

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

Ana Raquel de Oliveira Santos

**DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ASSOCIADAS AO SOLO DE BIOMAS DE MATA  
ATLÂNTICA E AMAZÔNICO**

Belo Horizonte

2022

Ana Raquel de Oliveira Santos

**DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ASSOCIADAS AO SOLO DE BIOMAS DE MATA  
ATLÂNTICA E AMAZÔNICO**

**Versão final**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

Belo Horizonte

2022

043

Santos, Ana Raquel de Oliveira.

Diversidade de leveduras associadas ao solo de biomas de Mata Atlântica e amazônico [manuscrito] / Ana Raquel de Oliveira Santos. – 2022.

158 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Leveduras. 3. Diversidade. 4. Solo. 5. Ecossistema Amazônico. I. Rosa, Carlos Augusto. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

### ATA DE DEFESA DE TESE

#### ATA DA DEFESA DE TESE DE ANA RAQUEL DE OLIVEIRA SANTOS

Nº REGISTRO: 2018754186

Às 10:00 horas do dia **04 de agosto de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Marc-André Lachance (Western University, Canadá), José Paulo Sampaio (Universidade Nova de Lisboa, Portugal), Fátima de Cássia Oliveira Gomes (Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET - MG), Paula Benevides de Moraes (Universidade Federal do Tocantins) e o Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa (Orientador) para julgar o trabalho final **“Diversidade de leveduras associadas ao solo de biomas de Mata Atlântica e Amazônico”** da aluna **Ana Raquel de Oliveira Santos**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Membros da Banca:

Dr. Marc-André Lachance

Dr. José Paulo Sampaio

Profa. Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes

Profa. Dra. Paula Benevides de Moraes

De acordo:

Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

(Orientador)

Profa. Daniele da Glória de Souza  
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação  
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 10/08/2022, às 11:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marc-Andre Lachance, Usuário Externo**, em 10/08/2022, às 13:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fátima de Cassia Oliveira Gomes, Usuário Externo**, em 11/08/2022, às 08:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Benevides de Moraes, Usuário Externo**, em 16/08/2022, às 12:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Augusto Rosa, Servidor(a)**, em 19/08/2022, às 16:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Paulo Nunes de Sousa Sampaio, Usuário Externo**, em 30/08/2022, às 11:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1570999** e o código CRC **E613797F**.

## AGRADECIMENTOS

À minha família. Aos meus pais, obrigada pelo amor, paciência, apoio e incentivo. Vocês são responsáveis pelas minhas conquistas e pela pessoa que sou. À minha irmã Ana Luiza pelo apoio, parceria e companheirismo.

Ao Carlos Rosa, pela confiança e pela oportunidade de trabalho e aprendizado. Obrigada pela liberdade e pelos ensinamentos!

A todos que aceitaram o convite para compor as bancas examinadoras do projeto, da qualificação e da defesa.

Às agências de fomento (CNPq, CAPES e FAPEMIG), que disponibilizaram as verbas para a realização das pesquisas.

A todos que participaram das coletas: Cidiane, Martin e Raquel que fizeram as duas primeiras coletas do Caraça. À Juliana, Rosângela, Katharina e Fernanda que me acompanharam nas outras coletas do Caraça. À Katharina e Gisele, companheiras na coleta de Itacoatiara.

Aos motoristas do ICB que nos levaram em segurança nas coletas do Caraça.

Aos ICs (Fernanda, Arthur e Juliana) que me ajudaram no processamento das amostras.

Ao Maxwell Abegg que nos acolheu em seu laboratório e nos ajudou nas coletas de Itacoatiara. À Helen, Isabel e Marc, que nos auxiliaram com os deslocamentos durante nossa estadia em Itacoatiara.

Ao pessoal do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos e ao pessoal do Laboratório Micropolar pela amizade, companheirismo e ao ótimo ambiente de trabalho. Em especial às Curicas; foram vocês que me acolheram quando cheguei ao laboratório e me ensinaram a trabalhar com leveduras.

Ao pessoal que trabalhou diretamente comigo ao longo desses anos (Marina, Cidi, Kátia, Lucas, Arthur, Fernanda, Hemanuele, Natália e Juliana) Aprendi muito com vocês.

Ao pessoal da secretaria da pós-graduação, em especial à secretária Débora. Obrigada pela paciência e cordialidade.

À Thais, companheira de trabalho e sempre pronta a ajudar.

A todos que de alguma forma torceram por mim, muito obrigada!

## Resumo

Leveduras são um componente importante da comunidade microbiana encontrada em solos. Nestes habitats desempenham importantes funções ecológicas tais como a ciclagem de nutrientes, mineralização da matéria orgânica e solubilização de minerais, como o fosfato. Estes fungos atuam na manutenção da estrutura dos solos por meio da formação de agregados de partículas através da matriz extracelular produzida por alguns gêneros. Também podem servir como fonte de nutrientes para predadores e influenciar o crescimento vegetal. A maior parte dos estudos sobre a diversidade de leveduras presentes em solos se concentra em regiões de clima temperado. No Brasil poucos estudos foram realizados para inventariar a diversidade e determinar o papel ecológico desses microrganismos no solo. Os objetivos desse trabalho foram determinar a diversidade de leveduras presente em amostras de solo coletadas na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Santuário do Caraça (Minas Gerais) e em áreas de floresta amazônica do município de Itacoatiara (Amazonas), utilizando-se diferentes temperaturas e metodologias de isolamento. Na RPPN Santuário do Caraça, 370 isolados de leveduras, compreendendo 111 espécies, foram obtidos a partir de 90 amostras de solo coletadas a cada dois meses ao longo de um período aproximado de um ano, em três sítios de coleta distintos (mata fechada, campo e solo alagado). O isolamento das leveduras foi feito a partir de uma metodologia de enriquecimento em meio líquido (Yeast Nitrogen base – YNB acrescido de 8 % de glicose), com incubação a 10, 25 e 35 °C. Já em Itacoatiara foram usadas duas metodologias de isolamento diferentes (direto e enriquecimento), além de um meio seletivo para espécies de *Lipomyces* (Yeast Carbon Base-YCB acrescido de 0,1% de cicloheximida), que são leveduras usualmente descritas como associadas ao solo. As temperaturas de 10°C, 25°C e 35°C foram utilizadas para a incubação na metodologia de enriquecimento. Por meio do método de enriquecimento, 401 isolados e 81 espécies foram obtidas a partir de 80 amostras de solo coletadas em quatro pontos de coletas diferentes. Por meio do isolamento direto (plaqueamento de diluições de suspensão de solo em meio YM – glicose 1%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,3% e extrato de malte 0,3%) um total de 150 isolados e 40 espécies distintas foi obtido. Com o uso do meio seletivo para espécies do gênero *Lipomyces* (YCB acrescido de 0,1% de cicloheximida), foram obtidos 47 isolados desse gênero. Em ambos os locais de coleta, pela metodologia de enriquecimento, as comunidades recuperadas apresentaram valores altos de riqueza e diversidade. Ascomycota foi o filo predominante nas duas localidades. Os gêneros mais frequentemente isolados foram *Apiotrichum*, *Papiliotrema*, *Schwanniomyces*, *Nakaseomyces*, *Saitozyma* e espécies basais de Saccharomycetaceae. Houve pouco compartilhamento de espécies entre os locais de coleta e a dissimilaridade entre as

comunidades foi devida à substituição de espécies ao longo dos sítios de coleta (*turