Fontes Landell, Departamento de Microbiologia,
15 ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 sala
16 158, Cep: 90.050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel. (+55) 51-33084196 Fax. (+55)
17 51-33083445 (e-mail: melissa.landell@gmail.com)

18
19
20
21 Running title: ***Candida aechmeae* sp. nov. and *Candida vrieseae* sp. nov.**

22

1 **Summary**

2 Two new yeast species, *Candida aechmeae* sp. nov and *Candida vrieseae* sp.
3 nov., were isolated from bromeliads in Itapuã Park/RS- Brazil. These species are
4 genetically isolated from all other currently accepted ascomycetous yeasts based on
5 their sequence divergence in the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene. *C.*
6 *aechmeae* sp. nov. is phylogenetically close to *C. ubatubensis*, a species also
7 isolated from bromeliads in Brazil, but which can be differentiated from it by the
8 D1/D2 domain, and the positive assimilation of L-arabinose, raffinose, inulin and
9 citrate. *Candida vrieseae* sp. nov. is phylogenetically placed in a clade near *C.*
10 *membranifaciens* composed of several species associated with insects, but can be
11 differentiated from them by the D1/D2 and ITS sequences, positive assimilation of
12 nitrite and negative assimilation of ethylamine. The type strains are *C. aechmeae*
13 BI153^T (=CBS 10831 = NRRL Y-48456) and *C. vrieseae* BI146^T (=CBS 10829 =
14 NRRL Y-48461).

15

16 **Abbreviations**

17 D1/D2, D1/D2 domain of the LSU rRNA gene;

18

19 The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the sequences of the D1/D2
20 domain of the LSU rRNA gene of strains BI153^T (CBS 10831^T= NRRL Y-48456^T)
21 and BI146^T (=CBS 10829^T = NRRL Y-48461^T) are EU678950 and EU200785,
22 respectively.

23

1 **1. Introduction**

2 The Atlantic forest is one of the richest in terms of biodiversity and, at the same time,
3 one of the most threatened. Bromeliads are typically abundant plants in the Atlantic
4 Forest, and sustain a great diversity of organisms, including yeasts and animals
5 which can act as yeast vectors (Hagler *et al.*, 1993; Araújo *et al.*, 1998; Landell *et al.*,
6 2006). New yeast species have been isolated from the water tanks and leaves of
7 bromeliads in Brazil, showing the high microbial diversity associated to this substrate
8 (Ruivo *et al.*, 2005; Inacio *et al.*, 2008; Landell *et al.*, 2009).

9 During a survey of yeasts associated with bromeliads in South Brazil, two new
10 species of ascomycetous yeasts were isolated from the phylloplane and tank water of
11 different bromeliads. The sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene
12 showed that these species are genetically distinct from all currently accepted
13 ascomycetous yeasts.

14

15 **2. Materials and methods**

16 Leaves of the bromeliads *Aechmea recurvata* and *Billbergia nutans*, and
17 samples of the tank water of the bromeliad *Vriesea gigantea* were aseptically
18 collected in April and May 2004 in Itapuã Park, South of Brazil (approx. coordinates:
19 30° 22' S / 51° 04' W). Leaves were collected in polyethylene plastic bags,
20 transported to the laboratory and washed with sterile distilled water. Bromeliad
21 fragments totaling 10 cm² were placed in Erlenmeyers with 50 mL sterile distilled
22 water and maintained on the shaker for 10 minutes. The water was discarded and
23 replaced by 30 mL of 0.5% Tween 20, followed by vigorous shaking for 30 minutes.
24 This last step was repeated once, and decimal dilutions of the last washing were
25 spread on acidified YM agar (1% glucose, 0.3% malt extract, 0.3% yeast extract,

1 0.5% peptone, 2% agar, acidified to pH 4.0, and supplemented with 0.04%
2 chloramphenicol) plates. After incubation at 20 - 25°C for up to 7 days, representative
3 colonies of the different morphological types were purified, and maintained on agar
4 slants at 4°C, covered with sterile mineral oil. Phenotypic characterization of the
5 isolates was performed according to Yarrow (1998), and Barnett *et al.* (2000).
6 Ascospore formation was determined for all isolates with similar or identical D1/D2
7 sequences in all combinations on acetate agar and diluted (1:19) V8 agar at 25 °C
8 (Barnett *et al.* 2000) and observed periodically up to one month.

9 Yeast DNA was extracted and purified according to Ramos *et al.* (2001). The
10 divergent D1/D2 domain of the LSU rRNA gene was amplified with NL1 and NL4
11 primers (O'Donnell, 1993). Amplification conditions were as follows: one initial cycle
12 at 94°C for 3 min; 33 cycles at 95°C for 1 min, 56°C for 30 s, 72°C for 1 min; and a
13 final extension cycle at 72°C for 6 min. The PCR products were examined by
14 electrophoresis on a 1% agarose gel at 100 V for 45 min and stained with ethidium
15 bromide for visualization under UV light.

16 The sequences of strains BI 146 and BI 153 were obtained with Amersham
17 MegaBACE 1000 automated sequencers using standard protocols at the facilities of
18 the Brazilian Genome Network at Center of Biotechnology, Cbiot- UFRGS-RS, and
19 Instituto do Cancer, RJ, respectively. Alignments and phylogenetic trees were
20 constructed with MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007), using the neighbor joining and
21 maximum parsimony methods, with the bootstrap based on 1000 random samplings.

22 PCR-fingerprinting followed the protocols described in Sampaio *et al.* (2001),
23 using the primer (GTG)₅. Gel electrophoresis images were acquired with the GelDoc
24 XR System Software (Bio-Rad).

25

26

1 3. Results and discussion

2 Three anamorphic ascomycetous yeast strains isolated from bromeliads were
3 characterized by PCR fingerprinting with primer (GTG)₅. The profiles of strains BI 153
4 and BI 259, isolated from the phylloplane of *A. recurvata* and *B. nutans*, respectively,
5 were identical, suggesting conspecificity, while the profile of strain BI 146, isolated
6 from the water tank of *V. gigantea*, differed from them (data not shown). D1/D2
7 sequencing of isolate BI153 confirmed that it belongs to a yet not described yeast
8 species, with 18 base substitutions compared to the closest D1/D2 domain of the
9 LSU rRNA gene sequence match, *Candida ubatubensis*, indicating that these
10 species are phylogenetically distinct. Phylogenetic placement of strain BI153 differed
11 in Neighbor Joining (Fig. 1) and Maximum Parsimony (data not shown) trees, but it
12 always clustered with *C. ubatubensis*. Strain BI 259 was considered to belong to the
13 same species due to the GTG₅ fingerprinting pattern and to the identical phenotypic
14 characteristics. This new species was named *Candida aechmeae*, and it can be
15 differentiated from *C. ubatubensis* by the assimilation of L-arabinose, raffinose, inulin
16 and citrate. *C. ubatubensis* was isolated from the water tank of the bromeliad
17 *Canistropsis sidellii* in an Atlantic rainforest in Southeast Brazil (Ruivo *et al.* 2005),
18 suggesting that they may represent a cluster of new ascomycetic yeast species
19 associated with bromeliads.

20 D1/D2 sequencing of isolate BI 146 confirmed that it also belong to a yet not
21 described yeast species, named *Candida vrieseae*. Phylogenetic trees using
22 Neighbor Joining (Fig. 2) and Maximum Parsimony (data not shown) placed it within
23 a group of species isolated from the guts of a variety of insects and closely related to
24 *Candida membranifaciens* (Suh *et al.*, 2005), although the bootstrap values were low.
25 This phylogenetic placement was confirmed by the ITS tree (data not shown). Strain
26 BI 146 has 5 base substitutions in the D1/D2 region and 11 and 13 substitutions in

1 the ITS region compared to the closest sequence matches *Candida gorgassi* and *C.*
 2 *lessepsii*, respectively. The physiological characteristics that differentiate them can
 3 be seen in Table 1. Suh *et al.* (2005) suggested that this group of yeasts diversified
 4 in association with insects. Therefore it can not be ruled out that strain BI 146 may
 5 have reached the water tank of *V. giganteae* carried by an insect vector.

6 Although it is desirable that the description of new species is based on a
 7 number of isolates that could represent the variability within the species, rare species
 8 are not uncommon in nature. *C. aechmeae* and *C. vrieseae* were two new rare
 9 ascomycetous yeast species isolated from bromeliads along a three-year survey in
 10 Itapuã Park, Brazil. Therefore, their descriptions are based on few isolates as a
 11 straight consequence of the rarity of both species.

13 **3.1 Latin diagnosis of *Candida aechmeae* sp. nov. Landell et Valente.**

14 In medio liquido dextroso, peptono et extracto fermenti continente post 7 dies ad
 15 25°C cellulae vegetativae ellipsoideae et ovoideae, 3 - 6.5 X 2 - 4.5 µm, singulae vel
 16 binae. Cultura in GYP agaro post dies 7 ad 25°C albida et butyrosa. In agaro farinae
 17 Zea mays post dies 21 mycelium mycelium et pseudomycelium formantur. Asci non
 18 formantur. Glucosum et galactosum fermentantur. Glucosum, galactosum, D-
 19 ribosum, D-xylosum, L-arabinosum, L-rhamnosum, sucrosum, maltosum,
 20 cellobiosum, salicinum, raffinose, inulinum, glycerolum, erythritolum, ribitolum,
 21 glucitolum, mannitolum, acidum succinicum, citratum, N-acetylglucosaminum
 22 assimilantur. D-arabinosum, trehalosum, melibiosum, lactosum, amyllum solubile,
 23 meso-inositolum, acidum gluconicum, acidum lacticum non assimilantur. Natrii
 24 nitritum et lysinum assimilantur, sed non natrii nitratum, ethylaminum, creatinum et
 25 creatininum. Non crescit in 37°C. In medio cum 50% glucosum non crescit. Materia

1 amyloidea iodophila non formatur. Ureum non hydrolysatur. Reactio Diazonii coerulei
2 B non respondens.

3 Typus: BI153T = CBS10831^T (= NRRL Y- 48456^T), designat stirpem typicam. Isolata
4 ex folio bromeliaceae, Itapuã Park, Brazil. Preservatus in collectione Centraalbureau
5 voor Schimmelcultures, Trajectum ad Rhenum.

6

7 **3.2. Description *Candida aechmeae* sp. nov. Landell and Valente**

8 *Candida aechmeae* (aech.me'ae. N.L. gen. n. of *Aechmea*, i. e. the bromeliad
9 *Aechmea recurvata* from which this species was isolated.

10 In GYP broth after 7 days at 25°C, the asexual cells are ellipsoidal and ovoid, 3 - 6.5
11 X 2 - 4.5 µm, occur singly, in parent-bud pairs (Fig. 3A). On GYP agar, after 1 week
12 at 25°C, the streak culture is white, smooth and butyrous. After 3 weeks in Dalmau
13 plate culture on cornmeal agar, pseudomycelium and true mycelium are formed
14 (Fig. 3B). Asci are not formed on common sporulation media. Glucose and galactose
15 fermentation is positive. Assimilation of carbon compounds: *D*-glucose, galactose,
16 ribose, xylose, *L*-arabinose, *L*-rhamnose, sucrose, maltose, cellobiose, salicin,
17 raffinose, inulin, glycerol, *meso*-erythritol, ribitol, *D*-glucitol, mannitol, succinic acid,
18 citrate, *N*-acetylglucosamine are assimilated; no growth occurs on *D*-arabinose,
19 trehalose, melibiose, lactose, soluble starch, inositol, *D*-gluconic acid and lactate.
20 Assimilation of nitrogen compounds: sodium nitrite (variable) and lysine are
21 assimilated; no growth on sodium nitrate, ethylamine, creatine and creatinine. Growth
22 at 37°C is negative. Gelatin liquefaction and casein hydrolysis are negative. Growth
23 on GYP broth with 10% sodium chloride is positive and with 16% is negative. Growth
24 on 50% glucose / yeast extract / peptone agar is negative. Production of starch-like
25 compounds is negative. Urease activity and Diazonium Blue B reaction are negative.

1 *C. aechmeae* was isolated from leaves of bromeliads in Itapuã Park, Rio Grande do
 2 Sul, Brazil. The type strain BI 153 has been deposited in the Yeast Collection of the
 3 Centraalbureau voor Schimmecultures, Utrecht, The Netherlands and ARS Culture
 4 Collection, and was assigned the number CBS10831^T (= NRRL Y- 48456^T).

5

6 **3.3. Latin diagnosis of *Candida vrieseae* sp. nov. Landell et Valente.**

7 In medio liquido dextroso, peptono et extracto fermenti continente post 7 dies ad
 8 25°C cellulae vegetativae ellipsoideae et ovoideae, 3 – 4.5 X 2 – 3.5 µm, singulae vel
 9 binae. Cultura in GYP agaro post dies 7 ad 25°C albida et butyrosa. In agaro farinae
 10 Zea mays post dies 21 mycelium nec pseudomycelium non formantur. Asci non
 11 formantur. Glucosum et galactosum fermentantur. Glucosum, galactosum, D-
 12 xylosum, L-arabinosum, L-rhamnosum, sucrosus, maltosum, trehalosum,
 13 cellobiosum, salicinum, raffinose, inulinum, glycerolum, erythritolum, ribitolum,
 14 glucitolum, mannitolum, acidum gluconicum, acidum succinicum, citratum, N-
 15 acetylglucosaminum assimilantur. D-ribosum, D-arabinosum, melibiosum, lactosum,
 16 amyllum solubile, meso-inositolum, acidum lacticum non assimilantur. Natrii nitritum
 17 et lysinum assimilantur, sed non natrii nitratum, ethylaminum, creatinum et
 18 creatininum. Augmentum in 37°C, non crescit in 40°C. In medio cum 50% glucosum
 19 non crescit. Materia amyloidea iodophila non formatur. Ureum non hydrolysat.
 20 Reactio Diazonii coerulei B non respondens.

21 Typus: BI146^T = CBS10829^T (= NRRL Y- 48461^T), designat stirpem typicam. Isolata
 22 ex aquam in bromeliaceae, Itapuã Park, Brazil. Preservatus in collectione
 23 Centraalbureau voor Schimmelcultures, Trajectum ad Rhenum.

24

25

1 **3. 4. Description *Candida vrieseae* sp. nov. Landell and Valente.**

2 *Candida vrieseae* (vrie.se'ae. N. L. gen. n. of *Vriesea*, i. e. the bromeliad
3 *Vriesea gigantea* from which this species was isolated.

4 In GYP broth after 7 days at 25°C, the vegetative cells are ellipsoidal and
5 ovoidal, 3 – 4.5 X 2 – 3.5 µm, occur singly, in parent-bud pairs (Fig. 3C). On GYP
6 agar, after 1 week at 25°C, the streak culture is white, smooth and butyrous. After 3
7 weeks in Dalmau plate culture on cornmeal agar, pseudomycelium or true mycelium
8 are not formed. Asci are not formed on common sporulation media. Glucose and
9 galactose fermentation is positive. Assimilation of carbon compounds: *D*-glucose,
10 galactose, xylose, *L*-arabinose, *L*-rhamnose, sucrose, maltose, trehalose, cellobiose,
11 salicin, raffinose, inulin, glycerol, *meso*-erythritol, ribitol, *D*-glucitol, mannitol, *D*-
12 gluconic acid, succinic acid, citrate, *N*-acetylglucosamine are assimilated; no growth
13 occurs on ribose, *D*-arabinose, melibiose, lactose, soluble starch, inositol and lactate.
14 Assimilation of nitrogen compounds: lysine and sodium nitrite are assimilated; no
15 growth on sodium nitrate, ethylamine, creatinine and creatine. Growth at 37°C is
16 positive. Gelatin liquefaction is negative and casein hydrolysis are positive. Growth
17 on GYP broth with 10% sodium chloride is positive and 16% is negative. Growth on
18 50% glucose / yeast extract / peptone agar is negative. Production of starch-like
19 compounds is negative. Urease activity and *Diazonium Blue B* reaction are negative.
20 *C. vrieseae* was isolated from tank water of bromeliads in Itapuã Park, Rio Grande do
21 Sul, Brazil. The type strain BI 146 has been deposited in the Yeast Collection of the
22 Centraalbureau voor Schimmecultures, Utrecht, The Netherlands and ARS Culture
23 Collection, and was assigned the numbers CBS10829^T (= NRRL Y- 48461^T).

24

25

1 **Acknowledgements**

2 The authors thank the financial support from the Fundação de Amparo a Pesquisa do
3 Rio Grande do Sul (Fapergs – process nº 02/1754-0) and the Conselho Nacional de
4 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – process nº 477528/2003-1) and
5 the Brazilian Genome Network for use of the sequencing facilities. M.F. Landell
6 received a fellowship from CAPES.

7 **References**

- 8 **Araújo, F.V., Medeiros, R.J., Mendonça-Hagler, L.C. & Hagler, A.N. (1998).** A
9 preliminary note on yeast communities of bromeliad-tank waters of Rio de Janeiro,
10 Brazil. *Rev Microbiol* **29**, 118-121.
- 11 **Barnett, J.A., Payne, R.W. & Yarrow, D. (2000).** Yeasts: Characteristics and
12 Identification. 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- 13 **Landell, M.F., Mautone, J.N. & Valente, P. (2006).** Biodiversity of yeasts associated
14 to bromeliads in Itapuã Park, Viamão/RS. *Biociências* **14**, 144-149.
- 15 **Landell, M.F., Inácio, J., Fonseca, A, Vainstein, M.H. & Valente, P. (2009).**
16 *Cryptococcus bromeliarum* sp. nov., an orange-coloured basidiomycetous yeast
17 isolated from bromeliads in Brazil, *Int J Syst Evol Microbiol.* (in press).
- 18 **Hagler, A.N., Rosa, C.A., Morais, P.B., Mendonça-Hagler, L.C., Franco, G.M.,**
19 **Araújo, F.V. & Soares, C.A. (1993).** Yeasts and coliform bacteria of water
20 accumulated in bromeliads of mangrove and sand dune ecosystems of southeast
21 Brazil. *Can J Microbiol* **39**, 973–977.
- 22 **Inácio, J., Landell, M.F., Valente, P., Wang, P.H., Wang, Y.T. , Yang, S.H.,**
23 **Manson, J.S., Lachance, M., Rosa, C.A. & Fonseca, A. (2008).** *Farysizyma*
24 gen.nov., an anamorphicgenus in the Ustilaginales to accommodate three novel

- 1 epiphytic basidiomycetous yeast species from America, Europe and Asia. *FEMS*
2 *Yeast Res* **8**, 499-508.
- 3 **O'Donnell, K. (1993).** *Fusarium* and its near relatives. In *The Fungal Holomorph:*
4 *Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*, pp. 225–233.
5 Edited by D. R. Reynolds & J. W. Taylor. Wallingford, UK: CAB International.
- 6 **Ramos, J.P, Valente, P., de Souza R.A., Rosa, C.A., Leoncini, O, (2001).**
7 Heteroduplex mobility assay of the D1/D2 region of the 26s rDNA for differentiation of
8 *Saccharomyces* species. *Lett. Applied Microbiol* **33**, 206-210.
- 9 **Ruivo, C.C.C., Lachance, M.A., Rosa, C.A., Bacci Jr, M. & Pagnocca, F. (2005).**
10 *Candida bromeliacearum* sp. nov. and *Candida ubatubensis* sp. nov., two yeast
11 species isolated from the water tanks of *Canistropsis seidelli* (Bromeliaceae). *Int J*
12 *Syst Evol Microbiol* **55**, 2213-2217.
- 13 **Sampaio, J.P., Gadanho, M., Santos, S., Duarte, F.L., Pais, C., Fonseca, A. &**
14 **Fell, J.W. (2001).** Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus
15 *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species.
16 *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 687-697.
- 17 **Suh, S-O., Nguyen, N.H. & Blackwell, M. (2005).** Nine new *Candida* species near
18 *C. membranifaciens* isolated from insects. *Mycol. Res*, **109**, 1045-1056.
- 19 **Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007).** MEGA4: Molecular
20 Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and*
21 *Evolution* **24**, 1596-1599.
- 22 **Yarrow, D. (1998).** Methods for the isolation and identification of yeasts. In *The*
23 *Yeasts – a Taxonomic Study*, 4th edn, pp. 77–100. Edited by C. P. Kurtzman & J. W.
24 Fell. Amsterdam: Elsevier.

1 Table 1. Differential physiological characteristics of *Candida vrieseae* sp. nov. and related species.

| | <i>Candida vrieseae</i> | <i>Candida Cerambycidarum</i> ^a | <i>Candida gorgasii</i> ^a | <i>Candida michaelii</i> ^a | <i>Candida endomychidarum</i> ^a | <i>Candida lessepsii</i> ^a |
|---|-------------------------|--|--------------------------------------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|
| Assimilation of carbon compounds | | | | | | |
| D-Ribose | - | + | D | - | D | + |
| L-Arabinose | + | + | + | + | + | D |
| D-Arabinose | - | W | D | - | + | + |
| L-Rhamnose | + | + | + | + | + | - |
| Lactose | - | - | + | - | - | - |
| DL-Lactate | - | D | W | + | D | - |
| Assimilation of nitrogen compounds | | | | | | |
| Nitrite | + | - | - | - | - | - |
| Ethylamine | - | + | + | + | + | + |
| 50% D-Glucose | - | + | - | + | + | + |
| 10% NaCl | + | + | + | + | + | + |
| 16% NaCl | - | W | - | - | + | W |

2 ^aData were taken from Suh, *et al.* (2005).

3

4

D, Delayed; W, weak.

5

6

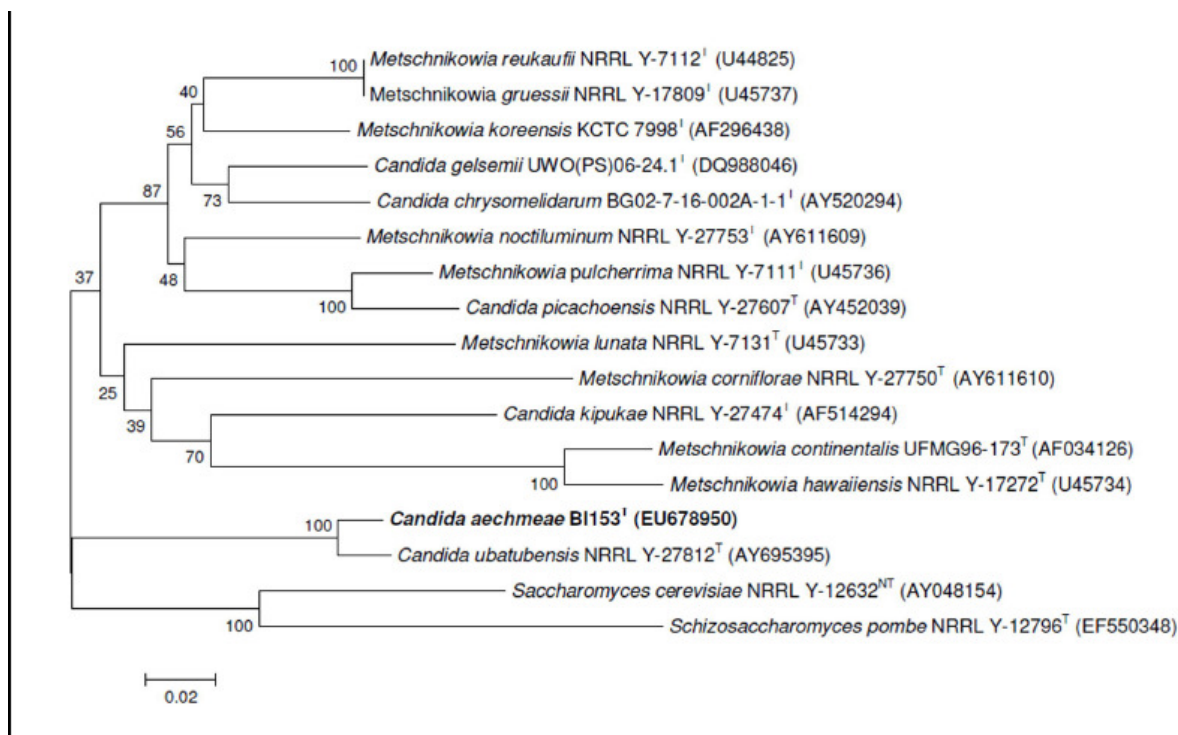


Fig. 1. D1/D2 tree showing the phylogenetic placement of *Candida aechmeae*, obtained by neighbor-joining analysis using Mega 4.0. The numbers given on the branches are the frequencies with which a given branch appeared in 1000 bootstrap replications. The type strain of *C. aechmeae* is typed in boldface. Bar, substitutions per nucleotide position.

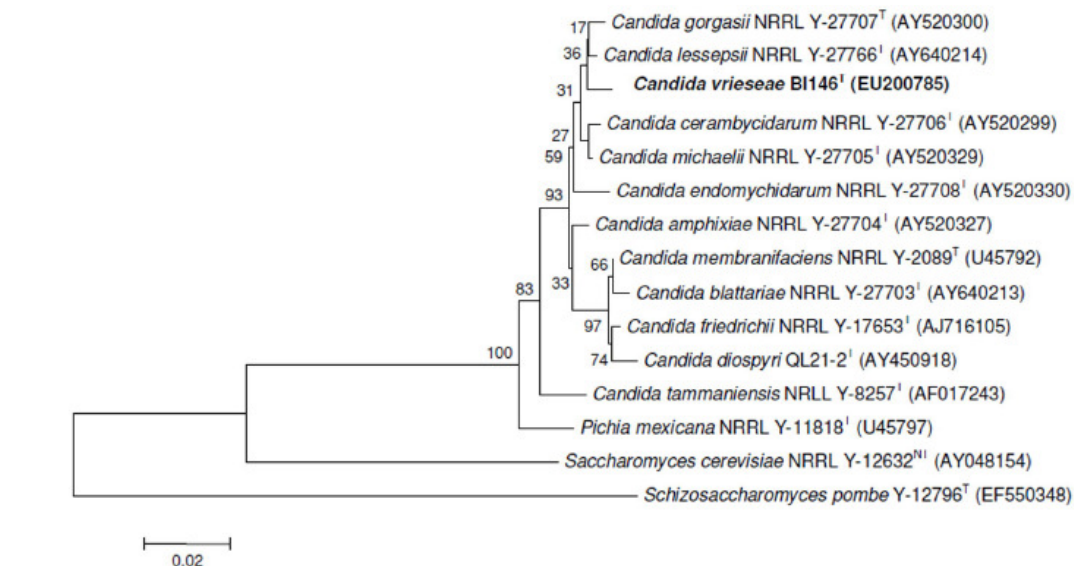


Fig. 2. D1/D2 tree showing the phylogenetic placement of *Candida vrieseae* obtained by neighbor-joining analysis using Mega 4.0. The numbers given on the branches are the frequencies with which a given branch appeared in 1000 bootstrap replications. The type strain of *C. vrieseae* is typed in boldface. Bar, substitutions per nucleotide position.

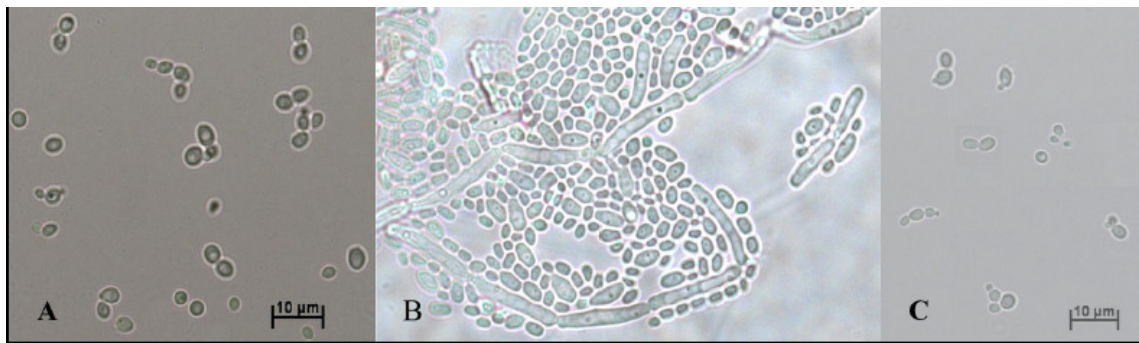


Fig. 3. A - Budding yeast cells of BI153^I on GYP agar at 25 °C after 7 d. **B** - Pseudomycelium of BI153^T on cornmeal agar at 25°C after three weeks. **C** - Budding yeast cells of BI146^T on GYP agar at 25 °C after 7 d. Bars = 10 μm.

7. CAPÍTULO 4:

***Rhodotorula chungwhensis* sp. nov., a novel member of the order
Cystobasidiales.**

Manuscrito submetido publicação na revista:

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.

***Rhodotorula chungwhensis* sp. nov., a novel member of the order Cystobasidiales**

Kang Hyun Lee¹, Patricia Valente², Melissa Fontes Landell², Chang-Jin Kim¹, Hyun Woo Oh³, Hyun Soon Kim⁴, and Kee-Sun Shin¹

¹Biological Resource Center, Korea Research Institute Bioscience and Biotechnology, Daejeon, South Korea; ²Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, Porto Alegre, 500 Sala 158 Cep: 90.050-170, Porto Alegre, RS, Brazil; ³Industrial Bio-materials Research Center, Korea Research Institute Bioscience and Biotechnology, Daejeon, South Korea; ⁴Plant genome research center, Korea Research Institute Bioscience and Biotechnology, Daejeon, South Korea

Keywords: new yeast species, basidiomycetous yeast, *Rhodotorula chungwhensis*

Running title: *Rhodotorula chungwhensis* sp. nov.

Correspondence: Kee-Sun Shin. Biological Resource Center, KRIBB, 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon, Korea. 305-806. Tel.: +82 42 860 4624; fax: +82 42 860 4625; e-mail: ksshin@kribb.re.kr

The GenBank accession numbers for the 26S rDNA D1/D2 domain of strain 3-23^T, 5-19 and BI 218 are FJ238091, FJ238092 and EU678949 and the accession numbers for ITS sequences are FJ238089, FJ238090 and FJ865356, respectively.

Summary

Three anamorphic basidiomycetous yeast strains that are phylogenetically related were isolated from different sampling sites. Two yeast strains, 3-23^T and 5-19, were isolated from a marine solar saltern in Korea and strain BI 218 was isolated from leaf samples of the bromeliad *Tillandsia geminiflora* collected in Itapuã Park, Brazil. Each strain was subjected to polyphasic taxonomic analysis. The strains were characterized by polar budding cells, positive Diazonium Blue B (DBB) and urease reactions, presence of Q-10 as the major ubiquinone isoprenologue and absence of xylose in whole-cell hydrolysates. Ballistoconidia formation or sporulation was not observed in pure or mixed cultures grown on various media. Phylogenetic analysis of the D1/D2 variable domains of the LSU rDNA revealed that these yeasts were most closely related to *Rhodotorula lysiniphila* JCM 5951^T and *Rhodotorula pallida* CBS 320^T, but possessed more than 6% divergence within the LSU rDNA D1/D2 domains. Thus, we propose that these strains be designated *Rhodotorula chungwhensis* sp. nov., type strain 3-23^T (KCTC 17273^T = NCAIM Y.01854^T).

Microorganisms can reside in many saline habitats, including salt farms, salt lakes, tidal flat sediments and the oceans. Most previous saline habitats studies have focused primarily on prokaryotic microorganisms (Anton *et al.*, 1999; Anton *et al.*, 2000; Bale *et al.*, 1997; Bayley & Morton 1978; Colwell *et al.*, 1979; Hartmann *et al.*, 1980; Larsen 1963; Paul *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008). However, research has recently begun to investigate eukaryotic microorganisms of solar salterns and other salty environments. Zalar *et al.* (1999a; 1999b) and Gunde-Cimerman *et al.* (2000) isolated various halophilic or halotolerant black yeasts from hypersaline waters in salterns. Guiraud *et al.* (1995) studied the mycoflora of the soil surrounding the Dead Sea. Zalar *et al.* (1999c) isolated a new species, *Trimmatostroma salinum*, from hypersaline water, and Shin *et al.* examined yeast species in marine solar salterns on the west coast of the Korean peninsula and described a novel anamorphic basidiomycetous yeast species, *Cryptococcus taeanensis* sp. nov., (Shin *et al.*, 2005).

During a study of the yeast flora in a solar saltern, a number of isolates were genetically characterized and two previously undescribed yeast strains (3-23^T and 5-19) were isolated. A BLAST search and phylogenetic analysis based on the LSU rRNA

gene D1/D2 domain sequences of these strains revealed that they possessed significant sequence similarity to the BI 218 strain, isolated from leaves of the bromeliad *Tillandsia geminiflora*, in Brazil. Additionally, these three strains clustered separately from recognized species of the order Cystobasidiales. The present study was conducted to determine the taxonomic status of these three strains, since they are phylogenetically closely related but originated in very different habitats.

The 3-23^T and 5-19 strains were isolated from soil samples collected at the Chungwha solar saltern, located in the Tae-An region of the Yellow Sea in Korea in November 2002. The two strains were obtained from soil samples collected at different sampling sites on the same sampling trip. The samples were all collected during a rest period from salt production. The temperature of the brine at the sampling site was 11–14 °C and the salinity was 7–10%. The BI 218 strain was isolated from leaves of the bromeliad *Tillandsia geminiflora* collected in Itapuã Park, near Porto Alegre, Rio Grande do Sul State, in southern Brazil, in November 2004. The strains were isolated using a standard dilution plating technique, followed by growth at 25 °C on YM agar (Difco) supplemented with 0.04% chloramphenicol. Representative colonies were re-

streaked onto YM agar for purification and maintained on YM agar or at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until used.

Morphological and physiological properties were examined using standard yeast identification methods (Yarrow, 1998). Assimilation of carbon and nitrogen sources was assessed at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ on a rotary shaker, in culture tubes containing 5 ml of the test medium or on agar plates. Results were interpreted after 1, 2 and 3 weeks of incubation. If growth only commenced after 2 weeks, it was considered delayed (d). Induction of the sexual stage was tested on cornmeal agar (BBL), twofold diluted cornmeal agar, or 5% malt agar, with plates being incubated at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 month. Strains were tested individually or in mixed cultures. The growth at different salt levels was determined on YM agar supplemented with 0 -14% sodium chloride (w/v) at 2% intervals for 2 weeks at 25°C .

Quinone systems were prepared as described by Yamada and Kondo (1973) and purified using the method of Komagata and Suzuki (1987). Ubiquinone isoprenologues were identified via reversed-phase TLC (HPTLC RP-18 F254, Merck) by comparing the R_f values with those of standard ubiquinones (Q-9 and Q-10, Sigma-Aldrich). *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7296^T, *Pichia membranifaciens* KCTC 17174^T and

Pichia holstii KCTC 7731^T were used as reference strains for Q-6, Q-7 and Q-8 ubiquinone production, respectively. After hydrolysis of dried whole-cell preparations with 6 N hydrochloric acid (100 °C, 18 h), the presence of xylose in whole-cell hydrolysates was detected using TLC on cellulose plates and the solvent system of Komagata and Suzuki (1987).

Genomic DNA was prepared with the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI), according to the manufacturer's protocol. Sequence analyses of the D1/D2 domains of the large subunit (LSU), and the ITS1, 5.8S and ITS2 rRNA gene regions were performed using the techniques described by Kurtzman & Robnett (1997) and White *et al.* (1990). The PCR products were purified with QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) and sequenced on an Applied Biosystems 310 DNA Genetic Analyzer using the Taq Dye Deoxy Terminator Cycle sequencing kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's protocol. The DNA sequences of related species were retrieved from GenBank, aligned using the multiple-sequence alignment program, CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997), and manually corrected. Phylogenetic analyses were performed using the PHYLIP 3.5 program (Felsenstein, 1993). Evolutionary distances were calculated using the DNADIST program, according to the algorithm described by Jukes and Cantor (1969). A phylogenetic tree was constructed

using the neighbor-joining method (Saitou & Nei, 1987) and bootstrap values were calculated from 1000 replicates (Felsenstein, 1985). The tree was visualized using the TreeView program (Page, 1996). *Cystofilobasidium capitatum* CBS 6358^T and *Sporidiobolus johnsonii* CBS 5470^T were designated outgroups in the analysis.

In the present study, we isolated approximately 90 yeast strains from soil samples collected in the Chungwha solar saltern. Partial sequencing of LSU rDNA isolated from these strains revealed homologies with species of the genera *Aureobasidium*, *Bullera*, *Bulleromyces*, *Cryptococcus*, *Pseudozyma*, *Rhodospiridium* and *Rhodotorula*. The majority of the isolates belonged to the genus *Cryptococcus*, *Rhodospiridium* and *Rhodotorula*. A similar observation was detected by different studies; the predominant yeasts in salty environments are members of the genera *Cryptococcus*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* and *Trichosporon* (Hagler & Ahearn, 1987; Nagahama *et al.*, 2001).

In the course of identification, two yeast strains, 3-23^T and 5-19, were further characterized due to their unique LSU rDNA D1/D2 domain sequence. The 3-23^T and

5-19 strains are phylogenetically related to the BI 218 strain isolated from the leaves of a bromeliad. The taxonomic positions of the 3-23^T, 5-19 and BI 218 strains were established using a polyphasic approach.

The three strains were morphologically, physiologically and phylogenetically almost identical. They were found to display physiological characteristics that place the species in the genus *Rhodotorula*: asexual reproduction by budding (Fig 1), positive Diazonium blue B and urease reactions, absence of ballistoconidia, absence of xylose in cell hydrolysates, no assimilation of myo-inositol, absence of fermentative ability, and no production of starch-like compounds (Fell & Statzell-Tallman, 1998). No hyphae or pseudohyphae were observed on cornmeal agar after 3 weeks. The formation of a mycelium with clamps and teliospore-like structures was not observed in mating tests between the strains on cornmeal agar, 2-fold diluted cornmeal agar or 5 % malt agar after 5 weeks.

The differential salt requirements or tolerances were studied to determine the adaptation of the strains to the environmental conditions in the original habitat, the saltern. All strains showed normal growth without salt and tolerated NaCl concentrations up to 8% (w/v). However, these strains showed different ranges of

halotolerance. Strains 3-23^T and 5-19 grew on YM agar with up to 10% (w/v) and 12 % (w/v) NaCl, respectively. In contrast, strain BI 218 did not grow above 8% (w/v) NaCl. In addition the growth rate of all strains was reduced in the presence of NaCl. According to these results, they can be classified as halotolerant rather than halophilic yeasts.

The phylogenetic positions of the three isolates were inferred by comparing the sequences of the D1/D2 domains of the LSU rDNA. The nucleotide sequences of the LSU rDNA D1/D2 domains were identical in the 3-23^T and 5-19 strains. There were four nucleotide substitutions between these two strains and BI 218; however, this sequence divergence does not exceed 1%. Therefore, molecular characterization through sequencing of the D1/D2 region of the LSU rDNA revealed that 3-23^T, 5-19, and BI 218 are strains of the same species. Comparison of partial sequences of LSU rDNA showed specific phylogenetic associations among the three strains and taxa of the Cystobasidiales (Aime *et al.*, 2006; Bauer *et al.*, 2006; Fell *et al.*, 2000; Scorzetti *et al.*, 2002). When a 599 nt region of the LSU rDNA D1/D2 domain was examined, the 3-23^T and 5-19 strains were found to diverge by 6.5% (33 substitutions and 6 gaps) from *R. lysiniphila* JCM 5951^T and *R. pallida* CBS 320^T, the closest relatives of these strains. *Rhodotorula calyptogenae*, *Rhodotorula benthia*, and *Rhodotorula* sp. HB842

were also related to the strains, with sequence divergences of 6.7 %, 6.8 %, and 7.1 %, respectively (Fig. 2). Strain BI 218 was also most closely related to *R. lysiniphila* JCM 5951^T and *R. pallida* CBS 320^T, with a LSU rDNA D1/D2 domain sequence dissimilarity of 6.5 % (31 substitutions and 8 gaps). Other species related to the BI 218 strain were *R. calyptogena* (6.6 % divergence), *R. benthia* (6.8 % divergence) and *Cystobasidium fimetarium* (6.8 %). The LSU rDNA D1/D2 domain sequences of these strains diverged by more than 6% from the type strains of recognized members of the order Cystobasidiales. The levels of similarity between the new species and the closest relatives ranged from 92.9 to 93.5%.

The ITS region sequences of the three strains were also determined in the present study. The three strains were again found to be closely related (>99 % ITS region sequence similarity) and to belong to the order Cystobasidiales. The closest relative with a validated type strain in the public databases is *R. calyptogena*, with sequence similarity ranging from 92.1 % to 93.0 %. The next most closely related recognized species were *Rhodotorula benthia* SY-91^T, (91.7 % to 92.1%), *R. lysiniphila* JCM 5951^T (91.4 % to 92.2 %) and *Rhodotorula laryngis* CBS 2221^T (91.7% to 92.0%) of the order Cystobasidiales.

In addition to the observed differences in nucleotide sequences, these strains could be distinguished from related taxa based on phenotypic characteristics (Table 1). The three isolates exhibited nearly identical assimilation profiles; however, strain BI 218 can be physiologically differentiated from strains 3-23^T and 5-19 by the ability to grow on erythritol (dw), L-arabinitol (d), and galactitol and by the inability to grow in presence of 0.01% cycloheximide. Also, strain 5-19 can be discriminated from strains 3-23^T and BI 218, based on the inability to assimilate D-glucarate.

The novel strains showed various phenotypic differences with respect to other related species (Table 1). The most notable differences between the three strains and *R. lysiniphila* JCM 5951^T were the isolates' ability to assimilate salicin, mannitol, glucono- δ -lactone, D-gluconate and quinic acid, and to grow on 10% (w/v) NaCl (dw) and the inability to assimilate L-rhamnose and imidazole. The novel strains assimilated galactose, L-arabinose, D-arabinose, sucrose, maltose (d), salicin, arbutin, melezitose and glucono- δ -lactone, whereas *R. pallida* strains did not.

Based on these phenotypic and phylogenetic differences, we propose that three strains (3-23^T, 5-19 and BI 218) should be assigned to a novel species of the genus

Rhodotorula, *Rhodotorula chungwhensis* sp. nov. The type strain is 3-23^T (KCTC 17273^T = NCAIM Y.01854^T).

Latin diagnosis of *Rhodotorula chungwhensis* Shin, Valente & Landell sp. nov.

In agar yeast malti (YM) post dies tres ad 25 °C, cellulae vegetativae subglobosae vel ellipsoideae (3.1–4.2 x 2.1–2.8 µm), singulae aut binae (Fig. 1). Cultura in agarum cum glucose et peptone et extracto levidinis post 7 dies ad 25 °C, cultura in striis glabra, butyrosa, nitida, aurantiaca vel rosea et margine integro. Post dies 7 annulus convexus et sedimentum formantur. In agarum farinae *Zea mays* post dies 21 ad 25°C, pseudomycelium et mycelium absent. Fermentatio nulla. D-Glucosum, D-galactosum (vel lente), L-sorbosum (lente infirme vel nullum), D-glucosaminum (lente infirme vel nullum), D-ribosum (lente vel nullum), D-xylosum, L-arabinosum (vel lente), D-arabinosum (vel lente), sucrosum, maltosum (lente), α,α -trehalosum, cellobiosum (lente vel nullum), salicinum (vel lente), lactosum (lente vel lente infirme vel nullum), raffinose (lente vel nullum), melezitose, inulinum (lente vel nullum), amyllum solubile (infirme vel nullum), glycerolum, erythritolum (lente infirme vel nullum), ribitololum (lente vel lente infirme vel nullum), xylitololum (lente vel nullum), L-

arabitolum (lente vel nullum), D-glucitolum (lente vel nullum), D-mannitolum (vel lente), galactitolum (variabilitre), D-glucono- δ -lactonum, acidum 2-keto-D-gluconicum, acidum 5-keto-D-gluconicum, acid gluconicum, acidum glucuronicum (vel lente), acidum DL-lacticum (lente vel lente infirme vel nullum), acidum succinicum (variabilitre), acidum citricum (lente vel lente infirme vel nullum), ethanolum, propane-1,2-diolum (vel lente vel lente infirme), acidum quini, et acidum saccharicum (variabilitre) assimilantur. L-Rhamnosum, methyl α -D-glucosidum, melibiosum, myo-inositolum, acidum galacturonicum, methanolum et butano-2,3-diolum non assimilantur. Ethylaminum (lente vel lente infirme), L-lysinum (vel lente) et D-tryptophanum (vel lente) assimilantur. Kallii nitratum, sodii nitritum, cadaverinum, creatinum, creatininum, glucosaminum et imidazolium non assimilantur. Vitamina externa crescentiae necessaria est. Crescit in 0.01% cycloheximido/10% sodii chloridum, et non crescit 0.1% cycloheximido/1 % acido acetico/16% sodii chloridum. Non crescit in agaro extrato fermenti confecto 50 partes glucose per centum. Diazonium caerueum B positivum. Ureum hydrolysat. Augmentum in 30 °C, at non 35 °C. Ubiquinone majus Q-10. Neque amyllum nec acidum aceticum formantur.

Typus stirps 3-23^T isolatus ex terra, Chungwha solar saltern, Korea. In collectione zymotica Korean Collection for Type Cultures (KCTC), Trajectum ad Rhenum, sub no. KCTC 17273^T, typus depositus est.

Description of *Rhodotorula chungwhensis* **Shin, Valente & Landell sp. nov.**

Rhodotorula chungwhensis (chung.when'sis. N.L. adj. *chungwhensis*, pertaining to Chungwha, Korea, where the type strain was isolated).

After growth in YM liquid medium for 3 days at 25 °C, cells appeared subglobose to ellipsoidal (3.1 µm to 4.2 µm by 2.1 µm to 2.8 µm), single or in pairs. Vegetative reproduction was by polar budding. A ring (with the exception of BI 218) and sediment were observed after growth for 1 week at 25 °C. After growth on GPY agar for 1 week at 25 °C, the colonies appeared smooth, butyrous, glistening and orange to pink in color, with an entire margin. After growth for 21 days at 25 °C, under a cover glass on a Dalmau plate with cornmeal agar, pseudomycelia and mycelia were absent. Fermentation was negative, but the strains were capable of assimilating D-glucose, D-galactose (or delayed), L-sorbose (delayed weak or negative), D-glucosamine (delayed weak or negative), D-ribose (delayed or negative), D-xylose, L-arabinose (or delayed),

D-arabinose (or delayed), sucrose, maltose (delayed), α,α -trehalose, cellobiose (delayed or negative), salicin (or delayed), lactose (delayed or delayed weak or negative), raffinose (delayed or negative), melezitose, inulin (delayed or negative), soluble starch (weak or negative), glycerol, erythritol (delayed weak or negative), ribitol (delayed or delayed weak or negative), xylitol (delayed or negative), L-arabinitol (delayed or negative), D-glucitol (delayed or negative), D-mannitol (or delayed), galactitol (variable), glucono- δ -lactone, 2-ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid, D-gluconate, D-glucuronate (or delayed), DL-lactate (delayed or delayed weak or negative), succinate (variable), citrate (delayed or delayed weak or negative), ethanol, propanediol (or delayed or delayed weak), quinic acid and D-glucarate (variable). In contrast, the strains were unable to assimilate L-rhamnose, methyl α -D-glucoside, melibiose, *myo*-inositol, D-galacturonate, methanol and butanediol. The strains were able to utilize ethylamine (delayed or delayed weak), L-lysine (or delayed) and D-tryptophan (or delayed), but not potassium nitrate, sodium nitrite, cadaverine, creatine, creatinine, D-glucosamine and imidazole. Growth did not occur in vitamin-free medium. Growth was delayed-positive (except BI 218) in the presence of 0.01% cycloheximide, but negative in the presence of 0.1% cycloheximide. No growth occurred in the presence of 1% acetic acid. Delayed or delayed weak growth occurred in YM broth containing

10% (w/w) NaCl-5% glucose but not in 16% (w/w) NaCl-5% glucose. No growth occurred on 50% glucose-yeast extract agar. The strains were unable to produce starch-like compounds. In addition, the strains displayed a positive reaction to Diazonium Blue B, urease activity, and growth at 30 °C but not at 35 °C. The major ubiquinone was Q-10. Acid production was not observed. In conclusion, cultures of the type strain, 3-23^T = KCTC 17273^T, were isolated from soil collected at the Chungwha solar saltern in Korea, in November 2002 and deposited in the Korean Collection for Type Cultures (KCTC) in Taejon, Korea as KCTC 17273^T and in the National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Hungary, as NCAIM Y.01854^T.

Acknowledgements

This work was supported by the Korea Science and Engineering Foundation (KOSEF) grant funded by the Korea government (MEST) (NO. R01-2007-000-21120-0), grant NMC0300837 and grant from the KRIBB Research Initiative Program. M. F. Landell received a fellowship from CAPES.

References

- Aime, M.C., Matheny, P.B., Henk, D.A., Frieders, E.M., Nilsson, R.H., Piepenbring, M., McLaughlin, D.J., Szabo, L.J., Begero, D., Sampaio, J.P., Bauer, R., Weis, M., Oberwinkler, F. & Hibbett, D. S. (2006).** An overview of the higher-level classification of *Pucciniomycotina* based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. *Mycologia* **98**, 896-905.
- Antón, J., Llobet-Brossa, E., Rodríguez-Valera, F., & Amann, R., (1999).** Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environ Microbiol* **1**, 517-523.
- Antón, J., Rossello-Mora, R., Rodriguez-Valera, F., & Amann, R. (2000).** Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3052-3057.
- Bale, S.J., Goodman, K., Rochelle, P.A., Marchesi, J.R., Fry, J.C., Weightman, A.J. & Parkes, R.J. (1997).** *Desulfovibrio profundus* sp. nov., a Novel Barophilic Sulfate-Reducing Bacterium from Deep Sediment Layers in the Japan Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* **47**, 515 - 521.

Bauer, R., Begerow, D., Sampaio, J.P., Weiß, M. & Oberwinkler, F. (2006). The simple-septate basidiomycetes: a synopsis. *Mycol Progr* **5**, 41-66.

Bayley, R. M. & Morton, R. A. (1978). Recent developments in the molecular biology of extremely halophilic bacteria. *Crit Rev Microbiol* **6**, 151–205.

Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren, A. & Gunde-Cimerman, N. (2005). Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett* **244**, 229–234.

Colwell, R., Litchfield, C.D., Vreeland, R.H., Kiefer, L.A. & Gibbons, N.E. (1979). Taxonomic Studies of Red Halophilic Bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **29**, 379 - 399.

Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G. & Statzell-Tallman, A. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1351–1371.

Fell, J.W. & Statzell-Tallman, A. (1998). *Rhodotorula* Harrison. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 77-100. Elsevier, Amsterdam.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution* **39**, 783–791.

Felsenstein, J. (1993). PHYLIP (phylogenetic inference package) version 3.5.1.

Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.

Guiraud, P., Steiman, R., Seigle-Murandi, F. & Sage, L. (1995). Mycoflora of soil around the Dead Sea. *Syst Appl Microbiol* **18**, 318-322.

Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, S., & Plemenitaš, A. (2000). Hypersaline waters in salterns - natural ecological niche for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol Ecol* **32**, 235–240.

Hagler, A.N. & Ahearn, D. G. (1987). Ecology of aquatic yeasts. *The yeasts* 2nd edition, vol. 1 (Rose AH & Harrison JS, eds), pp 181–205. Academic Press, London, United Kingdom.

Hartmann, R., Sickinger, H-D. & Oesterhelt, D. (1980). Anaerobic growth of halobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 3821–3825.

Komagata, K. & Suzuki, K. (1987). Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. *Methods in Microbiology* vol. 19. (Colwell RR & Grigorova R eds), pp. 161-207. Academic Press, London.

- Kurtzman, C.P. & Robnett, C.J. (1997).** Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol* **35**, 1216–1223.
- Larsen H (1963).** Halophilism. *The physiology of growth* vol. 4. (Gunsalus IC and Stanier RY eds), pp. 297-342. Academic Press Inc., New York.
- Nagahama, T., Hamamoto, M., Nakase, T., Takami, H. & Horikoshi, K. (2001).** Distribution and identification of red yeasts in deep-sea environments around the northwest Pacific Ocean. *Antonie van Leeuwenhoek* **80**, 101–110.
- Page R. D. M. (1996).** TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* **12**, 357–358.
- Paul, S., Bag, S.K., Das, S., Harvill, E.T. & Dutta, C. (2008).** Molecular Signature of Hypersaline Adaptation: Insights from Genome and Proteome Composition of Halophilic Prokaryotes. *Genome Biol* **9**, R70.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.

Scorzetti, G., Fell, J.W., Fonseca, A. & Statzell-Tallman, A. (2002). Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res* **2**, 495–517.

Shin, K.S., Park, Y.H., Park, D.J. & Kim, C.J. (2005). *Cryptococcus taeanensis* sp. nov., a new anamorphic basidiomycetous yeast isolated from a salt farm. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1365-1368.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876–4882.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ, eds), pp. 315–322. Academic Press, New York.

Yamada, Y. & Kondo, K. (1973). Coenzyme Q system in the classification of the yeast genera *Rhodotorula* and *Cryptococcus* and the yeast-like genera *Sporobolomyces* and *Rhodospiridium*. *J Gen Appl Microbiol* **19**, 59-77.

Yarrow, D. (1998). Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts.

The Yeasts, a Taxonomic Study, fourth edn (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 77-100.

Elsevier, Amsterdam.

Wu, Y.H., Xu, X.W., Huo, Y.Y., Zhou, P., Zhu, X.F., Zhang, H.B. & Wu, M. (2008).

Halomonas caseinilytica sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a saline lake on the Qinghai–Tibet Plateau, China. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1259 - 1262.

Zalar, P., de Hoog, G.S. & Gunde-Cimerman, N. (1999a). Taxonomy of the

endoconidial black yeast genera *Phaeotheca* and *Hyphospora*. *Stud Mycol* **43**, 49–56.

Zalar, P., de Hoog, G.S. & Gunde-Cimerman, N. (1999b). Ecology of halotolerant

dothideaceous black yeasts. *Stud Mycol* **43**, 41–52.

Zalar, P., de Hoog, G.S. & Gunde-Cimerman, N. (1999c). *Trimmatostroma salinum*,

a new species from hypersaline water. *Stud Mycol* **43**, 57–62.

Table 1. Physiological characteristics that distinguish *R. chungwhensis* sp. nov. from related type strains.

| | <i>R.</i> <i>chungwhensis</i> ** | <i>R. pallid</i> CBS 320 ^{T*} | <i>R. lysiniphila</i> JCM 5951 ^{T*} | <i>R. calyptogenae</i> CBS 9125 ^{T*} | <i>R. benthica</i> CBS 9124 ^{T*} |
|----------------------------------|-------------------------------------|---|---|--|--|
| Assimilation of carbon compounds | | | | | |
| D-Galactose | +/d | – | w | + | + |
| L- Sorbose | dw/– | w/d/– | – | – | w |
| D- Ribose | d/– | + | w | + | + |
| L-Arabinose | +/d | – | w | + | + |
| D-Arabinose | +/d | – | w | + | + |
| L-Rhamnose | – | – | w | w | + |
| Sucrose | + | – | w | – | + |
| Maltose | d | – | w | + | + |
| Me α -D-Glucoside | – | – | – | w | + |
| Cellobiose | d/– | – | w | + | w |
| Salicin | +/d | – | – | + | – |
| Arbutin | + | – | w | + | + |
| Lactose | d/dw/– | – | w | + | w |
| Raffinose | d/– | – | w | + | + |
| Melezitose | + | – | + | + | + |
| Inulin | d/– | – | – | + | + |
| Starch | w/– | – | w | w | + |
| Erythritol | dw/– | – | w | w | + |
| Ribitol | d/dw/– | d | w | + | + |
| Xylitol | d/– | w/d/+ | w | w | + |
| L-Arabitol | d/– | – | w | w | + |
| D-Glucitol | d/– | w/d/+ | – | – | – |
| D-Mannitol | +/d | + | – | – | – |
| Galactitol | v | – | – | w | + |

| | | | | | |
|---|--------|----|---|---|---|
| myo-Inositol | - | - | - | w | + |
| D-Glucono- δ -lactone | + | - | - | - | + |
| D-Gluconate | + | + | - | - | + |
| DL-Lactate | d/dw/- | d | - | - | - |
| Succinate | v | + | - | w | + |
| Citrate | d/dw/- | - | - | - | - |
| Propanediol | +/d/dw | + | - | w | - |
| Butanediol | - | - | - | w | + |
| Quinic acid | + | ND | - | w | + |
| D-Glucarate | v | ND | - | w | + |
| Assimilation of carbon compounds | | | | | |
| L-Lysine | +/d | w | + | + | + |
| Imidazole | - | - | w | w | + |
| Tryptophane | +/d | ND | + | + | + |
| Additional growth tests | | | | | |
| 0.01% cycloheximide resistance | d/- | - | - | + | + |
| 0.1% cycloheximide resistance | - | ND | - | w | - |
| 10% NaCl+ 5% glucose | d/dw | ND | - | w | - |

*Data were obtained from the CBS yeast database.

**Results from the 3-23^T, 5-19 and BI 218 strains were combined.

Symbols and abbreviations: +, positive; -, negative; d, delayed positive; w, weakly positive; v, variable;

ND, not determined.

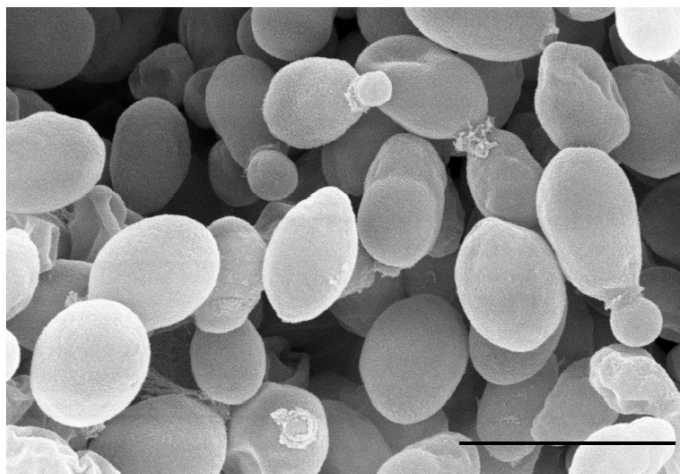


Fig. 1. Scanning electron micrograph of polar budding cells of *Rhodotorula chungwhensis* sp. nov. strain 3-23^T, after growth in GPY broth for 3 days at 25°C. Bar = 5 μm .

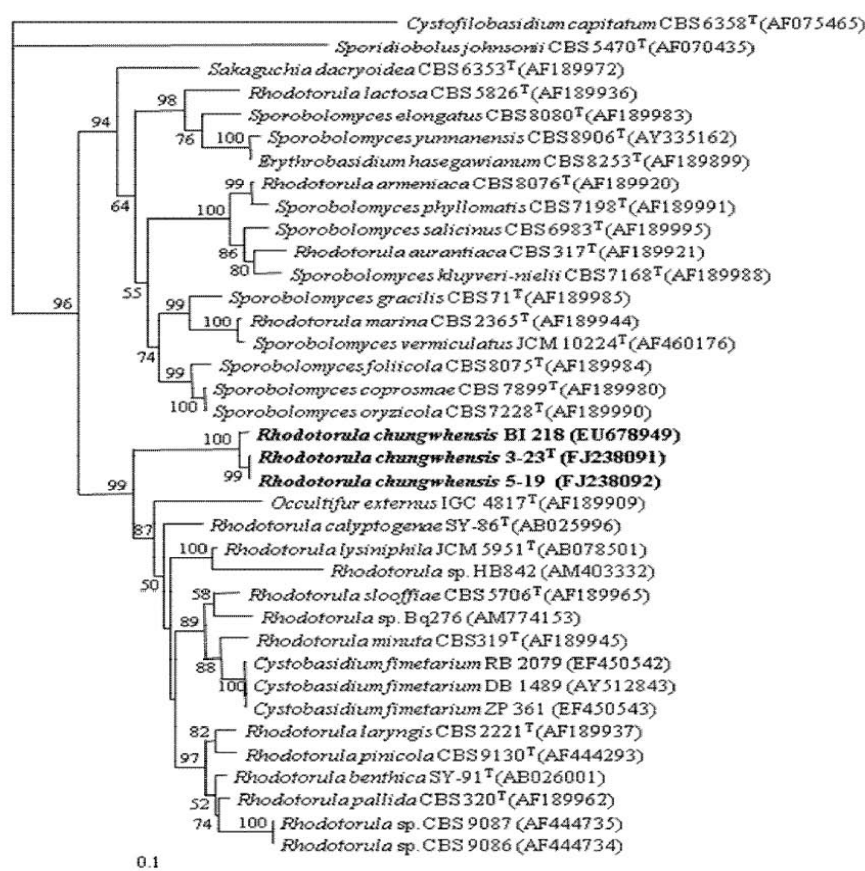


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree, based on sequences of the D1/D2 region of the LSU rDNA. The positions of strains 3-23^T, 5-19 and BI 218 are shown relative to phylogenetic neighbors. *Cystofilobasidium capitatum* CBS 6358^T and *Sporidiobolus johnsonii* CBS 5470^T were used as outgroups. Sequences were retrieved from GenBank, and accession numbers are indicated in parentheses. Bootstrap values, expressed as percentages of 1000 replicates, are shown for branches with more than 50 % bootstrap support. Bar = 0.1 substitutions per site.

8. CAPÍTULO 5: Comunidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a bromélias

8.1 Comunidade de leveduras associadas a bromélias

Foram obtidos 178 isolados a partir das espécies de bromélias coletadas, sendo que, 174 isolados foram obtidos a partir do filoplano, água ou flores e 4 isolados foram obtidos a partir da técnica de isolamento de microrganismos endofíticos. Essas últimas leveduras receberam a denominação de EI01, EI03, EI04 e EI05. Do total de leveduras isoladas, aproximadamente 6% são de afinidade ascomicética (n=11) e 94% são leveduras de afinidade basidiomicética (n=167).

Cento e quarenta e oito isolados foram identificados por meio do sequenciamento das regiões D1/D2 e/ou ITS do rDNA e pertencem a 18 gêneros e 57 espécies (Tabela 1).

Os gêneros mais encontrados foram: *Candida*, *Farysizyma*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces/Sporiobolus*.

A listagem com a identificação presuntiva das leveduras, assim como a espécie de bromélia de onde foram isoladas, pode ser vista na Tabela 1.

8.1.1 Taxonomia molecular de leveduras

8.1.1.1 Filo Ascomycota

Somente cerca de 6% (n=11) dos isolados obtidos são de afinidade ascomicética. Apesar do baixo índice, 5 isolados são prováveis espécies novas.

TABELA 1: Listagem com a identificação genotípica das leveduras isoladas de bromélias e as espécies de bromélias de onde foram isoladas.

| Ascomicetos (n=11) | Linagem | Bromélia |
|--|----------------|---------------------------------|
| <i>Candida aechmeae</i> sp. nov. | BI153 | Flor <i>Aechmea recurvata</i> |
| <i>Candida aechmeae</i> sp. nov. | BI259 | <i>Bilbergia nutans</i> |
| <i>Candida hawaiiiana</i> | BI95 | Flor <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Candida hawaiiiana</i> | BI132 | <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Candida parapsilosis</i> | BI06 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Candida parapsilosis</i> | EI01 | <i>Vriesea procera</i> |
| <i>Candida parapsilosis</i> | BI336 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Candida vrieseae</i> sp. nov. | BI146 | Água <i>Vriesea gigantea</i> |
| <i>Candida</i> sp. nov. 01 | BI242 | <i>Bromelia antiacantha</i> |
| <i>Debaryomyces melissophilus</i> | BI81 | <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Lalaria</i> sp. nov. 01 | EI05 | <i>Tillandsia gardneri</i> |
| Basidiomicetos (n= 137)^a | Linagem | Bromélia |
| Pucciniomycotina | | |
| Erythrobasidiales | | |
| <i>Erythrobasidium hasegawianum</i> | BI43 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Erythrobasidium hasegawianum</i> | BI107 | <i>Vriesea gigantea</i> |
| <i>Erythrobasidium hasegawianum</i> | BI205 | <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Erythrobasidium hasegawianum</i> | BI332 | <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Rhodotorula marina</i> | BI18 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Rhodotorula marina</i> | BI25 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Rhodotorula marina</i> | BI34 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Rhodotorula marina</i> | BI44 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Rhodotorula marina</i> | BI123 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Rhodotorula marina</i> | BI140 | Flor <i>Tillandsia crocata</i> |
| <i>Rhodotorula marina</i> | BI219 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Rhodotorula marina</i> | BI256 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Rhodotorula marina</i> | BI267 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Rhodotorula marina</i> | BI303 | <i>Aechmea recurvata</i> |
| <i>Rhodotorula marina</i> | BI310 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Rhodotorula marina</i> | BI319 | <i>Aechmea recurvata</i> |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 01 | BI02 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 01 | BI327 | <i>Vriesea gigantea</i> |
| <i>Sporobolomyces vermiculatus</i> | BI252 | <i>Tillandsia gardneri</i> |

TABELA 1: Continuação - Listagem com a identificação genotípica das leveduras isoladas de bromélias e as espécies de bromélias de onde foram isoladas.

Microbotryales

| | | |
|--------------------------------|-------|------------------------------------|
| <i>Rhodotorula bogoriensis</i> | BI179 | Flor <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Rhodotorula nothofagi</i> | BI65 | <i>Vriesea procera</i> |
| <i>Rhodotorula nothofagi</i> | BI114 | <i>Vriesea gigantea</i> |
| <i>Rhodotorula nothofagi</i> | BI280 | Flor <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 02 | BI215 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 03 | BI116 | <i>Vriesea gigantea</i> |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 04 | BI157 | <i>Aechmea recurvata</i> |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 05 | BI108 | <i>Vriesea gigantea</i> |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 05 | BI124 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 05 | BI240 | <i>Bromelia antiacantha</i> |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 06 | BI208 | <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 06 | BI24 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 07 | BI158 | <i>Aechmea recurvata</i> |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 08 | BI216 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |

Sporidiobolales

| | | |
|-----------------------------------|-------|--------------------------------|
| <i>Sporidiobolus pararoseus</i> | BI85 | <i>Bromelia antiacantha</i> |
| <i>Sporidiobolus pararoseus</i> | BI89 | Flor <i>Tillandsia crocata</i> |
| <i>Sporidiobolus pararoseus</i> | BI167 | <i>Bromelia antiacantha</i> |
| <i>Sporidiobolus pararoseus</i> | BI234 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Sporobolomyces tsugae</i> | BI173 | <i>Bromelia antiacantha</i> |
| <i>Sporobolomyces tsugae</i> | BI316 | <i>Aechmea recurvata</i> |
| <i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 01 | BI50 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 02 | BI217 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 03 | BI149 | Flor <i>Aechmea recurvata</i> |
| <i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 04 | BI100 | <i>Bromelia antiacantha</i> |
| <i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 04 | BI113 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |

Agaricostilbales

| | | |
|---------------------------------|-------|-----------------------------|
| <i>Bensingtonia</i> sp. nov. 01 | BI183 | <i>Bromelia antiacantha</i> |
|---------------------------------|-------|-----------------------------|

Ustilaginomycota

Exobasidiales

| | | |
|------------------------------|-------|-----------------------------|
| <i>Graphiola</i> sp. nov. 01 | BI122 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Graphiola</i> sp. nov. 01 | BI138 | <i>Tillandsia crocata</i> |

TABELA 1: Continuação - Listagem com a identificação genotípica das leveduras isoladas de bromélias e as espécies de bromélias de onde foram isoladas.

Microstromatales

| | | |
|------------------------------------|------|-------------------------------|
| <i>Sympodiomyopsis</i> sp. nov. 01 | BI83 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Rhodotorula phylloplana</i> | EI04 | <i>Tillandsia gardneri</i> |

Ustilaginales

| | | |
|---------------------------------------|-------|---------------------------------|
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI52 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI63 | <i>Vriesea procera</i> |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI77 | <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI109 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI120 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI154 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI181 | <i>Dickia</i> sp. |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI224 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI229 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI232 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI235 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI238 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI277 | <i>Flor Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI286 | <i>Vriesea gigantea</i> |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI302 | <i>Aechmea recurvata</i> |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI305 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI307 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI321 | <i>Aechmea recurvata</i> |

Agaricomycotina

Tremellales

| | | |
|--|-------|--------------------------------|
| <i>Auriculibuller fuscus</i> | BI111 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Bullera dendrophila</i> | BI103 | <i>Bromelia antiacantha</i> |
| <i>Bullera sinensis</i> | BI196 | <i>Vriesea procera</i> |
| <i>Bullera</i> sp. nov. 01 | BI335 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Cryptococcus bromeliarum</i> sp. nov. | BI20 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Cryptococcus bromeliarum</i> sp. nov. | BI68 | <i>Vriesea procera</i> |
| <i>Cryptococcus bromeliarum</i> sp. nov. | BI79 | <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Cryptococcus bromeliarum</i> sp. nov. | BI133 | <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI91 | <i>Flor Tillandsia crocata</i> |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI144 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI200 | <i>Vriesea procera</i> |

TABELA 1: Continuação - Listagem com a identificação genotípica das leveduras isoladas de bromélias e as espécies de bromélias de onde foram isoladas.

| | | |
|---------------------------------|-------|---------------------------------|
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI204 | <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI207 | <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI220 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI225 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI231 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI272 | <i>Tillandsia crocata</i> |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI276 | <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI278 | Flor <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI281 | Flor <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI282 | <i>Bromelia antiacantha</i> |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI283 | <i>Bromelia antiacantha</i> |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI296 | <i>Aechmea recurvata</i> |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI320 | <i>Aechmea recurvata</i> |
| <i>Cryptococcus podzolicus</i> | BI244 | <i>Bromelia antiacantha</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | BI142 | Flor <i>Tillandsia crocata</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | BI169 | <i>Bromelia antiacantha</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | BI202 | <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | BI290 | <i>Vriesea gigantea</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | BI299 | <i>Aechmea recurvata</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | BI309 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | BI311 | <i>Bromelia antiacantha</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | BI325 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI96 | Flor <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI203 | <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI246 | <i>Vriesea gigantea</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI254 | <i>Vriesea fibrurgensis</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI273 | <i>Tillandsia crocata</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI279 | Flor <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI284 | <i>Bromelia antiacantha</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI285 | <i>Vriesea gigantea</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI288 | <i>Vriesea gigantea</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI298 | <i>Aechmea recurvata</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI312 | <i>Bromelia antiacantha</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI320 | <i>Aechmea recurvata</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 03 | BI118 | <i>Vriesea gigantea</i> |

TABELA 1: Continuação - Listagem com a identificação genotípica das leveduras isoladas de bromélias e as espécies de bromélias de onde foram isoladas.

| | | |
|--|-------|--------------------------------|
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 03 | BI264 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 04 | BI195 | Água <i>Vriesea gigantea</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 04 | BI295 | <i>Aechmea recurvata</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 06 | BI226 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 07 | BI139 | <i>Tillandsia crocata</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 07 | BI141 | Flor <i>Tillandsia crocata</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 08 | BI223 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 09 | BI237 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 10 | BI287 | <i>Vriesea gigantea</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 11 | BI293 | <i>Vriesea gigantea</i> |
| <i>Dioszegia</i> sp. nov. 01 | BI247 | <i>Vriesea gigantea</i> |
| <i>Fibulobasidium</i> sp. nov. 01 | BI14 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| <i>Sirobasidium intermedium</i> | BI198 | <i>Vriesea procera</i> |
| <i>Sirobasidium intermedium</i> | BI292 | <i>Vriesea gigantea</i> |
| <i>Tremella</i> sp. nov. 01 | BI23 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Tremella</i> sp. nov. 01 | BI80 | <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Tremella</i> sp. nov. 01 | BI236 | <i>Vriesea friburgensis</i> |
| <i>Tremella</i> sp. nov. 01 | BI251 | <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Tremella</i> sp. nov. 02 | BI243 | <i>Bromelia antiacantha</i> |
| <i>Tremella</i> sp. nov. 03 | BI269 | <i>Tillandsia crocata</i> |
| Cystobasidiales | | |
| <i>Occultifur externus</i> | BI206 | <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Rhodotorula chungwhensis</i> sp. nov. | BI218 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |
| Filobasidiales | | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 05 | BI94 | <i>Tillandsia gardneri</i> |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 05 | BI210 | <i>Tillandsia geminiflora</i> |

^a Trinta isolados de afinidade basidiomicética não tiveram a identificação molecular realizada até o momento.

8.1.1.1 Subfilo Saccharomycotina

Três isolados correspondem a duas novas espécies descritas no presente trabalho, pertencentes ao gênero *Candida* (*C. vrieseae* - BI146 e *C. aechmeae* – BI153, BI259). O isolado BI242 recebeu a denominação *Candida* sp. nov. 01 por se tratar de uma outra provável espécie nova. Esse isolado apresentou mais de 35 substituições da espécie mais próxima *Candida quercitrusa* NRRL Y-5392 (código acesso GenBank U45831). Por esse motivo as análises devem ser repetidas, visto a possibilidade de haver uma sequência contaminante no meio. O isolado BI81 foi identificado como *Debaryomyces melissophilus*, e os isolados BI06, BI336 e EI01 como *Candida parapsilosis*.

8.1.1.1.2 Subfilo Taphrinomycotina

O único isolado encontrado, pertencente ao subfilo Taphrinomycotina e à Ordem Taphrinales, foi o EI05, este isolado foi denominado de *Lalaria* sp. nov. 01.

8.1.1.2 Filo Basidiomycota

8.1.1.2.1 Subfilo Pucciniomycotina

A ordem Erythrobasidiales está representada por 4 isolados pertencentes à espécie *Erythrobasidium hasegawianum*, doze isolados da espécie *Rhodotorula marina* e dois isolados da provável espécie nova *Rhodotorula* sp. nov. 01 (Tabela 1).

Os isolados pertencentes à ordem Microbotryales são *Rhodotorula bogoriensis* (n=1), *Rhodotorula nothofagi* (n=3), *Rhodotorula* sp. nov. 02 (n=1),

Rhodotorula sp. nov. 03 (n=1), *Rhodotorula* sp. nov. 04 (n=1), *Rhodotorula* sp. nov. 05 (n=3), *Rhodotorula* sp. nov. 06 (n=2), *Rhodotorula* sp. nov. 07 (n=1), *Rhodotorula* sp. nov. 08 (n=1).

A Ordem Sporidiobolales foi representada pelas espécies *Sporidiobolus pararoseus* (n=4), *Sporobolomyces tsugae* (n=2), *Sporobolomyces* sp. nov. 01 (n=1), *Sporobolomyces* sp. nov. 02 (n=1), *Sporobolomyces* sp. nov. 03 (n=1), *Sporobolomyces* sp. nov. 04 (n=2),

Por fim, a ordem Agaricostilbales está representada pelo isolado BI183 (*Bensingtonia* sp. nov. 01).

8.1.1.2.2 Subfilo Ustilaginomycotina

Dois isolados (BI122 e BI138) foram identificados como *Graphiola* sp. nov. 01. por serem prováveis espécies novas pertencentes a esse gênero e classificados na ordem Exobasidiales.

A ordem Microstromatales apresentou dois isolados: BI83 (*Sympodiomyopsis* sp. nov. 01) e EI04 (*Rhodotorula phylloplana*).

Os isolados BI52, BI63, BI77, BI109, BI120, BI154, BI181, BI224, BI229, BI232, BI235, BI238, BI277, BI286, BI302, BI305, BI307 e BI321 fazem parte do grande grupo de leveduras encontradas em bromélias pertencentes à espécie nova descrita no presente trabalho, *Farysizyma itapuensis*, e pertencem à ordem Ustilaginales.

8.1.1.2.3 Subfilo Agaricomycotina

A ordem Tremellales apresentou 66 representantes, sendo os isolados *Auricullibuler fuscus* (BI111) e *Dioszegia* sp. nov. 01 (BI247), os únicos representantes de seus respectivos gêneros, seguidos por três representantes do gênero *Bullera* (BI103 – *B. dendrophila*; BI196 - *B. sinensi* e BI335 – *Bullera* sp. nov.), um isolado da espécie *Fibulobasidium* sp. nov. 01, dois da espécie *Sirobasidium intermedium* (BI198 e BI292) e seis isolados no gênero *Tremella* (BI23; BI80; BI236; BI243; BI251; BI269). O gênero *Cryptococcus* é polifilético, tendo representantes nas ordens Filobasidiales, Tremellales e Cystofilobasidiales (Silva, 2003; Hibbet *et al.*, 2007). Na ordem Tremellales apresentou a espécie *C. flavescens* como espécie predominante do gênero (n=16). O isolado BI244 foi o único da espécie *C. podzolicus*. Já a espécie *C. bromeliarum* sp. nov., descrita durante o presente trabalho, apresentou quatro isolados, seguida das prováveis espécies novas encontradas: *Cryptococcus* sp. nov. 01 (n=8), *Cryptococcus* sp. nov. 02 (n=12), *Cryptococcus* sp. nov. 03 (n=2), *Cryptococcus* sp. nov. 04 (n=2), *Cryptococcus* sp. nov. 06 (n=1), *Cryptococcus* sp. nov. 07 (n=2), *Cryptococcus* sp. nov. 08 (n=1), *Cryptococcus* sp. nov. 09 (n=1), *Cryptococcus* sp. nov. 10 (n=1), *Cryptococcus* sp. nov. 11 (n=1).

As leveduras *Rhodotorula chungwhensis* sp. nov. (BI218) e *Occultifur externus* (BI206) pertencem à ordem Cystobasidiales e a espécie *Cryptococcus* sp. nov. 05 (n=2) foi a única da ordem Filobasidiales.

Leveduras dos gêneros *Sporobolomyces/Sporidiobolus*, *Bensingtonia*, *Bullera*, *Bulleromyces* e *Tilletiopsis* são capazes de formar balistosporos.

Porém somente em alguns de nossos isolados identificados nesses gêneros, foi possível observar essa característica (BI04, BI84, BI123, BI149, BI167, BI183, BI212 e BI234). Essa característica foi observada por meio da alta produção de balistosporos que algumas tiveram, permitindo que fosse observada sua imagem especular (por causa da ação da gravidade nos balistosporos) nas tampas das placas de Petri quando incubadas. Cabe ressaltar que os isolados BI04, BI84 e BI212 não foram identificados genotipicamente até o momento.

8.2 Diversidade de Leveduras

A Tabela 2 apresenta a frequência dos isolados obtidos de cada espécie de levedura em cada ponto de coleta amostrado.

A Figura 3 apresenta a curva de rarefação de espécies diferentes de leveduras com o aumento do número de amostras.

Tabela 2: Frequência dos isolados obtidos de cada ponto de coleta amostrado (Praia da Pedreira e Praia de Fora).

| Leveduras | Número total de isolados | Locais de amostragem | | Bromélias | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|--------------------------|----------------------|---------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------|
| | | Praia da Pedreira | Praia de Fora | <i>Achmeae recurvata</i> | <i>Billbergia nutans</i> | <i>Bromelia antiacantha</i> | <i>Dyckia</i> sp. | <i>Tillandsia crocata</i> | <i>Tillandsia gardneri</i> | <i>Tillandsia geminiflora</i> | <i>Tillandsia stricta</i> | <i>Vriesea friburgensis</i> | <i>Vriesea gigantea</i> | <i>Vriesea procera</i> |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| Ascomicetos | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Candida aechmeae</i> sp. nov | 2 | 0 | 2 | 1 ^b | 1 | | | | | | | | | |
| <i>Candida hawaiiiana</i> | 2 | 2 | 0 | | | | | 2 ^b | | | | | | |
| <i>Candida parapsilosis</i> | 3 | 1 | 2 | | | | | | 1 | | 1 | | | 1 |
| <i>Candida vrieseae</i> sp. nov. | 1 | 0 | 1 | | | | | | | | | | 1 ^c | |
| <i>Candida</i> sp. nov. 01 | 1 | 0 | 1 | | | 1 | | | | | | | | |
| <i>Debaryomyces melissophilus</i> | 1 | 1 | 0 | | | | | | 1 | | | | | |
| <i>Lalaria</i> sp. nov. 01 | 1 | 0 | 1 | | | | | | 1 | | | | | |

 Basidiomycetos

 Pucciniomycotina

Erythrobasidiales

| | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|----|----|---|---|--|----------------|---|---|---|
| <i>Erythrobasidium hasegawianum</i> | 4 | 2 | 2 | | | 2 | | 1 | 1 |
| <i>Rhodotorula marina</i> | 12 | 10 | 2 | 2 | | 1 ^b | 3 | 6 | |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 01 | 2 | 1 | 1 | | | | 1 | | 1 |
| <i>Sporobolomyces vermiculatus</i> | 1 | 0 | 1 | | | 1 | | | |

Microbotryales

| | | | | | | | | | |
|--------------------------------|---|---|---|---|---|----------------|----------------|---|-----|
| <i>Rhodotorula bogoriensis</i> | 1 | 0 | 1 | | | | 1 ^b | | |
| <i>Rhodotorula nothofagi</i> | 3 | 3 | 0 | | | 1 ^b | | | 1 1 |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 02 | 1 | 0 | 1 | | | | 1 | | |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 03 | 1 | 1 | 0 | | | | | | 1 |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 04 | 1 | 0 | 1 | 1 | | | | | |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 05 | 3 | 2 | 1 | | 1 | | | 1 | 1 |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 06 | 2 | 1 | 1 | | | 1 | | 1 | |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 07 | 1 | 0 | 1 | 1 | | | | | |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 08 | 1 | 0 | 1 | | | | 1 | | |

Sporidiobolales

| | | | | | | | | |
|-----------------------------------|---|---|---|----------------|---|----------------|---|---|
| <i>Sporidiobolus pararoseus</i> | 4 | 2 | 2 | | 2 | 1 ^b | | 1 |
| <i>Sporobolomyces tsugae</i> | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | |
| <i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 01 | 1 | 1 | 0 | | | | | 1 |
| <i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 02 | 1 | 0 | 1 | | | | 1 | |
| <i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 03 | 1 | 0 | 1 | 1 ^b | | | | |
| <i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 04 | 2 | 2 | 0 | | 1 | | 1 | |

Agaricostilbales

| | | | | | | | | |
|---------------------------------|---|---|---|--|---|--|--|--|
| <i>Bensingtonia</i> sp. nov. 01 | 1 | 0 | 1 | | 1 | | | |
|---------------------------------|---|---|---|--|---|--|--|--|

Ustilaginomycota**Exobasidiales**

| | | | | | | | | |
|---------------------------|---|---|---|--|--|---|--|---|
| <i>Graphiola</i> sp. nov. | 2 | 2 | 0 | | | 1 | | 1 |
|---------------------------|---|---|---|--|--|---|--|---|

Microstromatales

| | | | | | | | | |
|------------------------------------|---|---|---|--|--|---|---|--|
| <i>Sympodiomyopsis</i> sp. nov. 01 | 1 | 1 | 0 | | | | 1 | |
| <i>Rhodotorula phylloplana</i> | 1 | 0 | 1 | | | 1 | | |

Ustilaginales

| | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|----|----|---|---|---|----------------|---|---|---|---|
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov | 18 | 10 | 8 | 2 | 1 | 2 ^b | 2 | 9 | 1 | 1 |
|--------------------------------------|----|----|---|---|---|----------------|---|---|---|---|

Agaricomycotina

Tremellales

| | | | | | | | | | | |
|--|----|----|---|---|---|----------------|----------------|---|---|----------------|
| <i>Auriculibuller fuscus</i> | 1 | 1 | 0 | | | | | 1 | | |
| <i>Bullera dendrophila</i> | 1 | 1 | 0 | | 1 | | | | | |
| <i>Bullera sinensis</i> | 1 | 0 | 1 | | | | | | | 1 |
| <i>Bullera</i> sp. nov. 01 | 1 | 0 | 1 | | | | | | 1 | |
| <i>Cryptococcus bromeliarum</i> sp. nov. | 4 | 4 | 0 | | | | 2 | | 1 | 1 |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | 16 | 9 | 7 | 2 | 2 | 2 ^b | 5 ^b | 3 | 1 | 1 |
| <i>Cryptococcus podzolicus</i> | 1 | 0 | 1 | | 1 | | | | | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | 8 | 5 | 3 | 1 | 2 | 1 ^b | 1 | | 2 | 1 |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | 12 | 10 | 2 | 2 | 2 | 1 | 3 ^b | | 1 | 3 |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 03 | 2 | 1 | 1 | | | | | 1 | | 1 |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 04 | 2 | 1 | 1 | 1 | | | | | | 1 ^c |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 06 | 1 | 0 | 1 | | | | | 1 | | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 07 | 2 | 2 | 0 | | | 2 ^b | | | | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 08 | 1 | 0 | 1 | | | | | 1 | | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 09 | 1 | 0 | 1 | | | | | | 1 | |

| | | | | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 10 | 1 | 1 | 0 | | | | | 1 |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 11 | 1 | 1 | 0 | | | | | 1 |
| <i>Dioszegia</i> sp. nov. 01 | 1 | 0 | 1 | | | | | 1 |
| <i>Fibulobasidium</i> sp. nov. 01 | 1 | 1 | 0 | | | 1 | | |
| <i>Sirobasidium intermedium</i> | 2 | 1 | 1 | | | | | 1 1 |
| <i>Tremella</i> sp. nov. 01 | 4 | 2 | 2 | | | 2 | 2 | |
| <i>Tremella</i> sp. nov. 02. | 1 | 0 | 1 | 1 | | | | |
| <i>Tremella</i> sp. nov. 03 | 1 | 1 | 0 | | 1 | | | |
| Cystobasidiales | | | | | | | | |
| <i>Occultifur externus</i> | 1 | 0 | 1 | | | 1 | | |
| <i>Rhodotorula chungwhensis</i> sp. nov. | 1 | 0 | 1 | | | | 1 | |
| Filobasidiales | | | | | | | | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 05 | 2 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | |

a- Número de amostras.

b- Um isolado foi obtido a partir de flor da bromélia.

c- Um isolado foi obtido a partir de água de tanque de bromélia

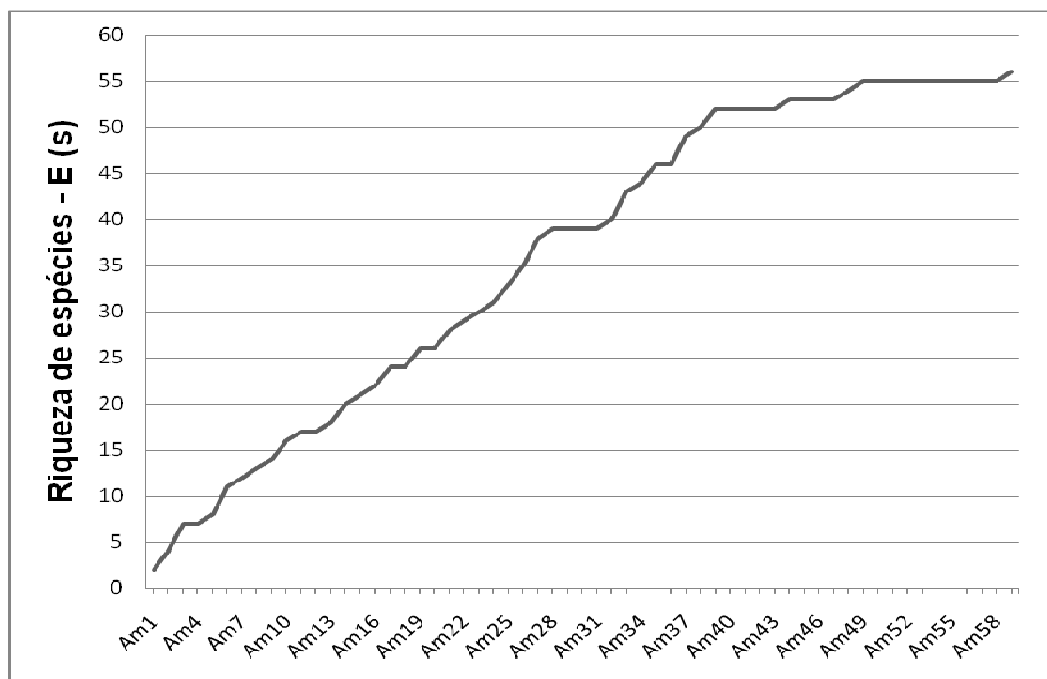


Figura 3: Curva de rarefação de espécies diferentes de leveduras com o aumento do número de amostras.

O índice de Shannon-Weaver (H) calculado para a Praia de Fora foi 3,471 e para a Praia da Pedreira 3,007. A riqueza de espécies (S) na Praia de Fora foi de 41 e na Praia da Pedreira de 32. Os isolados que ainda não foram identificados ($n=30$) não foram levados em consideração para os cálculos de diversidade e curva de rarefação.

8.3 Perfil enzimático

O perfil enzimático das leveduras está apresentado na Tabela 3 e nas Figuras 4 e 5.

Não foi possível concluir a identificação de alguns isolados até o presente momento. Sendo assim, estes são chamados de “isolado não identificado”.

A atividade amilolítica foi encontrada em 13% dos isolados testados (n=115), com um total de 14 isolados bons (+) ou fortes produtores (++). Todas as leveduras produtoras são de afinidade basidiomicética.

A produção de celulase foi detectada em 17% dos isolados testados. Nenhuma levedura de afinidade ascomicética apresentou resultado positivo. Os membros das ordens Erythrobasidiales e Ustilaginales foram os melhores produtores. A espécie *Farysizyma itapuensis* apresentou o maior número de isolados produtores (n=7), seguida da espécie *Erythrobasidium hasegawianum* (n=2). Os demais isolados pertencem aos gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*. Alguns dos isolados produtores ainda não foram identificados e alguns pertencem a possíveis espécies novas, dentro dos gêneros citados anteriormente.

A atividade lipolítica foi verificada por meio das hidrólises de azeite de oliva e tween 80. Um grande percentual de isolados obtidos de bromélias foi capaz de hidrolisar tween 80 (72%), em compensação, poucos apresentaram resultado positivo para hidrólise de azeite (cerca de 3%).

TABELA 3: Perfil enzimático das leveduras isoladas de bromélias.

| Isolados | Nº- isolado | Amilase (n=115) | Celulase (n=115) | Azeite (n=107) | Tween 80 (n=115) | Proteinase (n=115) | Pectinase (n=115) |
|-------------------------------------|----------------|--------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
| Ascomycetos | | | | | | | |
| <i>Candida aechmeae</i> sp. nov. | BI153 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Candida aechmeae</i> sp. nov. | BI259 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Candida parapsilosis</i> | BI06 | - | - | - | ++ | - | - |
| <i>Candida parapsilosis</i> | EI01 | - | - | + | - | ++ | - |
| <i>Candida parapsilosis</i> | BI336 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Candida vrieseae</i> sp. nov. | BI146 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Debaryomyces melissophilus</i> | BI81 | - | - | - | - | + | - |
| <i>Lalaria</i> sp. nov. | EI05 | - | - | - | - | - | - |
| Basidiomicetos | | | | | | | |
| Pucciniomycotina | | | | | | | |
| Erythrobasidiales | | | | | | | |
| <i>Erythrobasidium hasegawianum</i> | BI43 | - | + | - | W | - | - |
| <i>Rhodotorula marina</i> | BI25 | - | + | - | ++ | - | - |
| <i>Rhodotorula marina</i> | BI44 | - | W | - | W | - | - |
| <i>Rhodotorula marina</i> | BI256 | - | ++ | - | W | - | - |
| <i>Rhodotorula marina</i> | BI310 | - | - | - | ++ | ++ | - |
| <i>Rhodotorula marina</i> | BI319 | - | - | - | W | - | - |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 01 | BI02 | - | - | - | ++ | - | - |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 01 | BI327 | - | - | + | W | - | - |
| <i>Sporobolomyces vermiculatus</i> | BI252 | - | W | NR | ++ | - | - |
| Microbotryales | | | | | | | |
| <i>Rhodotorula bogoriensis</i> | BI179 | - | - | - | W | - | - |
| <i>Rhodotorula nothofagi</i> | BI65 | ++ | - | - | - | - | - |
| <i>Rhodotorula nothofagi</i> | BI114 | ++ | - | NR | - | - | - |
| <i>Rhodotorula nothofagi</i> | BI280 | ++ | - | - | - | - | - |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 02 | BI215 | - | - | - | ++ | - | - |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 03 | BI116 | - | - | - | W | - | - |

TABELA 3: Continuação - Perfil enzimático das leveduras isoladas de bromélias.

| | | | | | | | |
|--------------------------------------|-------|----|----|----|----|----|---|
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 05 | BI108 | - | W | NR | - | - | - |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 05 | BI124 | - | + | - | - | - | - |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 05 | BI240 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 06 | BI24 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 06 | BI208 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 07 | BI158 | - | - | - | - | W | - |
| Sporidiobolales | | | | | | | |
| <i>Sporidiobolus pararoseus</i> | BI85 | ++ | - | NR | W | ++ | - |
| <i>Sporidiobolus pararoseus</i> | BI89 | ++ | - | + | - | ++ | - |
| <i>Sporidiobolus pararoseus</i> | BI167 | ++ | - | NR | W | ++ | - |
| <i>Sporidiobolus pararoseus</i> | BI234 | ++ | - | - | W | - | - |
| <i>Sporobolomyces tsugae</i> | BI173 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Sporobolomyces tsugae</i> | BI316 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 01 | BI50 | - | + | - | W | - | - |
| <i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 03 | BI149 | - | - | NR | - | ++ | - |
| <i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 04 | BI100 | - | - | - | W | - | - |
| <i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 04 | BI113 | - | - | - | W | - | - |
| Ustilaginomycota | | | | | | | |
| Exobasidiales | | | | | | | |
| <i>Graphiola</i> sp. nov. 01 | BI122 | - | - | - | - | ++ | - |
| <i>Graphiola</i> sp. nov. 01 | BI138 | - | - | - | W | ++ | - |
| Microstromatales | | | | | | | |
| <i>Rhodotorula phylloplana</i> | EI04 | - | - | - | - | - | - |
| Ustilaginales | | | | | | | |
| <i>Farysizyia itapuensis</i> sp. nov | BI52 | - | W | - | ++ | - | - |
| <i>Farysizyia itapuensis</i> sp. nov | BI77 | - | W | - | ++ | - | - |
| <i>Farysizyia itapuensis</i> sp. nov | BI109 | - | ++ | - | ++ | - | - |
| <i>Farysizyia itapuensis</i> sp. nov | BI120 | - | - | - | ++ | - | - |
| <i>Farysizyia itapuensis</i> sp. nov | BI154 | - | - | NR | W | ++ | - |
| <i>Farysizyia itapuensis</i> sp. nov | BI181 | - | - | - | W | ++ | - |
| <i>Farysizyia itapuensis</i> sp. nov | BI232 | - | - | - | - | ++ | - |
| <i>Farysizyia itapuensis</i> sp. nov | BI235 | - | - | - | - | ++ | - |
| <i>Farysizyia itapuensis</i> sp. nov | BI277 | - | - | - | W | ++ | - |
| <i>Farysizyia itapuensis</i> sp. nov | BI286 | - | + | - | W | ++ | - |
| <i>Farysizyia itapuensis</i> sp. nov | BI302 | - | + | - | W | ++ | - |

TABELA 3: Continuação - Perfil enzimático das leveduras isoladas de bromélias.

| | | | | | | | |
|--------------------------------------|-------|----|----|---|----|----|----|
| <i>Farysizyia itapuensis</i> sp. nov | BI305 | - | - | - | ++ | ++ | - |
| <i>Farysizyia itapuensis</i> sp. nov | BI307 | - | ++ | - | W | ++ | - |
| <i>Farysizyia itapuensis</i> sp. nov | BI321 | - | + | - | W | ++ | - |
| Agaricomycotina | | | | | | | |
| Tremellales | | | | | | | |
| <i>Auriculibuller fuscus</i> | BI111 | ++ | - | - | ++ | ++ | - |
| <i>Bullera sinensis</i> | BI196 | NR | - | - | NR | NR | - |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI91 | - | - | - | ++ | ++ | - |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI144 | - | - | - | ++ | - | - |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI200 | - | - | - | ++ | ++ | - |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI204 | - | - | - | ++ | ++ | - |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI207 | - | - | - | ++ | W | - |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI220 | - | - | - | W | - | - |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI231 | - | - | - | ++ | - | - |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI272 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI276 | - | - | - | ++ | - | - |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI278 | - | - | - | ++ | ++ | - |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI281 | - | - | - | ++ | ++ | - |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI282 | - | - | - | ++ | ++ | - |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI283 | - | - | - | ++ | ++ | - |
| <i>Cryptococcus flavescens</i> | BI296 | - | - | - | ++ | W | - |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | BI142 | - | - | - | ++ | - | - |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | BI169 | - | - | - | ++ | - | NR |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | BI202 | - | - | - | ++ | - | - |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | BI299 | - | - | - | W | - | - |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | BI309 | - | - | - | + | - | - |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | BI311 | - | - | - | ++ | - | - |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI96 | - | - | - | ++ | - | - |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI203 | - | - | - | + | - | - |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI279 | - | - | - | ++ | - | - |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI284 | - | - | - | W | ++ | - |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI320 | - | - | - | ++ | - | - |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 03 | BI118 | - | - | - | ++ | W | - |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 03 | BI264 | - | - | - | ++ | - | - |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 04 | BI195 | - | - | - | ++ | - | - |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 04 | BI295 | - | - | - | ++ | - | - |

TABELA 3: Continuação - Perfil enzimático das leveduras isoladas de bromélias.

| | | | | | | | |
|--|-------|----|----|----|----|----|----|
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 07 | BI141 | ++ | ++ | - | ++ | ++ | - |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 08 | BI223 | - | - | - | ++ | - | - |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 09 | BI237 | - | ++ | NR | ++ | - | NR |
| <i>Dioszegia</i> sp. nov. 01 | BI247 | W | - | - | ++ | - | - |
| <i>Fibulobasidium</i> sp. nov. 01 | BI14 | - | - | - | W | - | - |
| <i>Sirobasidium intermedium</i> | BI198 | - | - | - | W | - | - |
| <i>Sirobasidium intermedium</i> | BI292 | - | - | - | ++ | - | - |
| <i>Tremella</i> sp. nov. 01 | BI236 | ++ | - | - | ++ | - | - |
| <i>Tremella</i> sp. nov. 02 | BI243 | - | - | - | W | - | - |
| <i>Tremella</i> sp. nov. 03 | BI269 | - | - | - | W | - | - |
| Cystobasidiales | | | | | | | |
| <i>Occultifur externus</i> | BI206 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhodotorula chungwhensis</i> sp. nov. | BI218 | - | - | - | W | - | - |
| <i>Isolado não identificado</i> | BI84 | ++ | - | - | W | - | - |
| <i>Isolado não identificado</i> | BI182 | - | - | - | ++ | ++ | - |
| <i>Isolado não identificado</i> | BI211 | - | W | - | W | - | - |
| <i>Isolado não identificado</i> | BI212 | ++ | - | - | ++ | ++ | - |
| <i>Isolado não identificado</i> | BI228 | - | + | - | + | - | - |
| <i>Isolado não identificado</i> | BI233 | ++ | - | - | - | ++ | - |
| <i>Isolado não identificado</i> | BI245 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Isolado não identificado</i> | BI300 | - | - | - | W | ++ | - |
| <i>Isolado não identificado</i> | BI317 | - | - | - | W | - | - |
| <i>Isolado não identificado</i> | BI322 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Isolado não identificado</i> | BI323 | - | - | - | W | - | - |
| <i>Isolado não identificado</i> | BI329 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Isolado não identificado</i> | BI330 | - | NR | - | - | W | - |
| <i>Isolado não identificado</i> | BI333 | - | + | - | W | - | - |
| <i>Isolado não identificado</i> | BI334 | - | - | - | ++ | ++ | - |
| <i>Isolado não identificado</i> | BI335 | ++ | - | NR | - | W | - |
| <i>Isolado não identificado</i> | EI03 | - | - | - | - | ++ | - |

(-) negativo; (w) fraco; (+) positivo; (++) forte atividade; (NR) teste não realizado.

Obs. Os isolados não identificados ainda estão em processo de identificação genotípica.

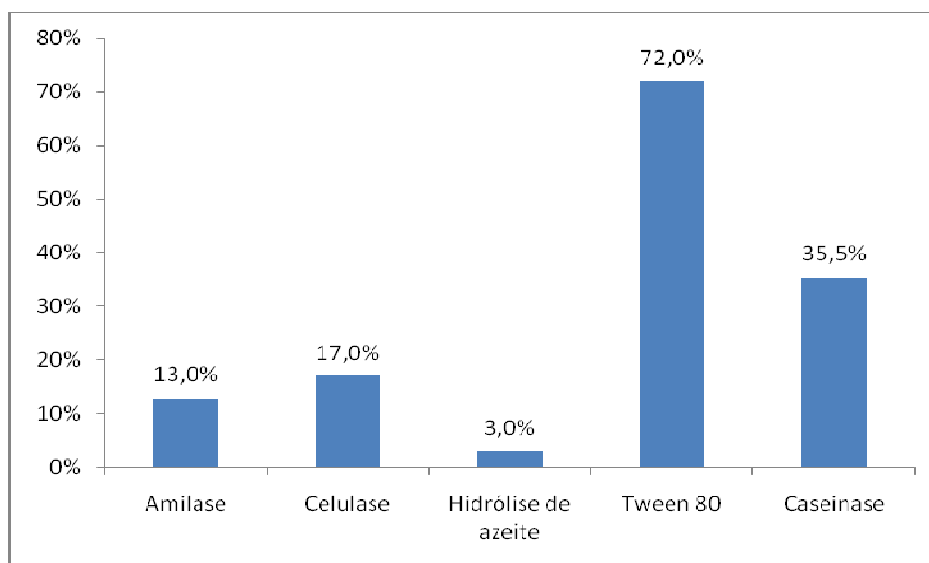


Figura 4: Percentual de produção das enzimas por leveduras isoladas de bromélias.

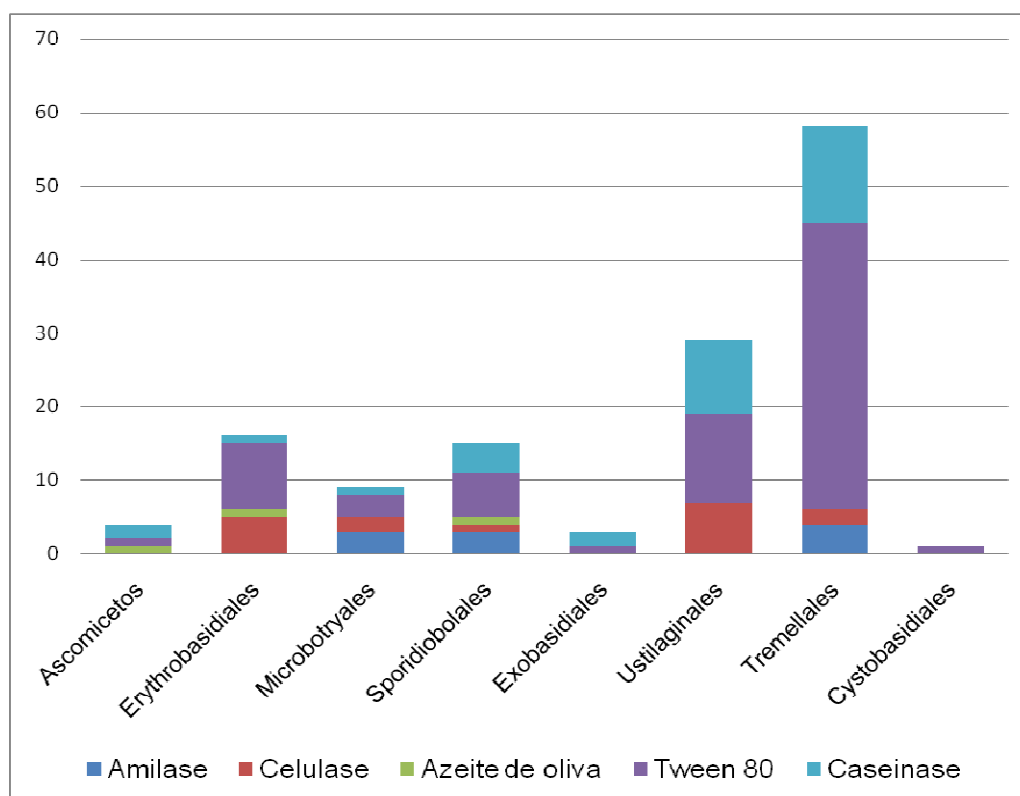


Figura 5: Distribuição da produção das enzimas pelos diferentes grupos taxonômicos.

Entre as leveduras de afinidade ascomicética, somente a levedura EI01 (*Candida parapsilosis*) apresentou resultado positivo. Em relação aos basidiomicetos, somente os isolados BI89 (*Sporidiobolus pararoseus*) e BI327 (*Rhodotorula* sp. nov. 01) apresentaram resultado positivo para hidrólise de azeite. A hidrólise de tween 80 foi difundida em todos os grupos de leveduras isoladas, apresentando melhores resultados na ordem Tremellales (Tabela 3 e Figura 5).

Os isolados obtidos de bromélias foram bons produtores de proteinase (35,5%). Entre as leveduras de afinidade ascomicética, somente a levedura EI01 (*Candida parapsilosis*) apresentou resultado positivo (++). Em relação aos basidiomicetos, membros das ordens Tremellales e Ustilaginales, onde os gêneros *Cryptococcus* e *Farysizyma* foram melhores produtores.

Nenhum isolado apresentou resultado positivo para todas as enzimas testadas e nenhum isolado apresentou resultado positivo para a enzima pectinase.

9. DISCUSSÃO

9.1 Comunidade de leveduras associadas a bromélias

Quanto ao isolamento de leveduras endofíticas, foram obtidos quatro isolados: EI01 (*Candida parapsilosis*), EI03, EI04 (*Rhodotorula phylloplana*) e EI05 (*Lalaria* sp. nov.). O isolado EI03 ainda não foi identificado genotipicamente. Esta metodologia resultou no isolamento de um pequeno número de leveduras e foi aplicada em apenas uma coleta. Camatti-Sartori *et al.* (2005) encontraram *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* e *Debaryomyces* como gêneros de leveduras endofíticas mais representativos em maçãs no Brasil. Pirttilä *et al.* (2003) isolou *Rhodotorula minuta* como levedura endofítica de *Pinus sylvestris*, enquanto Nassar *et al.* (2005), encontraram a espécie *Williopsis saturnus* como levedura endofítica das raízes de milho. Xin *et al.* (2009) verificaram a produção de ácido indol acético por leveduras endofíticas das espécies *Rhodotorula graminis* e *Rhodotorula mucilaginosa* isoladas de algodão. A espécie *Farysizyma itapuensis*, apesar de ter sido a mais freqüente no presente trabalho, não foi encontrada entre os endofíticos, provavelmente por causa do pequeno esforço amostral para isolamento das leveduras endofíticas. Como ela é filogeneticamente próxima a espécies de fungos fitopatogênicos, seria esperado encontrá-la entre os endofíticos.

Filo Ascomycota

Apesar do baixo índice de leveduras de afinidade ascomicética encontradas, o gênero *Candida* foi o mais freqüente dentro deste grupo (n= 9). Esse gênero é bastante heterogêneo (Meyer *et al.*, 1998).

Apesar da maioria dos trabalhos relatarem leveduras basidiométicas como principais no filoplano, em alguns casos, no entanto, leveduras ascomicéticas foram registradas como importantes colonizadoras da superfície de folhas (Phaff & Starmer, 1987; Middelhoven, 1997; Azeredo *et al.* 1998; Jager *et al.*, 2001).

Filo basidiomycota

Houve uma predominância de leveduras basidiomicéticas (94%), corroborando com os relatos de que a população de leveduras da maioria das superfícies de plantas é dominada por basidiomicetos (Bab'Eva & Chernov, 1995; Santos *et al.*,1996; Azeredo *et al.*, 1998; Jager *et al.*, 2000; Inácio *et al.*, 2002; Silva, 2003).

Os gêneros mais comumente encontrados em associação com o filoplano de bromélias foram *Sporidiobolus/Sporobolomyces*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*, corroborando com os relatos de que esses gêneros são os mais numerosos no filoplano (Jager *et al.*, 2001; Sampaio *et al.*, 2003; Fonseca & Inácio, 2006; Kachalkin *et al.*, 2008) e o gênero *Farysizyma* gen. nov..

Subfilo Pucciniomycotina

O subfilo inclui fungos saprofíticos, parasitas de plantas, animais e fungos. Entretanto, cerca de 90% desses são fitopatógenos (Aime *et al.*, 2006). Fell *et al.* (2001) relatam que não se tem informação se as leveduras pertencentes ao grupo são simplesmente saprófitas ou seriam estados leveduriformes de fungos dimórficos fitopatogênicos.

As espécies pertencentes à ordem Erythrobasidiales são comumente encontradas em associação com plantas. No entanto, não há relatos de fitopatogenicidade com seus representantes (Silva, 2003). Foram encontrados dezoito isolados pertencentes à ordem (quatro isolados da espécie *Erythrobasidium hasegawianum*, doze isolados de *Rhodotorula marina* e dois isolados da provável espécie nova *Rhodotorula* sp. nov. 01).

A ordem Microbotryales compreende um grupo extremamente diversificado de fungos. Este grupo inclui fungos fitopatógenos, micoparasitas e fungos saprofíticos, que demonstram estar presentes em uma gama de nichos ecológicos, assim com também apresentam preferências ecológicas distintas (Sampaio *et al.*, 2003). No presente estudo, encontrou-se 14 isolados pertencentes à essa ordem (Tabela 1). Apesar desse gênero ser considerado saprofítico e comum no filoplano, Sampaio *et al.*, (2003) não descarta o parasitismo no grupo de saprofíticos, visto que não se conhece seus ciclos de vida em condições naturais. Bauer *et al.* (1997) já relataram o micoparasitismo nos gêneros *Leucosporidium*, *Rhodosporeidium* e *Sporidiobolus*.

Membros das ordens Sporidiobolales e Agaricostilbales também têm sido amplamente isolados a partir do filoplano (Nakase & Suzuki, 1995; Hamamoto & Nakase, 2000; Fungsin *et al.*, 2001; Nakase *et al.*, 2006).

Subfilo Ustilaginomycota

O subfilo Ustilaginomycota compreende mais de 1400 fungos fitopatógenos (Bauer *et al.*, 2006). Poucas espécies de leveduras têm sido incluídas nessa classe (ex. *Pseudozyma* spp., *Rhodotorula acheniorum* e *Rhodotorula bacarum*) e são geralmente encontradas na superfície das plantas (Inácio *et al.*, 2008). Alguns autores já relataram o isolamento de leveduras também de amostras clínicas (Sugita *et al.*, 2003).

Os dois isolados pertencentes à ordem Exobasidiales são prováveis espécies novas do gênero *Graphiola*. Os membros dessa ordem, chamados de carvões, estão na maioria das vezes, ligados a fitopatogenicidade (Callan & Carris, 2004). No que se refere ao gênero, a espécie *G. phoenisis* é conhecida por ser fitopatogênica de palmeiras, causando a chama “mancha foliar de *Grafiola*” (Russomano & Kruppa, 2008). Os dois isolados obtidos de bromélias apresentam colônias butirosas e rosadas. Esses resultados estão de acordo com Tubaki & Yokoyama (1971) que testaram a espécie *G. phoenisis* quanto ao comportamento em meios de cultura artificiais e viram que as células se reproduziam por brotamento e formavam colônias rosadas.

A ordem Ustilaginales teve como representante a espécie nova *Farysizyma itapuensis*. Esta espécie está próxima filogeneticamente de *F. taiwaniana*, *F. setubalensis* e *F. acheniorum*. Essas quatro espécies pertencem

ao clado *Faryzia* e receberam uma classificação especial por serem as únicas leveduras do clado, estando próximas filogeneticamente dos fungos fitopatogênicos *Farysia chardoniana* e *F. thuememii* (Inácio *et al.*, 2008).

Subfilo Agaricomycotina

Os membros da ordem Tremellales foram mais abundantes no filoplano de bromélias, apresentando também um grande número de espécies novas. Grupos de pesquisa de diversos países já vêm reportando e descrevendo espécies novas isoladas do filoplano e pertencentes aos Tremellales (Bai *et al.* 2002; Inácio *et al.*, 2002; Silva, 2003; Inácio *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2003, 2007; 2008).

A espécie nova encontrada, *Rhodotorula chungwhensis* sp. nov. (BI218) e a levedura *Occultifur externus* (BI206) pertencem à ordem Cystobasidiales. A espécie *Occultifur externus* foi re-classificada por Bauer *et al.* (2006). Antes, essa espécie pertencia à ordem Erythrobasidiales (Silva, 2003). A espécie *Rhodotorula chungwhensis* sp. nov. está próxima filogeneticamente de *Occultifur externus*.

A espécie *Cryptococcus* sp. nov. 05 (n=2) foi a única levedura isolada da ordem Filobasidiales, apesar de espécies pertencentes à essa ordem serem comumente associadas ao filoplano (Silva, 2003).

As leveduras apresentam uma grande diversidade, muitas vezes desempenhando funções cruciais na natureza, como por exemplo, na manutenção de ecossistemas. Apesar de sua importância, poucos microrganismos são caracterizados e descritos. Vale ressaltar que boa parte da

biotecnologia atual é derivada de estudos com enfoque na diversidade, fisiologia e genética de microrganismos, entre outros.

Com o esforço amostral do presente trabalho, teve-se a intenção de obter amostras até que se obtivesse diversos isolados das espécies mais comuns. Obteve-se de fato, muitas isolados de *Farysyzyma itapuensis*, que parece ser a levedura mais abundante associada às bromélias amostradas. Algumas outras espécies foram também comuns: *Cryptococcus flavescens*, *Cryptococcus bromeliarum*, *Rhodotorula marina*, *Cryptococcus* sp. nov. 01 e *Cryptococcus* sp. nov. 02 . Porém, obteve-se um grande número de espécies com um ou poucos isolados. Com aumento no número de coletas, não aumentou o número de isolados nestas espécies raras. Sabe-se que os conhecimentos ecológicos sobre as espécies raras são controversos, porém acredita-se que o fato de se ter obtido tão poucas espécies dominantes e muitas espécies raras, apesar do nosso esforço de amostragem e duração do inquérito inteiro (3 anos de amostragem) sejam informações válidas. Segundo Forney *et al.* (2004), a estrutura das comunidades microbianas normalmente se desvia da distribuição normal, tendo poucas espécies abundantes e muitas raras, o que é corroborado pelos nossos resultados.

9.2 Diversidade de Leveduras

O fato de que a curva de rarefação de espécies estabilizou a partir da amostra 38 (Figura 3) significa que a diversidade de espécies de leveduras no ambiente amostrado foi totalmente explorada, sendo sido muito provavelmente encontrados representantes de todas as espécies presentes naquele habitat.

Os índices de diversidade de espécies relatam o número de espécies e a importância relativa individual das mesmas. Quando se compara os valores do índice de biodiversidade de Shannon-Weaver (H), estes são superiores na Praia de Fora ($H= 3,471$) em relação à Praia da Pedreira ($H= 3,007$). Da mesma forma ocorre com a riqueza de espécies (S), onde a Praia de Fora apresentou maior riqueza ($S=41$) em relação à Praia da Pedreira ($S=32$). A composição de espécies de bromélias amostradas nos dois pontos de coleta foi similar, portanto, esse fato não justifica a diferença de diversidade nos dois pontos. Já era esperado que na Praia de Fora houvesse uma maior diversidade, já que se trata de um local onde não há ação antrópica, pois é uma praia que não estava aberta ao público no período das coletas. A Praia da Pedreira, além de ser um local mais explorado pelo homem, ainda recebe diversos visitantes em suas trilhas.

Os isolados que ainda não foram identificados ($n=30$) não foram levados em consideração para os cálculos de diversidade. Como o número de isolados não identificados em cada ponto não diferiu significativamente (Praia da Pedreira = 14 e Praia de Fora= 16), isso provavelmente não influenciaria de forma significativa os índices de diversidade.

Na dissertação de Mestrado (Landell, 2006), realizada como uma prévia ao presente trabalho, os valores do índice de biodiversidade de Shannon-Weaver (H), assim como também a riqueza de espécies (S), foram superiores na Praia da Pedreira ($H=3,225$ e $S=34$) em relação à Praia de Fora ($H=2,820$ e $S=26$). Essa discrepância nos resultados encontrados pode ser devida ao fato da diferença na metodologia de identificação, baseada apenas em

características morfológicas e fisiológicas/bioquímicas no trabalho de Mestrado, resultando em uma identificação errônea ou apenas até nível de gênero. Essa discrepância demonstra a importância da identificação molecular dos isolados ambientais de leveduras, já que a sua identificação apenas por métodos clássicos é bastante dúbia.

Valente (2000) estudou a presença de leveduras em bromélias no Rio de Janeiro. Apesar de também ter estudado a associação com o filoplano, obteve uma diversidade bem diferente da encontrada no presente trabalho. Com cerca de 32% de leveduras ascomicéticas, 54,6% de leveduras basidiomicéticas e 13,4% de fungos semelhantes a leveduras.

Mautone (2008) estudou a diversidade de leveduras isoladas de figueiras no Parque de Itapuã, Viamão, RS e apesar de ter realizado o trabalho no mesmo local de amostragem, não apresentou a mesma comunidade de leveduras associadas a bromélias, nem tão pouco isolou a espécie *Farysizyma itapuensis* sp. nov., predominante em bromélias.

Cabe ressaltar que a metodologia utilizada para identificação da maior parte dos isolados nos dois trabalhos foi identificação clássica para leveduras.

Trabalhos com o filoplano de plantas realizados no Brasil, na Ásia e na Europa (Valente, 2000; Silva, 2003; Morais *et al.*, 2006; Nakase *et al.*, 2006; Kachalkin *et al.*, 2008; Mautone, 2008), apesar de reportarem a presença dos gêneros e algumas espécies que são comumente associados ao filoplano de plantas, não apresentaram o mesmo conjunto de espécies encontradas no filoplano das bromélias analisadas, além de termos encontrado até o momento um grande número de possíveis espécies novas.

9.3 Perfil enzimático

A cutícula é formada por camadas bem organizadas de cutina e cera e abrange toda superfície aérea das plantas. Os ácidos graxos de cadeia longa são necessários para formação da cutícula e foram recentemente associados à defesa da planta (Raffaele *et al.*, 2009). Esses compostos constituem a camada mais externa da células epidérmicas, e, portanto, a primeira barreira encontrada por patógenos no ambiente natural. Essa hipótese tem origem na observação de que muitas vezes os fungos fitopatogênicos secretam enzimas como cutinases quando interagem com a planta, e que os monômeros cutina induzem a formação de apressórios em fungos como *Erysiphe graminis* (Francis *et al.*, 1996).

A cutícula e as barreiras lipídicas das folhas das plantas dificultam a liberação de nutrientes para o meio externo da planta (Silva, 2003), sendo a capacidade de degradação dessas substâncias estruturais das folhas uma possível vantagem para os microrganismos colonizadores do filoplano (Motzel & Cook, 1958). Apesar de não haverem relatos de leveduras fitopatogênicas, a produção de enzimas que degradem essas substâncias pode ter um papel fundamental na fitopatogenicidade, pois a degradação da parede celular permitirá a entrada dos fungos fitopatogênicos para os tecidos internos das folhas, como também disponibilizará os nutrientes para seu desenvolvimento (St. Leger *et al.* 1997). Além disso, as leveduras poderiam representar a forma unicelular saprofítica de fungos reconhecidamente fitopatogênicos (Fell *et al.*, 2001; Silva, 2003). Grande parte das leveduras isoladas de bromélias pertencem a grupos taxonômicos que contêm fungos fitopatogênicos (Tabela

1). Os isolados pertencentes a esses grupos foram melhores produtores de celulase, esterase (hidrólise de tween 80) e protease (Tabela 3), sendo as três enzimas envolvidas em processos de fitopatogenicidade (Maccheroni *et al.*, 2004).

A atividade lipolítica dos isolados de bromélias, por meio dos dois substratos testados, quando comparados entre eles, foi muito discrepante (3% óleo de oliva e 71,5% tween 80). Buzzini & Martini (2002) estudando a atividade enzimática de leveduras de ambientes tropicais encontraram um alto percentual de leveduras capazes de hidrolisar Tween 80 (81%).

O uso do óleo de oliva como substrato para de atividade lipolítica já é bem difundido (Boekema *et al.* 2007). No entanto, a utilização do tween 80 também tem sido explorada (Plou *et al.*, 1998; Buzzini & Martini, 2002). Boekema *et al.* (2007), estudando a estimulação da produção de lipase/esterase por meio de tween 80, observaram que ele funciona como indutor do operon da lipase. Era esperado que as leveduras fossem capazes de hidrolisar preferencialmente ácidos graxos de cadeia curta, como no caso do óleo de oliva, por ser de fácil assimilação. No entanto, essa preferência por ácidos graxos de cadeia longa (Tween 80) pode estar relacionada ao substrato (cutícula), que também é formada por ácidos graxos de cadeia longa, o que além de poder trazer uma vantagem seletiva para essas leveduras, reabre a discussão sobre o papel na fitopatogenicidade.

No estudo anterior (Landell, 2006), foram encontrados 40,2% dos isolados positivos para amilase. Entretanto, cerca de 70% dos isolados analisados naquele trabalho eram fungos leveduriformes. Isso pode justificar o

alto percentual de isolados produtores de enzimas durante o trabalho anterior. No presente estudo, optou-se em estudar somente leveduras, obtendo o percentual de 14% isolados positivos, sendo os membros de Microbotryales e Sporidiobolales os melhores produtores (Tabela 3). A produção de amilase por leveduras isoladas de diferentes substratos de Mata Atlântica foi testada por Buzzini & Martini (2002), que obtiveram um baixo percentual de leveduras amilolíticas utilizando uma metodologia similar. Fuentefria & Valente (2005), analisando leveduras de filoplano, obtiveram apenas 22% de produtores de amilase.

Silva (2003), estudando a atividade enzimática de leveduras associadas ao filoplano de diversas plantas no Mediterrâneo também obteve um baixo percentual de leveduras produtoras de amilase. No entanto, a maioria dos isolados que apresentaram resultados positivos se encontram na ordem Tremellales. A maior parte dos isolados de bromélias que foram produtores se encontra na ordem Sporidiobolales. Porém, outros autores encontraram alto percentual de leveduras capazes de degradar amido isoladas de diferentes substratos (Straus *et al.*, 2001).

Do total de leveduras testadas, 17% apresentaram resultado positivo para celulase. Sete isolados da espécie *Faryzisyra itapuensis* apresentaram os melhores resultados (Tabela 3), o que pode estar correlacionado ao fato desta espécie pertencer a um clado de fungos fitopatogênicos. Fuentefria (2004) encontrou 38% de seus isolados produtores de celulase, sendo que boa parte se encontra no grupo de fungos leveduriformes, com destaque para o gênero *Aureobasidium*.

A atividade proteolítica foi verificada por meio da produção de proteinase. Esse substrato é amplamente utilizado em estudos de avaliação de atividade proteolítica em leveduras (Foda & El-Din, 1979). Os isolados obtidos de bromélias foram bons produtores de proteinase (35,5%), sendo os membros de Ustilaginales e Tremellales os melhores produtores (Tabela 3).

Buzzini & Martini (2002) obtiveram 31% de basidiomicetos caseinolíticos, 3,6% de ascomicetos e 15,2% de fungos leveduriformes. Braga *et al.* (1998) testaram a produção de proteinase por leveduras isoladas da fruta amazônica amapa (*Parahancornia amapa*) e de moscas *Drosophila* associadas. Aproximadamente 26% dos isolados analisados foram capazes de hidrolisar a caseína. Alguns isolados fortemente proteolíticos tiveram a produção de proteinase testada em diferentes pH. As maiores atividades foram encontradas em pH 3,0 a 5,0. Nosso teste para produção de proteinase foi em pH 7,0, o que sugere a possibilidade de obtenção de mais isolados proteolíticos se diferentes pH forem testados. Abranches *et al.* (1997), estudando a comunidade de leveduras associadas a diferentes habitats tropicais, observaram que as leveduras basidiomicéticas foram mais freqüentemente proteolíticas do que as ascomicéticas e que a produção de proteases extracelulares pode ser importante para as leveduras terem acesso a mais fontes de nitrogênio, obtendo um equilíbrio nutricional com as fontes de carbono disponíveis.

A produção de pectinase por leveduras já tem sido estudada (Biely & Slavikova, 1994; Schwan *et al.*, 1997; Silva, 2003), principalmente por leveduras isoladas de frutas (da Silva *et al.*, 2005). Entretanto, nenhum isolado

de bromélia foi capaz de hidrolisar pectina nas condições e meio de cultura testado.

Fuentefria (2004), ao contrário do presente trabalho, encontrou um percentual mais alto de bons produtores de enzimas. A metodologia de isolamento utilizada foi a técnica de *imprinting*, na qual as folhas são colocadas em contato com o meio de cultura em placas de Petri por um determinado tempo, sendo retiradas e as placas incubadas até o aparecimento de colônias. Essa diferença metodológica resultou em maior isolamento de fungos leveduriformes do que no presente trabalho. Como esses fungos possuem uma maior capacidade de produção de enzimas extracelulares que as leveduras verdadeiras, a diferença observada entre os dois trabalhos já era esperada.

Trabalhos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa ressaltam a importância biotecnológica das leveduras isoladas de habitats naturais e demonstram que o filoplano é um ótimo substrato para o isolamento de leveduras com potencial para aplicação biotecnológica e para o isolamento de novas espécies de leveduras (Fuentefria, 2004; Fuentefria & Valente, 2005; Landell, 2006; Landell *et. al.*, 2005, 2006; Lock, 2007; Inácio *et. al.*, 2008; Bussamara *et. al.*, 2010).

10. CONCLUSÕES

No presente trabalho foram descritas 4 espécies novas de leveduras (*Farysizyma itapuensis* sp. nov., *Cryptococcus bromeliarum* sp. nov., *Candida aechmeae* e *Candida vrieseae* sp. nov.).

Do total de leveduras identificadas genotipicamente (n=148), cerca de 61% são prováveis espécies novas de leveduras (39 espécies diferentes) e que estão em processo de descrição.

Comparando-se a biodiversidade de leveduras nos dois pontos do Parque de Itapuã estudados, a Praia de Fora apresentou maior diversidade e riqueza de leveduras em relação à Praia da Pedreira. Esse resultado já era esperado, visto que a Praia de Fora é um local mais preservado dentro do parque, sendo o local de coleta aberto somente para fins de pesquisa. Já a Praia da Pedreira é um local que sofreu forte ação antrópica no passado e hoje, por ter a Trilha do Araçá aberta ao público, continua sofrendo essa ação.

Analisando-se o perfil enzimático das linhagens obtidas de bromélias, verificou-se que 13% apresentaram resultado positivo para a enzima amilase, 17% para celulase, 3% para hidrólise de azeite de oliva, 72% para a hidrólise de tween 80 e 35,5% para proteinase. Nenhum isolado apresentou resultado positivo para a enzima pectinase. Os estudos de atividade enzimática de

leveduras provenientes de habitats tropicais ainda estão se iniciando, sendo que a maioria é focalizada na produção de enzimas proteolíticas. Mais estudos são necessários para suprir a falta de conhecimento sobre a produção de outras enzimas.

Os resultados obtidos pelas leveduras como boas fontes de enzimas com aplicação biotecnológica, juntamente com o isolamento de um grande número de espécies de leveduras ainda não descritas, revelaram o grande potencial do filoplano de bromélias como substrato para o estudo da interação leveduras saprofitas-planta e identificação de novas espécies de leveduras, visto que estudos taxonômicos e ecológicos, abordando novas espécies de leveduras isoladas no Brasil são raros e no que se refere à região sul, são praticamente inexistentes.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, J. *et al.* The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.328-336, 1997.

AIME, M.C. *et al.* An overview of the higher level classification of Pucciniomycotina based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. **Mycologia**, Philadelphia, v. 98, p. 896-905, 2006.

ALTSCHUL, S.F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Inglaterra, v. 25, p.3389-3402, 1997.

ANDREWS J. H.; HARRIS R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v. 38, p. 145-180, 2000.

ARAÚJO, F. V. *et al.* A preliminary note on yeast communities of bromeliad-tank waters of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo. v. 29, p. 118-121, 1998.

AZEREDO, L. A. I. *et al.* Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. **International Microbiology**, Barcelona, v. 1, p. 205-208, 1998.

BAB'EVA, I.P.; CHERNOV, I.Y. Geographic aspects of yeast ecology. **Physiology and General Biology Reviews**, London, v. 9, p.1-54, 1995.

BAI, F.Y. *et al.* *Dioszegia zsoitii* sp. nov., a new ballistoconidium-forming yeast species with two varieties. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 48, p.17-23, 2002.

BAI, F.Y. *et al.* *Bullera anomala* sp. nov. and *Bullera pseudovariabilis* sp. nov., two new ballistoconidium-forming yeast species from Yunnan, China. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.83, p.257-263, 2003.

BALEIRAS-COUTO *et al.* Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-Saccharomyces yeasts present during red wine fermentations. **International Journal of Food Microbiology**. Holanda, v. 102, p. 49-56, 2005.

BARBOSA, A. C. *et al.* *Candida materiae* sp. nov., a yeast species isolated from rotting wood in the Atlantic Rain Forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 59, p. 2105-2107, 2009.

BARNETT J.A. **Yeasts, Characteristics and Identification**, 4rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 811p.

BARRETO DE OLIVEIRA, M.T. *et al.* *Cryptococcus neoformans* Shows a Remarkable Genotypic Diversity in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 1356-1359, 2004.

BARROS-LOPES *et al.* AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. **International Journal of Systematic Bacteriology**, E.U.A. v. 49, p. 915-924, 1999.

BAUER, R. *et al.* Ultrastructural markers and systematics in smut fungi and allied taxa. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 75, p.1273-1314, 1997.

BAUER, R. *et al.* The simple-septate basidiomycetes: a synopsis. **Mycological Progress**, Alemanha, v. 5, p. 41-66, 2006.

BERGER, R.G.; DRAWERT, F. Biotechnology in flavor research: achievements, needs and perspectives. *In*: Martens M, Dalen GA, Russwurm H Jr (eds) **Flavor science and technology**. Wiley, New York, p.199–215, 1987.

BIELY, P.; SLAVIKOVA, E. New search for pectolytic yeasts. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 39, p. 485–488, 1994.

BOEKEMA, B.K. *et al.* Hexadecane and Tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 73, p.3838–3844, 2007.

BOUNDY-MILLS, K. Methods for Investigating Yeast Biodiversity. *In*: Rosa, CA, Peter, G eds., **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Springer-Verlag, Berlin, 2006, p. 67-100.

BRAGA, A.A., *et al.* Screening of yeasts from Brazilian Amazon rain forest for extracellular proteinases production. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 21, p. 353-359, 1998.

BRIZZIO, S. *et al.* Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, p. 519-525, 2007.

BUSSAMARA, R. *et al.* Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-scale batch fermentation. **Bioresource Technology**, Inglaterra, v. 101, p. 268-275, 2010.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v.93, p.1020-1025, 2002.

BUZZINI, P.; MARTINI, A..Yeast biodiversity and biotechnology. In: Rosa, CA, Peter, G eds., **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Springer-Verlag, Berlin, 2006, p. 533–559.

BUZZINI, P. *et al.*. The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: the state of the art, potentialities and limitations. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 7, p.749-760, 2007.

CALLAN, B.E.; CARRIS, L.M.. Fungi on living plant substrata, including fruits In: Mueller, G. M.; Bills, G. F.; Foster, M. S. (ed.). **Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods**. Elsevier, Academic Press, 2004, p. 105-126.

CAMATTI-SARTORI *et al.* Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 45, p. 397-402, 2005.

CARREIRO, S.C. *et al.* *Sympodiomyces attinorum* sp. nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 1891-1894, 2004.

CARVALHO, C.M. *et al.* Identification of honey yeast species based on RFLP analysis of the ITS region. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, Santiago de Compostela, v.5, p. 11-17, 2005.

CHANG, C.F. *et al.* *Cryptococcus keelungensis* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast isolated from the sea-surface microlayer of the north-east coast of Taiwan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 58, p. 2973-2976, 2008.

CHEETHAM P.J.S. Combining the technical push and business pull for natural flavors. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Alemanha, v. 55, p.1–49, 1997.

CHEN, W. B. *et al.*. Isolation, purification, and characterization of a killer protein from *Schwanniomyces occidentalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p.5348–5352, 2000.

COCOLIN, L. *et al.*. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 189, p. 81-87, 2000.

COTON *et al.*. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, Holanda, v. 103, p. 130-135, 2006.

DA SILVA, E.G., *et al.* Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 5, p. 859-865, 2005.

DEAN, W. **A ferro e Fogo: a história e a devastação da Mata Atlântica brasileira**. São Paulo: Companhia das Letras, 1996.

DIVOL, B.; LONVAUD-FUNEL. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 99, p. 85-93, 2005.

DO CARMO-SOUZA, L. Distribution of yeasts in nature. In: A.H. Rose; J.S. Harrison (Eds.). **The Yeasts**. London: London Academic Press, 1969, p. 79-105.

ENDRIZZI, A. *et al.* Production of lactones and peroxisomal beta-oxidation in yeasts. **Critical Reviews in Biotechnology**, New York, v.16, p. 301–329, 1996.

FELL, J. W. *et al.* Partial rRNA sequences in marine yeasts: a model for identification of marine eukaryotes. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, Oxford, v.1, p. 175-186, 1992.

FELL, J.W. *et al.* Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 50, p. 1351-1371, 2000.

FELL, J. W. *et al.* Basidiomycetous yeasts. In **The Mycota VII Part B: Systematics and Evolution**, McLaughlin/McLaughlin/Lemke (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, 2001.

FIDALGO-JIMÉNEZ, A. *et al.* *Metschnikowia cubensis* sp. nov., a yeast species isolated from flowers in Cuba. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 58, p. 2955-2961, 2008.

FLORES-BARRIOS *et al.* The uses of AFLP for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity between yeasts isolated from Mexican agave-distilled beverages and from grape musts. **Letters in Applied Microbiology**, Edison, v. 41, p. 147-152, 2005.

FODA, M.S.; EL-DIN, S.M. Distribution of extracellular proteolytic activities among various yeasts. **Zentralbl Bakteriell Naturwiss**, Alemanha, v. 134, p. 89-93, 1979.

FONSECA, A.; INÁCIO, J. Phylloplane Yeasts. In: Rosa, CA, Peter, G eds., **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Springer-Verlag, Berlin, 2006, p. 263 – 301.

FORNEY, L.J. *et al.* Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. **Current Opinion in Microbiology**, Inglaterra, v.7, p. 210-220. 2004.

FORZZA, R.C.. **Filogenia da tribo *Puyeeae* Wittm. e revisão taxonômica do gênero *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Pitcairnioideae – Bromeliaceae)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 208p. 2001

FORZZA, R.C.. Revisão taxonômica de *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Pitcairnioideae- Bromeliaceae). **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 23, p. 1-49, 2005.

FRANCIS, S. et al. The role of cutinase in germling development and infection by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Inglaterra, v. 49, p.201-11, 1996.

FREDLUND, E. *et al.* Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.2, p.395 - 402, 2002.

FUENTEFRÍA, A.M. **Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis***. 2004. 122f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

FUENTEFRÍA, A.M. **Bioprospecção de leveduras *killer* com potencial para aplicação em biotipagem de microorganismos patogênicos humanos**. 2007. 144f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

FUENTEFRÍA, A.M.; VALENTE, P. Screening of enzyme-producing yeast and yeast-like fungi from the phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis* in Brazil. **Revista Tecno-Lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 9, n. 1, p. 9-24, 2005.

FUENTEFRÍA, A. M. *et al.* Inhibition of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* strains by two Brazilian killer yeasts. **Journal of Basic Microbiology**, EUA, v. 46, n. 2, p. 87-93, 2006.

FUENTEFRÍA, A. M. *et al.* Typing and patterns of cellular morphological alterations in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates exposed to a panel of killer yeasts. **Medical Mycology**, Oxford, v. 45, p. 503-512, 2007.

FUENTEFRÍA, A.M. *et al.* *Trichosporon insectorum* sp. nov., a new anamorphic basidiomycetous killer yeast. **Mycological Research**, London, v. 112, p. 93-99, 2008.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. [Informações]. Disponível em: <http://www.sosmatatlantica.org.br>> Acesso em: 12 agosto 2009.

FUNGSIN, B. *et al.* *Bensingtonia thailandica* sp. nov., a novel basidiomycetous yeast species isolated from plant leaves in Thailand. **International Journal of**

Systematic and Evolutionary Microbiology, Berks, v. 51, p. 1209-1213, 2001.

FUNGSIN, B., *et al.* *Kockovaella barringtoniae* sp. nov., a new basidiomycetous yeast species isolated from a plant leaf collected in a tropical rain forest in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 52, p. 281-284, 2002.

GADANHO, M. *et al.* Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium*: *R. azoricum* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 213-221, 2001.

GADANHO, M., *et al.* Assesment of diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.84, p.217-227, 2003.

GANTER, P.F.; STARMER, W.T. Killer factor as a mechanism of interference competition in yeasts associated with cacti. **Ecology**, E.U.A., v. 73, p. 54–67, 1992.

GENÉ, J. *et al.* Molecular characterization, relatedness and antifungal susceptibility of the basidiomycetous *Hormographiella* species and *Coprinus cinereus* from clinical and environmental sources. **Antonie Leeuwenhoek International Journal of Genetics**, Amsterdam, v.70: 49-57, 1996.

GIULIETTI, M. Biodiversidade da Região Sudeste. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2., 1992, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Florestal: Secretaria do Meio Ambiente, 1992. v. 1, p. 125-129.

GIVNISH, T.J. *et al.* Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of bromeliaceae inferred from ndhf sequence data. **Aliso**, E.U.A., v. 23, pp. 3–26. 2007.

GOLUBEV, W.I. Antagonistic interactions among yeasts In: Rosa, CA, Peter, G eds., **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Springer-Verlag, Berlin, 2006, p.197-219.

GOLUBEV, W.I. *et al.* Mycocin production in *Trichosporon pullulans* populations colonizing tree exudates in the spring. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 40, p. 151 - 157, 2002.

GRANCHI, L. *et al.* Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR–RFLP analysis of the rDNA ITS region. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 87, p. 949-956, 1999.

GUÉHO, E. *et al.* Typification of the genus *Trichosporon*. **Antonie Leeuwenhoek International Journal of Genetics**, Amsterdam, v.61, p. 285-288, 1992.

GUÉHO, E., *et al.*. Phylogenetic relationships of *Cryptococcus neoformans* and some related basidiomycetous yeasts determined from partial large subunit rRNA sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**. Amsterdam, v. 63, p.175–189, 1993.

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**, Ottawa, v. 39, p. 973-977, 1993.

HAGLER, A. N.; AHEARN, D.G. Rapid Diazonium Blue B test to detect basidiomycetes yeasts. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v.31, p.204-208, 1981.

HAMAMOTO, M. *et al.* Systematic study of basidiomycetous yeasts - evaluation of the ITS regions of rDNA to delimit species of the genus *Rhodospordium*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 2, p. 409-413, 2002.

HAMAMOTO, M.; NAKASE, T. Phylogenetic analysis of the ballistoconidium-forming yeast genus *Sporobolomyces* based on 18S rDNA sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 50, 1373–1380, 2000.

HAWKSWORTH, D.L. *et al.* **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. 8. ed. London: CAB International, 1995. 616p.

HIBBET, *et al.*. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, London, v. 111, p. 509-547, 2007.

HOLANDA, S. B. **Raízes do Brasil**. 26. ed. São Paulo : Companhia das Letras, 1995.

HORRES, R. *et al.* Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: Evidence from trnL (UAA) intron sequences of chloroplast genome. **Plant Biology**, Alemanha, v. 2, p.306-315, 2000.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cadastro de Áreas Especiais**. Rio de Janeiro, 1992.

INÁCIO, J.; FONSECA, A. Reinstatement of *Rhodotorula colostri* (Castelli) Lodder and *Rhodotorula crocea* Shifrine & Phaff, former synonyms of *Rhodotorula aurantiaca* (Saito) Lodder. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 4, p. 557-561, 2004.

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

INÁCIO, J. *et al.*. Phylloplane yeasts from Portugal: Seven novel anamorphic species in the Tremellales lineage of the Hymenomyces (Basidiomycota) producing orange-coloured colonies. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 5, p.1167-1183, 2005.

INÁCIO, J. *et al.* *Farysizyma* gen.nov., an anamorphicgenus in the Ustilaginales to accommodate three novel epiphytic basidiomycetous yeast species from America, Europe and Asia. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, p. 499-508, 2008.

JAGER *et al.* Microbial ecology of the mango phylloplane. **Microbial Ecology**, New York, v. 42, p. 201-207, 2001.

JOHNSON, E.A.; SCHROEDER, W.A. Microbial carotenoids. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Alemanha, v.53, p.119-178, 1995.

KACHALKIN, A.V. *et al.* Characterization of Yeast Groupings in the Phyllosphere of *Sphagnum Mosses*. **Microbiology**, E.U.A., v. 77, p. 474-48, 2008.

KNUTSEN, A.K. *et al.* Polyphasic re-examination of *Yarrowia lipolytica* strains and the description of three novel *Candida* species: *Candida oslonensis* sp. nov., *Candida alimentaria* sp. nov. and *Candida hollandica* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 57, p. 2426-2435, 2008.

KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**. Durham, v. 66, p.1003-1010, 1994.

KURTZMAN, C.P.; J.W. FELL. **The Yeasts, a taxonomic study**. 4. ed. Amsterdam : Elsevier Science Publishers, 1088 p., 1998.

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

LACHANCE, M.A.. Yeasts Biodiversity: How Many and How Much? In: Rosa, CA, Peter, G eds., **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Springer-Verlag, Berlin, p.1-9, 2006.

LACHANCE, M.A. *et al.* Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. **FEMS Yeast Reserch**, Amsterdam, v. 1, p. 1-8, 2001.

LACHANCE, M.A. *et al.* *Metschnikowia santaceciliae*, *Candida hawaiiiana*, and *Candida kipukae*, three new yeast species associated with insects of tropical morning glory. **FEMS Yeast Reserch**, Amsterdam, v. 3, p. 97-103, 2003.

LANDELL, M. F. *et al.* Perfil enzimático de leveduras e fungos semelhantes a leveduras associados a bromélias da Praia da Pedreira, Parque de Itapuã-RS. **Tecno Lógica**, Santa Cruz do Sul/RS, v. 9, n.2, p.55-67, 2005.

LANDELL, M.F. *et al.* Biodiversity of Yeasts Associated to Bromeliads In Itapuã Park, Viamão/RS. **Biociências**, Porto Alegre, v. 14, n. 2, p. 144-149, 2006.

LASKER, B.A.; RAN, Y. Analysis of Polymorphic Microsatellite Markers for Typing *Penicillium marneffeii* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p.1483-1490, 2004.

LEME, E.M.C. Bromélias. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.3, p. 66-72, 1984.

LITVINTSEVA, A. P. *et al.*. Comparative Analysis of Environmental and Clinical Populations of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, p. 556-564, 2005.

LOCK, L.L. **Seleção de leveduras lipolíticas isoladas de bromélias e produção e caracterização de lipase bruta de *Debaryomyces melissophilus* BI81**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

LUTHER, H.E. **An alphabetical list of bromeliad binomies**. The Bromeliad Society International. 10ed. The Marie Selby Botanical Gardens. Sarasota, Florida USA. 116p, 2006.

MACCHERONI, W.J *et al.* Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.61, p.298-302, 2004.

MACFADDIN, J.P.; LIPPINCOTT, P. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 912p. 2000.

MAHDI, L. E. *et al.* *Sympodiomyopsis lanaiensis* sp. nov., a basidiomycetous yeast (Ustilaginomycotina: Microstromatales) from marine driftwood in Hawai'i. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, p. 1357-1363, 2008.

MARGESIN, R.; FELL, J.W.. *Mrakiella cryoconiti* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, anamorphic, basidiomycetous yeast from alpine and arctic habitats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 58, p. 2977-2982, 2008.

MARQUES, E.K., *et al.* Diagnóstico molecular e Biotecnologia. *In*: Serafini, L.A., Monteiro, N., Azevedo, J.L. eds., **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**, EDUCS, Caxias do Sul, 101-130, 2002.

MARTORELL, P. *et al.*. Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruit nougats to determine food contamination sources. **International Journal of Food Microbiology**. Holanda, v. 101, p. 293-302, 2005.

MASSOL-DEYA, A. *et al.*. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). *In*: Akkermans A, van Elsas J, de Bruijn F (eds) **Molecular microbial ecology manual**. Kluwer, Boston, 1995, p 3.3.2 1–3.3.2 8.

MAUTONE, J.N. **Identificação e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras associados a figueiras do Parque de Itapuã, RS, Brasil.** 2008. 124f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

MEHTA, A. *et al.* Classificação das bactérias fitopatogênicas utilizando técnicas baseadas no DNA. In: Serafini, L.A., Monteiro, N., Azevedo, J.L. eds., **Biociologia: avanços na agricultura e na agroindústria**, EDUCS, Caxias do Sul, p.131-164, 2002

MEYER, S.A. *et al.* *Candida* Berkhout. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (Eds) **The Yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science, 1998. p. 454-573.

MEYER, W., *et al.* Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, Alemanha, v. 20, p. 1790-1799, 1999.

MIDDELHOVEN, W.J. Identity and biodegradative abilities of yeasts isolated from plants growing in an arid climate. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.72, p.81-89, 1997.

MORAIS, P.B. *et al.* Yeast Communities in Tropical Rain Forests in Brazil and other South American Ecosystem. In: Rosa, CA, Peter, G eds., **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Springer-Verlag, Berlin, 2006, p. 461-484.

MOREIRA, B.A, *et al.*, BROMÉLIAS: Importância ecológica e diversidade. taxonomia e morfologia. Instituto de Botânica –IBT, São Paulo, 12p., 2006.

MOTZEL W.; COOK E. S. Antibiotic substances from yeasts. **Nature**, London, 182: 45, 1958.

NAGATSUKA, Y. *et al.* *Candida tumulicola* sp. nov. and *Candida takamatsuzukensis* sp. nov., novel yeast species assignable to the *Candida membranifaciens* clade, isolated from the stone chamber of the Takamatsuzuka tumulus. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 59, p. 186-194, 2009.

NAKASE, T. *et al.*, Yeast Biodiversity in Tropical Forests of Asia. In: Rosa, CA, Peter, G eds., **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Springer-Verlag, Berlin, 2006, p. 441-460.

NAKASE, T; TAKASHIMA, M. A simple procedure for the high frequency isolation of new taxa of ballistosporous yeasts living on the surfaces of plants. **RIKEN Review**, Tokyo, v. 3, p. 33–34, 1993.

NASCIMENTO, E. *et al.*. Detection and Selection of Microsatellites in the Genome of *Paracoccidioides brasiliensis* as Molecular Markers for Clinical and Epidemiological Studies. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 5007-5014, 2004.

NASSAR, A.H. *et al.* Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. **Biology and Fertility of Soils**, Alemanha, v. 42, p. 97-108, 2005.

NEUFELD, P.M. **Manual de micologia médica: técnicas básicas de diagnóstico**. Rio de Janeiro: Programa Nacional de Controle de Qualidade, 1999. 240p.

NGUYEN, N. H. *et al.*. Five novel *Candida* species in insect associated yeast clades isolated from neuroptera and other insects. **Mycologia**, Philadelphia, v. 99, p.842-858. 2007

NISHINO, H. *et al.* Cancer prevention by carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, Durham, v.71, p.2273–2278, 1999.

NUNES, J.V.C. Bromélias. In: SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. (eds). **Sustentável Mata Atlântica**. São Paulo: Senac São Paulo, 2003. p. 117-130.

O'DONNELL, K. *Fusarium* and its near relatives. In: **The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics** (Reynolds, D.R. and J.W. Taylor, eds), C.A.B. International, Surrey, UK, 1993, p. 225–233.

OLSON, J.H. Provitamin A function of carotenoids: the conversion of β -carotene into vitamin A. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.119, p.105–108, 1989.

PALPACELLI, V. *et al.* Activity of different 'killer' yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 84, p. 75–78, 1991.

PHAFF, H.J.; STARMER, W.T. Yeasts associated with plants, insects and soil. In: **The Yeasts**. (Rose, A.H. and Harrison, J.S., Eds.), 2nd edn., Vol. I, pp. 123–180. Academic Press, London, 1987.

PIMENTEL, M. R. C. *et al.* *Candida riodecensis* and *Candida cellae*, two new yeast species from the *Starmerella* clade associated with solitary bees in the Atlantic rain forest of Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 5, p. 875-879, 2005.

PIRTILLÄ, A. M. *et al.* Two endophytic fungi in different tissues of scots pine buds (*Pinus sylvestris* L.). **Microbial Ecology**, New York, v. 45, p. 53-62, 2003.

PLOU, F.J. *et al.* Analysis of tween 80 as an esterase / lipase substrate for lipolytic activity assay. **Biotechnology Techniques**, Kew, v.12, p.183-186, 1998.

PONCET, S. *et al.*, DNA-DNA hybridization in several species of *Hansenula*. **Mycopathologia**, Holanda, v. 86, p. 71-6, 1984.

RAFFAELE, S. *et al.* Very long chain fatty acid and lipid signaling in the response of plants to pathogens. **Plant Signaling & Behavior**, E.U.A, v. 4, p. 94-99, 2009.

RANTSIOU, K., *et al.* Ecology and characterization by molecular methods of *Staphylococcus* species isolated from fresh sausages. **International Journal of Food Microbiology**, Holanda, v. 97, p.277-284, 2005.

REIS JUNIOR, F.B., *et al.*. Análises de restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em estudo de diversidade intra-específica de *Azospirillum amazonense* isolado de diferentes espécies de *Brachiaria*. **Documentos – Embrapa Cerrados**, Planaltina, v. 117. 41p. 2004.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Agricultura e Abastecimento. **Plano de Manejo Parque Estadual de Itapuã**. Porto Alegre : Departamento de Recursos Renováveis, 1997. 158p.

RODRIGUÉZ, M.E., *et al.*. Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 96, p. 84-95, 2004.

ROSA, C.A. *et al.* *Kodamaea nitidulidarum*, *Candida restingae* and *Kodamaea anthophila*, three new related yeast species from ephemeral flowers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v. 49, p. 309-318, 1999.

ROSA, C.A. *et al.* Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 4, p. 271-275, 2003.

ROSA, C.A. *et al.* *Metschnikowia cerradonensis* sp. nov., a yeast species isolated from ephemeral flowers and their nitidulid beetles in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 57, p. 161-165, 2007.

ROSA, C.A. *et al.* Synonymy of the yeast genera *Moniliella* and *Trichosporonoides* and proposal of *Moniliella fonsecae* sp. nov. and five new species combinations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 59, p. 425-429, 2009a.

ROSA, C. A. *et al.* *Wickerhamomyces queroliae* sp. nov. and *Candida jalapaonensis* sp. nov., two yeast species isolated from Cerrado ecosystem in North Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 59, p. 1232-1236, 2009b.

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**, Berks, v. 55, p. 2213-2217, 2005.

RUIVO, C.C.C. *et al.* *Candida heliconiae* sp. nov., *Candida picinguabensis* sp. nov. and *Candida saopaulonensis* sp. nov., three ascomycetous yeasts from *Heliconia velloziana* (Heliconiaceae). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 56, n. 5, p. 1147-1151, 2006.

RUSSO, P. *et al.* Increase in β -galactosidase activity in a non-isothermal bioreactor utilizing immobilized cells of *Kluyveromyces fragilis*: fundamentals and applications. **Research in Microbiology**, Paris, v.148, p.271-281, 1997.

RUSSOMANO, O.M.R.; KRUPPA, P.C. **Mancha Foliar de Grafiola**. Documento Técnico – Instituto Biológico, São Paulo, p.1-8, 2008.

SAMPAIO, J.P. *et al.* Taxonomic studies in the Microbotryomycetidae: *Leucosporidium golubevii* sp. nov., *Leucosporidiella* gen. nov. and the new orders Leucosporidiales and Sporidiobolales. **Mycological Progress**, Alemanha, v.2, p.53-68, 2003.

SANTI, L. **Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais**. 2005. 90f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

SANTOS, F. A. *et al.* Yeast associated with flowers and fruits from a semi-arid region of northeastern Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, p. 33-40, 1996.

SATOH, K.; MAKIMURA, K.. *Sporobolomyces koalae* sp. nov., a basidiomycetous yeast isolated from nasal smears of Queensland koalas kept in a Japanese zoological park. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 58, p. 2983-2986, 2008.

SCHMITT M. J.; BREINIG F. The viral *killer* system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 26, p.257-276, 2002.

SCHMITT M. J.; BREINIG F. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, p.212-221, 2006.

SCHWAN, R.F. *et al.* Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, E.U.A., v. 21, 234–244, 1997.

SCORZETTI, G. *et al.* Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.2, p.495-517, 2002.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. **The Mathematical Theory of Communication**. Urbana , IL : University of Illinois Press, 1963.

SILVA, J.J.I. **Ocorrência e diversidade de leveduras no filoplano de plantas selecionadas do Parque Natural da Serra da Arrábida**. 2003. 324f. Tese (Doutorado - Microbiologia) - Programa de Pós-Graduação em Biologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2003. 324p.

SILVA, N.N.F.; GOMES, J.M.L. Bromeliaceae do Sítio Morro do Céu, Serra (ES). **Natureza on line**, Santa Teresa, v. 2, p.1-10, 2003 [on line] <http://www.naturezaonline.com.br>.

SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. **Sustentável Mata Atlântica**. São Paulo : Senac São Paulo, 2003. 213p.

SMITH, L. B.; DOWNS, R.J.. Bromelioideae (bromeliaceae). Flora neotropica monograph. **Hafner press**, New York, v.14, p. 1493-2141, 1979.

SOBRAL, J.K. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endofíticos-planta**. 2003. 174f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade Federal de São Paulo, Piracicaba, SP, 2003.

SPINNLER, H.E. *et al.* Production of sulfur compounds by several yeasts of technological interest for cheese ripening. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.11, p.245–252, 2001.

St. LEGER, R. J.. *et al.* Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. **Microbiology**, Berks, v.143, p.1983-1992, 1997.

STADEN, R. *et al.*. The Staden package. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 132, p.115–130, 2000.

STEELE, D.B.; STOWERS, M.K. Techniques for selection of industrially important microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.45, p.89-106, 1991.

STRAUSS, M.L.A..*et al.* Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 91, p.182-190, 2001.

SUEZAWA, Y. *et al.*. Genotyping of a Miso and Soy Sauce Fermentation Yeast, *Zygosaccharomyces rouxii*, Based on Sequence Analysis of the Partial 26S Ribosomal RNA Gene and Two Internal Transcribed Spacers. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v.72, p. 2452-2455, 2008.

SUGITA, T. *et al.* The first isolation of Ustilaginomycetous anamorphic yeasts, *Pseudozyma* species, from patient's blood and a description of two new species: *P. parantarctica* and *P. thailandica*. **Microbiology and immunology**, Tokyo, v. 47, p.183–190, 2003.

SWANN, E. C.; TAYLOR, J.W. Phylogenetic perspectives on basidiomycete systematics: evidence from the 18S rRNA gene. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v.73, p.S862-S868, 1995.

TAKASHIMA, M., *et al.*. *Cryptococcus tepidarius* sp. nov., a thermotolerant yeast species isolated from a stream from a hot-spring area in Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v.5, p.181-185, 2009.

TAMURA K, *et al.*. **MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TRINDADE R.C. *et al.*. Yeast associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. **Systematic and Applied Microbiology**, London, v.25, p.294-300, 2002.

TUBAKI, K.; YOKOYAMA, T. Cultural aspects of *Graphiola phoenicis*. **Mycopathologia et Mycologia applicata**, Holanda, v. 43, p. 49-60, 1971.

TUKEY, H.B.Jr. Leaching of substances from plants. In: PREECE, T.F.; DICKINSON, C.H. (eds). **Ecology of Leaf Surface Microorganisms**. London: Academic Press, 1971.

VALENTE, P. **Identificação convencional e molecular de leveduras isoladas de filoplano de bromélias**. 2000. 92f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000. 92p.

VALENTE, P. *et al.* Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, p. 949-958, 1999.

VAUGHAN-MARTINI, A. *et al.*. Use of conventional taxonomy, electrophoretic karyotyping and DNA–DNA hybridization for the classification of fermentative apiculate yeasts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 50, p. 1665-1672, 2000.

WACHE, Y. *et al.* Role of betaoxidation enzymes in gamma-decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p.5700–5704, 2001.

WANG, Q.M.;BAI, F.Y. Four new yeast species of genus *Sporobolomyces* from plant leaves. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 4, p. 579-586, 2004.

WANG, Q.M *et al.* *Dioszegia changbaiensis* sp. nov., a basidiomycetous yeast species isolated from northeast China. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 49, p.295–299, 2003.

WANG, Q.M *et al.* *Bullera cylindrica* sp. nov., *Bullera hubeiensis* sp. nov. and *Bullera nakasei* sp. nov., ballistoconidium-forming yeast species from plant leaves. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 1877-1882, 2004.

WANG, Q.M. *et al.* *Cryptococcus tibetensis* sp. nov., a novel basidiomycetous anamorphic yeast species isolated from plant leaves. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 53, p.281–285, 2007.

WANG, Q.M. *et al.* Diversity of basidiomycetous phylloplane yeasts belonging to the genus *Dioszegia* (Tremellales) and description of *Dioszegia athyri* sp. nov., *Dioszegia butyracea* sp. nov. and *Dioszegia xingshanensis* sp. nov.. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 93, p.391-399, 2008.

XIN, G. *et al.* Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid-producing yeasts occurring in Populus trees. **Mycological Research**, London, *in press*, 2009.

YAMAMOTO, H. *et al.* Nucleotide sequence and characterization of the large mitochondrial rRNA gene of *Penicillium urticae*, and its comparison with those of other filamentous fungi. **Journal of Biochemistry**, Inglaterra, v. 117, p. 888-896, 1995.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (eds) **The Yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science, 1998. p. 77-100.

ZHAO, J.H. *et al.* *Sporobolomyces bannaensis*, a novel ballistoconidium-forming yeast species in the *Sporidiobolus* lineage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 53, p. 2091-2093, 2003.

12. ANEXOS

TABELA 1: Listagem dos meios de culturas utilizados.

| | |
|---|---|
| Ágar Acetato | 0,4% acetato de sódio anidro; 2% ágar |
| Ágar Amido | 0,67% YNB; 0,2% amido; 2% ágar |
| Ágar Caseína | 0,67% YNB; 0,5% glicose; 0,5% caseína; 2% ágar; ajustar pH para 7,0 com KOH |
| Ágar Fubá | 1,7% Farinha de Milho; 2% ágar; |
| Ágar GYMP | 2% glicose; 2% de extrato de malte; 0,5% de extrato de levedura; 0,2% de fosfato de sódio monobásico; 2% ágar |
| Ágar Pectina | 0,1% extrato de levedura; 0,5% pectina cítrica; 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,09% K_2HPO_4 ; 0,09% KH_2PO_4 ; MgSO_4 ; 2% ágar. (pH 5,0) |
| Ágar V8 (suco de tomate) | V8 Vegetable Juice (Campbell Soup Co.) (diluição 1:9); 2% ágar (pH 5,5) |
| Ágar YEPG | 2% glicose; 1% de peptona; 0,5% de extrato de levedura; 2% ágar |
| Ágar YM | 0,3% extrato de levedura; 0,3% extrato de malte; 0,5% peptona; 1% glicose; 2% ágar; |
| Caldo YEPG | 2% glicose; 1% de peptona; 0,5% de extrato de levedura |
| Meio básico para fermentação de açúcares | 0,75% peptona; 0,45% de extrato de levedura; 2% (glicose / lactose / galactose / maltose) |
| Meio de Gorodkova | 0,1% glicose; 1% peptona, 0,5% cloreto de sódio; 2% ágar |
| Meio para a assimilação de fontes de carbono | 0,67% Yeast Nitrogen Base (YNB); 2% ágar; 0,5% fonte de carbono (1% rafinose) |
| Meio para a assimilação de fontes de nitrogênio | 1,17% de Yeast Carbon Base (YCB); 2% ágar; fonte nitrogenada nas diferentes concentrações |
| Meio para Celulase | 1% carboximetilcelulose; 0,05% celobiose; 0,67% YNB; 2% ágar. |
| Teste Urease | 1,17% YCB ; 2% ágar ; 1% uréia; fuccina ácida |

TABELA 2: Listagem dos códigos de acesso das sequências ao GenBank e coleções de cultura das espécies novas.

| Espécie | Código | GenBank | ATCC^a | CBS^b | NRRL^c |
|--|---------------|---------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| <i>Auriculibuller fuscus</i> | BI111 | EU200788 | MYA-4539 | CBS 11148 | |
| <i>Bensingtonia</i> sp. nov. 01 | BI183 | EU678947 | | | |
| <i>Bullera</i> sp. nov. 01 | BI335 | EU678937 | MYA-4534 | CBS 11568 | |
| <i>Candida aechmeae</i> sp. nov. | BI153 | EU678950 | | CBS 10831 | Y-48456 |
| <i>Candida vrieseae</i> sp. nov. | BI146 | EU200785 / FJ755905 | | CBS 10829 | Y-48461 |
| <i>Candida</i> sp. nov. 01 | BI242 | EU678942 | | | |
| <i>Lalaria</i> sp. nov. 01 | EI05 | | MYA-4602 | CBS 11569 | |
| <i>Cryptococcus bromeliarum</i> sp. nov. | BI20 | DQ784566 / EU386359 | | CBS 10424 | Y-48112 |
| <i>Cryptococcus bromeliarum</i> sp. nov. | BI79 | | | CBS 10427 | Y-48113 |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | BI299 | | MYA-4535 | CBS 11145 | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | BI309 | | MYA-4542 | CBS 11150 | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | BI323 | | MYA-4525 | | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 01 | BI169 | FJ828960 | MYA-4536 | CBS 11156 | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI254 | FJ828963 | | | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI246 | FJ828962 | | | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI96 | | MYA-4526 | CBS 11137 | |

TABELA 2: Continuação -Listagem dos códigos de acesso das sequencias ao GenBank e coleções de cultura das espécies novas.

| | | | | | |
|---------------------------------------|-------|----------|----------|-----------|---------|
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI203 | FJ828961 | MYA-4541 | CBS 11149 | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI284 | | MYA-4524 | CBS 11136 | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 02 | BI319 | | MYA-4537 | CBS 11146 | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 03 | BI264 | FJ828964 | | | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 03 | BI118 | FJ828959 | MYA-4530 | CBS 11142 | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 04 | BI195 | EU200789 | | CBS 11141 | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 04 | BI295 | | MYA-4529 | CBS 11155 | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 05 | BI94 | EU200791 | | | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 06 | BI226 | EU678944 | MYA-4528 | CBS 11140 | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 07 | BI141 | | MYA-4600 | CBS 11167 | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 08 | BI223 | EU200790 | MYA-4532 | CBS 11143 | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 09 | BI237 | EU200786 | | | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 10 | BI287 | EU678945 | | | |
| <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 11 | BI293 | EU678946 | | | |
| <i>Dioszegia</i> sp. nov. 01 | BI247 | | MYA-4522 | CBS 11135 | |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI63 | | | CBS 10425 | Y-48114 |

TABELA 2: Continuação -Listagem dos códigos de acesso das sequencias ao GenBank e coleções de cultura das espécies novas.

| | | | | | |
|--|-------|---------------------|----------|-----------|---------|
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI77 | | | CBS 10426 | Y-48115 |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI120 | DQ767831 / DQ767831 | MYA-4547 | CBS 10428 | Y-48116 |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI181 | DQ784568 / DQ855949 | | CBS 10429 | Y-48117 |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI224 | | MYA-4548 | | |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI235 | DQ784567 | | CBS 10430 | Y-48118 |
| <i>Farysizyma itapuensis</i> sp. nov. | BI238 | DQ784569 / DQ855950 | | CBS 10431 | Y-48119 |
| <i>Fibulobasidium</i> sp. nov. 01 | BI14 | EU678936 | MYA-4546 | CBS 11158 | Y-48455 |
| <i>Graphiola</i> sp. nov. 01 | BI122 | | MYA-4540 | CBS 11154 | |
| <i>Rhodotorula chungwhensis</i> sp. nov. | BI218 | EU678949 | MYA-4533 | CBS 11144 | |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 01 | BI02 | EU200783 | MYA-4544 | CBS 11152 | |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 01 | BI327 | | MYA-4543 | CBS 11151 | |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 02 | BI215 | | MYA-4597 | CBS 11564 | |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 03 | BI116 | EU678933 | | | |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 04 | BI157 | EU678941 | | | |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 05 | BI108 | EU678940 | MYA-4531 | CBS 11157 | |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 05 | BI240 | EU678935 | MYA-4601 | CBS 10830 | Y-48460 |

TABELA 2: Continuação -Listagem dos códigos de acesso das sequencias ao GenBank e coleções de cultura das espécies novas.

| | | | | | |
|-----------------------------------|-------|----------|----------|-----------|---------|
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 06 | BI24 | EU678939 | MYA-4523 | CBS 11153 | |
| <i>Rhodotorula</i> sp. nov. 08 | BI216 | EU678934 | | | |
| <i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 01 | BI50 | EU678943 | MYA-4527 | CBS 11139 | |
| <i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 04 | BI100 | EU678951 | | | Y-48459 |
| <i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 04 | BI113 | EU678952 | MYA-4538 | CBS 11147 | Y-48457 |
| <i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 02 | BI217 | EU678948 | | | |
| <i>Sympodiomyces</i> sp. nov. 01 | BI83 | EU678938 | | | |
| <i>Tremella</i> sp. nov. 01 | BI23 | EU200784 | | | |
| <i>Tremella</i> sp. nov. 01 | BI236 | | MYA-4599 | CBS 11566 | |
| <i>Tremella</i> sp. nov. 02 | BI243 | EU200787 | MYA-4545 | CBS 11138 | Y-48458 |
| <i>Tremella</i> sp. nov. 03 | BI269 | | MYA-4598 | CBS 11565 | |

^aATCC - American Type Culture Collection.

^bCBS - Centraalbureau voor Schimmelcultures.

^cNRRL - ARS Culture Collection.

13. VITA

13.1 DADOS PESSOAIS

Nome: Melissa Fontes Landell

Nascimento: 03/05/1980, Porto Alegre/RS - Brasil

Filiação: William Crouzeilles Landell Junior e Angela Maria Ferreira Fontes

E-mail: melissa.landell@gmail.com

13.2 FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2006 - 2009 - Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, Brasil.

2004 - 2006 - Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, Brasil.

1998 - 2003 - Graduação em Biologia.

Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, RS, Brasil.

1995 - 1997 - Ensino Médio (2º grau).

Escola Estadual Florinda Tubino Sampaio, RS, Brasil.

1987 - 1994 - Ensino Fundamental (1º grau).

Escola Estadual de 1º e 2º Graus Profº Otávio de Souza, RS, Brasil.

13.3 Prêmios e títulos

2008 - Prêmio Dr. Ernesto Hofer - Melhor trabalho escrito, XI ENAMA – Fortaleza/CE.

13.4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA E ARTÍSTICA/CULTURAL

13.4.1 Artigos completos publicados em periódicos

1. **LANDELL, Melissa Fontes**, INÁCIO, J, FONSECA, A, VAINSTEIN, M. H, VALENTE, P.

Cryptococcus bromeliarum sp. nov., an orange-coloured basidiomycetous yeast isolated from bromeliads in Brazil.. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (Online). , v.59, p.910 - 913, 2009.

2. **LANDELL, Melissa Fontes**, BILLODRE, R. G., RAMOS, J., LEONCINI, O., VAINSTEIN, M.H, VALENTE, P.

Candida aechmeae sp. nov. and *Candida vrieseae* sp. nov., two new yeast species isolated from the phylloplane of bromeliads in Southern Brazil.. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009.

3. VALENTE, P., LORA, P.S., **LANDELL, Melissa Fontes**, SCHIEFELBEIN, C. S., GIRARDI, F.M., SOUZA, L.R., ZANONATO, A., SCROFERNEKER, M. L.

A game for teaching antimicrobial mechanisms of action. Medical Teacher., 31(9): 383-392, 2009.

4. CRESTANI, J., **LANDELL, Melissa Fontes**, FAGANELLO, J., VAINSTEIN, Marilene H, VISHNIAC, H. S., VALENTE, P.
Cryptococcus terrestris sp. nov., a novel tremellaceous anamorphic yeast phylogenetically related to *Cryptococcus flavescens*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (Online). , v.59, p.631 - 636, 2009.
5. INÁCIO, J, **LANDELL, Melissa Fontes**, VALENTE, P., Wang, Pi-Han., Wang, Yen-Ting., Yang, Shan-Hua., Manson, J.S., Lachance, M.A, Rosa, C.A, Fonseca, A. *Farysizyma* gen. nov., an anamorphic genus in the Ustilaginales to accommodate three novel epiphytic basidiomycetous yeast species from America, Europe and Asia.. FEMS Yeast Research. , v.8, p.499 - 508, 2008.
6. Kappel, V.D., Costa, G.M., Scola, G., Silva, F.A., **Landell, Melissa Fontes**, Valente, P., Souza, D.G., Vanz, D.C., Reginatto, F.H., Moreira, J.C.F.
Phenolic Content and Antioxidant and Antimicrobial Properties of Fruits of L.var. at Different Maturity Stages. Journal of Medicinal Food. , v.11, p.267 - 274, 2008.
7. FUENTEFRIA, A.M., SUH, S, FAGANELLO, J., **LANDELL, Melissa Fontes**, SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H, VALENTE, P.
Trichosporon insectorum sp. nov., a new anamorphic basidiomycetous killer yeast. Mycological Research. , v.112, p.93 - 99, 2008.
8. **LANDELL, Melissa Fontes**, MAUTONE, J.N., VALENTE, P.
Biodiversity of yeasts associated with bromeliads in Itapuã Park, Viamão/RS.. Biociências (Porto Alegre). , v.14, p.144 - 149, 2006.
9. **LANDELL, Melissa Fontes**, HARTFELDER, C., VALENTE, P.
Identification and enzymatic profile of yeasts isolated from artisanal cheese in Southern Brazil.. Acta Scientiae Veterinariae. , v.34, p.49 - 55, 2006.
10. BEHEREGARAY, W. K., PÖPPL, A. G., HARTFELDER, C. C., **LANDELL, Melissa Fontes**, VALENTE, P., OLIVEIRA, I., FERREIRO, L., OLIVEIRA, R.T., MACHADO, M., PIGATTO, J.T., FERREIRA, R.R., MELLO, F. P. S.
Criptococose em um cão com envolvimento de linfonodos, pele, olhos, e glândula mandibular.Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida, v.25, p.252 - 253, 2005.
11. **LANDELL, Melissa Fontes**, MAUTONE, J.N., VALENTE, P.
Perfil enzimático de leveduras e fungos semelhantes a leveduras associados a bromélias da Praia da Pedreira, Parque de Itapuã-RS. Tecno-Lógica, v.9, p.55 - 67, 2005.

13.4.2 Resumos em anais de eventos

STOPIGLIA, Cheila D, **LANDELL, Melissa Fontes**, BILLODRE, R. G., HEIDRICH, DAIANE., SORRENTINO, J., VAINSTEIN, Marilene H, SCROFERNEKER, Maria Lúcia, VALENTE, Patrícia. AVALIAÇÃO DA ORIGEM DE UMA AMOSTRA DE *Sporothrix schenckii* CAUSADORA DE CONTAMINAÇÃO LABORATORIAL. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA, 2008, Gramado/RS. Anais do I Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica. , 2008.

HEIDRICH, D., **LANDELL, Melissa Fontes**, SORRENTINO, J., STOPIGLIA, C. D, DABOIT, T. C., VALENTE, P., SCROFERNEKER, M.L. Avaliação da suscetibilidade de *Fonsecaea pedrosoi* a leveduras "killer". In: XX Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2008, Porto Alegre.

LANDELL, Melissa Fontes, BILLODRE, R. G., RAMOS, J., LEONCINI, O., VAINSTEIN, Marilene H, VALENTE, Patricia. *Candida aechmeae* sp. nov. and *Candida vrieseae* sp. nov. two new yeast species isolated from the Phylloplane of bromeliads in southern Brazil. In: I Encontro Gaúcho de Micologia, 2008, Porto Alegre/RS. Anais I Encontro Gaúcho de Micologia. , 2008.

BILLODRE, R. G., **LANDELL, Melissa Fontes**, VAINSTEIN, Marilene H, VALENTE, Patricia. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE LEVEDURAS DO FILOPLANO DE BROMÉLIAS. In: IV Jornada de Iniciação Científica - Meio Ambiente - FZB, 2008, Porto Alegre. IV Jornada de Iniciação Científica - Meio Ambiente. , 2008.

LANDELL, Melissa Fontes, BILLODRE, R. G., VAINSTEIN, Marilene H, VALENTE, Patricia. Diversidade de leveduras associadas a bromélias. In: I Encontro Gaúcho de Micologia, 2008, Porto Alegre/RS. Anais I Encontro Gaúcho de Micologia. , 2008.

STOPIGLIA, Cheila D, **LANDELL, Melissa Fontes**, BILLODRE, R. G., HEIDRICH, DAIANE., SORRENTINO, J., VAINSTEIN, Marilene H, SCROFERNEKER, Maria Lúcia, VALENTE, Patricia. Avaliação da origem de uma amostra de *Sporothrix schenckii* causadora de contaminação laboratorial. In: I Encontro Gaúcho de Micologia, 2008, Porto Alegre. Anais do I Encontro Gaúcho de Micologia. ,2008.

BILLODRE, R. G., **LANDELL, Melissa Fontes**, VAINSTEIN, Marilene H, VALENTE, Patricia. IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE LEVEDURAS ASSOCIADAS AO FILOPLANO DE BROMELIAS DO PARQUE ESTADUAL DE ITAPUÃ/RS In: SIC 2008 / UFRGS, 2008, Porto Alegre. Anais SIC 2008. , 2008.

VALENTE, Patricia, **LANDELL, Melissa Fontes**, STOPIGLIA, Cheila D, DABOIT, TATIANE CAROLINE., HEIDRICH, DAIANE., SORRENTINO, J., POZZA, CAROLINE LEMES, SCROFERNEKER, Maria Lúcia. Inibição de fungos patogênicos humanos por leveduras killer. In: VI Congresso Latino-americano de Micologia (VI CLAM), 2008, Mar Del Plata. Anais do VI Congresso Latino-americano de Micologia (VI CLAM). , 2008.

LANDELL, Melissa Fontes, BILLODRE, R. G., VAINSTEIN, Marilene H, VALENTE, Patricia. Diversidade de leveduras associadas a bromélias. In: VI Congresso Latino-americano de Micologia (VI CLAM), 2008, Mar Del Plata. Anais do VI Congresso Latino-americano de Micologia (VI CLAM). , 2008.

POZZA, C.L., **LANDELL, Melissa Fontes**, STOPIGLIA, Cheila D, DABOIT, TATIANE CAROLINE., HEIDRICH, DAIANE., VALENTE, Patricia, SCROFERNEKER, Maria Lúcia. Ação de leveduras “killer” contra fungos dermatófitos dos gêneros *Microsporium* e *Trichophyton*. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, 2007, Recife/PE. 5º Congresso Brasileiro de Micologia. , 2007.

LANDELL, Melissa Fontes, HEIDRICH, DAIANE., STOPIGLIA, Cheila D, DABOIT, TATIANE CAROLINE., POZZA, CAROLINE LEMES, SCROFERNEKER, Maria Lúcia, VALENTE, Patricia. ATIVIDADE KILLER DE LEVEDURAS CONTRA SPOROTHRIX SCHENCKII. In: 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA., 2007, Porto Alegre. Anais da 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA. Porto Alegre: HCPA, 2007. v.27. p.253 - 253

PHILOMENA, L.G, **LANDELL, Melissa Fontes**, BLACKWELL, M, SUH, S, VALENTE, Patricia. Avaliação da influência da produção de “Killer” em comunidades de leveduras simbiotes de besouros. In: XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E XVI FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 2007, Porto Alegre., 2007.

LANDELL, Melissa Fontes, BRITO, R.B.M, RAMOS, J., FAGANELLO, J., LEONCINI, O., VAINSTEIN, Marilene H, VALENTE, Patricia. Biodiversidade de leveduras isoladas de Bromélias. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, 2007, Recife/PE. 5º Congresso Brasileiro de Micologia. , 2007.

MAUTONE, Juliana Nunes, **LANDELL, Melissa Fontes**, BRITO, R.B.M, VALENTE, Patricia. Comparação entre grupos funcionais de leveduras isoladas de filoplano de figueiras e bromélias no Parque de Itapuã, RS, Brasil. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, 2007, Recife/PE..5º Congresso Brasileiro de Micologia. , 2007.

LANDELL, Melissa Fontes, POZZA, CAROLINE LEMES, DABOIT, TATIANE CAROLINE., HEIDRICH, DAIANE., SCROFERNEKER, Maria Lúcia, VALENTE, Patricia. ESPECTRO DE AÇÃO DE LEVEDURAS KILLER CONTRA FUNGOS DERMATÓFITOS. In: 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA., 2007, Porto Alegre. Anais da 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA.. Porto Alegre: HCPA, 2007. v.27. p.253 - 253

HEIDRICH, DAIANE., **LANDELL, Melissa Fontes**, STOPIGLIA, Cheila D, DABOIT, TATIANE CAROLINE., POZZA, CAROLINE LEMES, VALENTE, Patrícia, SCROFERNEKER, Maria Lúcia. Espectro de ação do fator "killer" de leveduras contra *Sporothrix schenckii*. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, 2007, Recife/PE..5º Congresso Brasileiro de Micologia. , 2007.

PHILOMENA, L.G, **LANDELL, Melissa Fontes**, BLACKWELL, M, VALENTE, Patrícia. Influência da presença de Leveduras "Killer" na composição de espécies de leveduras associadas a besouros. In: III Jornada de Iniciação Científica: Meio Ambiente - Promoção Fepam / FZB., 2007, Porto Alegre. III Jornada de Iniciação Científica: Meio Ambiente - Promoção Fepam / FZB.. , 2007.

HEIDRICH, DAIANE., **LANDELL, Melissa Fontes**, DABOIT, TATIANE CAROLINE., STOPIGLIA, Cheila D, POZZA, CAROLINE LEMES, VALENTE, Patricia, SCROFERNEKER, Maria Lúcia. Inibição de *Sporothrix schenckii* por leveduras "killer". In: XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E XVI FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 2007, Porto Alegre. XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E XVI FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS. , 2007.

BERNARDI, T., **LANDELL, Melissa Fontes**, Poletto, C, Poli, J, VALENTE, Patricia. Inibição de *Dekkera/Brettanomyces* por leveduras "killer" isoladas de produtos lácteos. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, 2007, Recife/PE. 5º Congresso Brasileiro de Micologia. , 2007.

SORRENTINO, J., **LANDELL, Melissa Fontes**, STOPIGLIA, Cheila D, DABOIT, TATIANE CAROLINE., HEIDRICH, DAIANE., PORTO, A., VALENTE, Patrícia, SCROFERNEKER, Maria Lúcia. Inibição de *Fonsecaea pedrosoi* por leveduras "killer". In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, 2007, Recife/PE. 5º Congresso Brasileiro de Micologia. , 2007.

POZZA, CAROLINE LEMES, **LANDELL, Melissa Fontes**, STOPIGLIA, Cheila D, DABOIT, TATIANE CAROLINE., HEIDRICH, DAIANE., VALENTE, Patrícia, SCROFERNEKER, Maria Lúcia. Inibição do crescimento de dermatófitos por leveduras "Killer". In: XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E XVI FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 2007, Porto Alegre. XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E XVI FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS. , 2007.

SCHIEFELBEIN, C. S., **LANDELL, Melissa Fontes**, LORA, P.S., SOUZA, L. R. DE, ZANONATO, A., GIRARDI, F.M., SCROFERNEKER, M.L., VALENTE, P.. Jogo De Antibióticos: Um método alternativo de ensinar mecanismos de ação de antibióticos para cursos da área da saúde. In: XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E XVI FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 2007, Porto Alegre. 2007.

BRITO, R.B.M, **LANDELL, Melissa Fontes**, VAINSTEIN, Marilene H, COSTA, M., VALENTE, Patricia. MS-PCR Fingerprinting de Leveduras Isoladas de Bromélias do Parque de Itapuã – RS. In: III Jornada De Iniciação Científica: Meio Ambiente - Promoção Fepam / Fzb, 2007, Porto Alegre. III Jornada De Iniciação Científica: Meio Ambiente - Promoção Fepam / Fzb. , 2007.

RABELLO, S.R, REGINATTO, T, **LANDELL, Melissa Fontes**, VALENTE, Patrícia, COSTA, M. Ocorrência de Bactérias em Bromélias do Parque Estadual de Itapuã, Viamão, RS. In: III Jornada De Iniciação Científica:Meio Ambiente - Promoção Fepam / FZB, 2007, Porto Alegre. III Jornada De Iniciação Científica:Meio Ambiente - Promoção Fepam / FZB. , 2007.

MAUTONE, Juliana Nunes, CORRÊA, Gabriela Godoy, LONDERO, L., **LANDELL, Melissa Fontes**, VALENTE, Patrícia. Seleção de leveduras isoladas de leite bovino e queijo artesanal para aplicação. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, 2007, Recife/PE. 5º Congresso Brasileiro de Micologia. , 2007.

SCHIEFELBEIN, CAROLINA SILVA, LORA, PRISCILA S., **LANDELL, Melissa Fontes**, SOUZA, LEONARDO R. DE, ZANONATO, ANGELA., GIRARDI, FÁBIO M., SCROFERNEKER, Maria Lúcia, VALENTE, Patricia. JOGO DE ANTIBIÓTICOS: UMA FORMA ALTERNATIVA DE ENSINO DE MECANISMOS DE AÇÃO DE ANTIBIÓTICOS PARA ACADÊMICOS DE MEDICINA. In: 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA., 2007, Porto Alegre. Anais da 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA.. Porto Alegre: HCPA, 2007. v.27. p.106 - 106

CORRÊA, Gabriela Godoy, MAUTONE, Juliana Nunes, **LANDELL, Melissa Fontes**, LONDERO, L., VALENTE, Patrícia. Seleção de leveduras oriundas de produtos lácteos para uso em processos de maturação de queijo. In: XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E XVI FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 2007, Porto Alegre.

MAUTONE, Juliana Nunes, **LANDELL, Melissa Fontes**, VALENTE, Patricia. Identificação de leveduras e fungos leveduriformes associados a figueiras do Parque de Itapuã/RS, Brasil. In: X ENAMA, 2006, Goiânia/GO.X ENAMA. , 2006.

CORRÊA, Gabriela Godoy, **LANDELL, Melissa Fontes**, FRANCO, Marcia Toniolo, VALENTE, Patricia. Potencial para uso em maturação de queijos de leveduras isoladas de queijos artesanais no Rio Grande do Sul. In: XVIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E XX FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 2006, Porto Alegre.

LANDELL, Melissa Fontes, Rosa, C.A, Inácio, J, Lachance, M.A, Fonseca, A, VALENTE, Patricia. *Rhodotorula itapuensis* sp. nov. e *Cryptococcus bromelianus* sp. nov.: Duas novas espécies de leveduras isoladas do filoplano de bromélias no Rio Grande do Sul. In: X ENAMA, 2006, Goiânia/GO. X ENAMA. , 2006.

FUENTEFRÍA, Alexandre Meneghello, SUH, S, **LANDELL, Melissa Fontes**, FAGANELLO, J, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene H, BLACKWELL, M, VALENTE, Patrícia. *Trichosporon insectorum* sp. nov., Uma espécie nova de levedura basidiomicética com fenótipo Killer. In: X ENAMA, 2006, Goiânia/GO.X ENAMA. , 2006.

LANDELL, Melissa Fontes, FUENTEFRÍA, Alexandre Meneghello, VAINSTEIN, Marilene H, Costa, M., VALENTE, Patricia. Uso da Técnica de MS- PCR na diferenciação de espécies de leveduras associadas a bromélias do Parque de Itapuã-Viamão/RS. In: X ENAMA, 2006, Goiânia/GO. X ENAMA. , 2006.

FUENTEFRÍA, A. M., SUH, S, **LANDELL, Melissa Fontes**, FAGANELLO, J, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene H, BLACKWELL, M, VALENTE, Patricia. *Trichosporon insectorum* sp. nov., a new anamorphic basidiomycetous killer yeast. In: VIII Reunião Annual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS., 2006, Porto Alegre.

HARTFELDER, Claudia Cecilia, **LANDELL, Melissa Fontes**, VALENTE, Patricia. Caracterização de leveduras isoladas do queijo tipo frescal no Rio Grande do Sul In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos/SP., 2005.

LANDELL, Melissa Fontes, MAUTONE, Juliana, FRANCO, Márcia, RIBAS, Rodolfo, SEBOLT, Marcelo, VALENTE, Patricia. Diversidade de leveduras associadas a bromélias do Parque de Itapuã, Viamão/RS. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos/SP. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia. , 2005.

SEBOLT, Marcelo B, HARTFELDER, Claudia Cecilia, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene H, **LANDELL, Melissa Fontes**, VALENTE, Patricia. Freqüência e caracterização genética do fenômeno killer em leveduras associadas a produtos lácteos In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos/SP. 2005.

RIBAS, Rodolfo Kruger da Camara, **LANDELL, Melissa Fontes**, MAUTONE, Juliana Nunes, VALENTE, Patricia. Identificação e análise do potencial biotecnológico de leveduras balistosporogênicas associadas à vegetação de Mata Atlântica no Rio Grande do Sul. In: XVII Salão de Iniciação Científica e XIV Feira de Iniciação Científica da UFRGS., 2005, Porto Alegre/RS. , 2005.

FRANCO, M. T., STOPIGLIA, C. D, **LANDELL, Melissa Fontes**, SOUZA, T.F, DORNELES, A. S., SCROFERNEKER, Maria Lúcia, VALENTE, Patrícia. Inibição de dermatófitos por leveduras killer In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos/SP. 2005.

HARTFELDER, Claudia Cecilia, **LANDELL, Melissa Fontes**, VALENTE, Patricia. Isolamento e caracterização de leveduras provenientes de queijo artesanal no Rio Grande do Sul. In: XVII Salão de Iniciação Científica e XIV Feira de Iniciação Científica da UFRGS., 2005, Porto Alegre/RS, 2005.

FRANCO, Márcia Toniolo, **LANDELL, Melissa Fontes**, FUENTEFRIA, Alexandre Meneghello, VALENTE, Patricia. Inibição de leveduras patogênicas humanas por leveduras killer isoladas de diferentes substratos. In: XVII Salão de Iniciação Científica e XIV Feira de Iniciação Científica da UFRGS., 2005, Porto Alegre/RS. 2005.

MAUTONE, Juliana, RIBAS, Rodolfo, **LANDELL, Melissa Fontes**, VALENTE, Patricia. Perfil fisiológico e enzimático de leveduras associadas à vegetação de Mata Atlântica no Rio Grande do Sul In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos/SP.2005.

LANDELL, Melissa Fontes, MAUTONE, J., RIBAS, R., FRANCO, M., SEBOLT, M., VALENTE, P.. Potencial Biotecnológico de leveduras isoladas da superfície foliar de bromélias do Parque de Itapuã, Viamão/RS. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos/SP. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia. , 2005.

LOCK, Luiza Lux, **LANDELL, Melissa Fontes**, CORBELLINI, Valeriano Antônio, VALENTE, Patricia . Seleção de leveduras produtoras de lipase isoladas do filoplano de bromélias do Parque de Itapuã, RS. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos/SP.2005.

LANDELL, Melissa Fontes, MAUTONE, J. VALENTE, P.. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas de filoplano de bromélias na Praia da Pedreira, Parque de Itapuã-RS. In: IV Congresso Brasileiro de Micologia, 2004, Ouro Preto. Anais do IV Congresso Brasileiro de Micologia, 2004.

SCROFERNEKER, Maria Lúcia, VALENTE, Patrícia, **LANDELL, Melissa Fontes**, NOBLEGA, H B, BERGAMASCHI, C, CORBELLINI, Valeriano A. Detecção de atividade azorredutase in situ com 2-(2'- hidroxí - 5'- fenilazofenil) benzoxazol em leveduras. In: IV Congresso Brasileiro de Micologia, 2004, Ouro Preto. Anais do IV Congresso

SCROFERNEKER, Maria Lúcia, VALENTE, Patrícia, **LANDELL, Melissa Fontes**, HOFFMAN, S B, NOBLEGA, H G, CORBELLINI, Valeriano A. Detecção de atividade nitrorredutase in situ com 2-(2'-hidroxí-5'-nitrosufenil) benzoxazol em leveduras. In: IV Congresso Brasileiro de Micologia, 2004, Ouro Preto. Anais do IV Congresso Brasileiro de Micologia. , 2004.

SCROFERNEKER, Maria Lúcia, VALENTE, Patricia, **LANDELL, Melissa Fontes**, NOBLEGA, H G, CORBELLINI, Valeriano A. Detecção de atividade nitrorredutase in situ com 6-nitrocumarina em leveduras. In: IV Congresso Brasileiro de Micologia, 2004, Ouro Preto. Anais do IV Congresso Brasileiro de Micologia. , 2004.

MAUTONE, Juliana Nunes, **LANDELL, Melissa Fontes**, VALENTE, Patrícia. Isolamento de leveduras de filoplano de bromélias do Parque de Itapuã-RS com atividade antagonista contra o fungo fitopatogênico *Bipolaris sorokiniana*. In: 5ª Mostra de Trabalhos de Iniciação Técnico-Científica da Escola Técnica da UFRGS., 2004, Porto Alegre. 2004.

BERGAMASCHI, C, NOBLEGA, H G, **LANDELL, Melissa Fontes**, SCROFERNEKER, Maria Lúcia, VALENTE, Patricia, CORBELLINI, Valeriano A. Síntese e avaliação de 2-(2'-hidroxi-5'-fenilazofenil)benzoxazol como substrato fluorogênico para detecção de azorredutases em leveduras. In: XII Encontro de Química da Região Sul, 2004, Guarapuava. Anais do XII Encontro de Química da Região Sul. , 2004.

HOFFMAN, S B, NOBLEGA, H G, **LANDELL, Melissa Fontes**, SCROFERNEKER, Maria Lúcia, VALENTE, Patricia, CORBELLINI, Valeriano A. Síntese e avaliação de 2-(2'-hidroxi-5'-nitrosifenil)-benzoxazol como substrato fluorogênico para detecção de nitrorredutases em leveduras. In: XII Encontro de Química da Região Sul, 2004, Guarapuava. Anais do XII Encontro de Química da Região Sul. , 2004.

13.4.3 Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. **LANDELL, Melissa Fontes**, BILLODRE, R. G., RAMOS, J., LEONCINI, O., VAINSTEIN, Marilene H, VALENTE, Patrícia

Candida aechmeae sp. nov. AND *Candida vrieseae* sp. nov. TWO NEW YEAST SPECIES ISOLATED FROM THE PHYLLOPLANE OF BROMELIADS IN SOUTHERN BRAZIL. In: XI ENAMA, 2008, Fortaleza/CE. **Anais XI ENAMA, 2008.**

2. **LANDELL, Melissa Fontes**, BILLODRE, R. G., VAINSTEIN, Marilene H, VALENTE, Patrícia IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS ASSOCIADAS AO FILOPLANO DE BROMÉLIAS NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL. In: XI ENAMA, 2008, Fortaleza/CE. **Anais IX ENAMA. , 2008.**

13.4.4 Apresentação de Trabalho

1. LANDELL, Melissa Fontes, BILLODRE, R. G., VAINSTEIN, Marilene H, VALENTE, Patricia **Identificação molecular de leveduras associadas ao filoplano de bromélias no Rio Grande do Sul, Brasil.**, 2008. (Congresso, Apresentação de Oral de Trabalho, XI ENAMA)

2. PHILOMENA, L.G, LANDELL, Melissa Fontes, BLACKWELL, M, VALENTE, Patricia **Influência da presença de leveduras "killer" na composição de espécies de leveduras associadas a besouros.**, 2007. (Outra,Apresentação de Trabalho)

3. BRITO, R.B.M, LANDELL, Melissa Fontes, VAINSTEIN, M. H, COSTA, M., VALENTE, P. **MS-PCR Fingerprinting de leveduras isoladas de bromélias do Parque de Itapuã - RS.**, 2007. (Outra,Apresentação de Trabalho)

4. RABELLO, S. R., REGINATTO, T. S. C., LANDELL, Melissa Fontes, VALENTE, Patrícia, COSTA, M. **Ocorrência de bactérias em bromélias do PARque Estadual de Itapuã, Viamão, RS.**, 2007. (Outra,Apresentação de Trabalho)

13.5 Orientações e Supervisões

13.5.1 Orientações e Supervisões concluídas

13.5.1.1 Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Luise Guedes Philomena. **Avaliação da influência da produção de toxinas killer na composição de espécies em comunidades de leveduras simbiotes de besouros.** 2007. Curso (Biologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Co-orientador).

13.6 Bancas

13.6.1 Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. LANDELL, Melissa Fontes, BECKER, Alexandre., KOBER, Márcia V. Participação em banca de Rosângela Sampaio. **Coagulação Intravascular Disseminada**, 2007. (Biologia) Universidade Luterana do Brasil/ULBRA.

2. LANDELL, Melissa Fontes, GALL, Magda C., KOBER, Márcia V. Participação em banca de Caroline W.. **Lesões gastrointestinais causadas por *Helicobacter pylori***, 2007. (Biologia) Universidade Luterana do Brasil/ULBRA.

3. LANDELL, Melissa Fontes, SCROFERNEKER, Maria Lúcia, VALENTE, P. Participação em banca de Gabriela Godoy Corrêa. **Seleção de leveduras para uso em processos de maturação de queijo.** 2006. (Biologia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS.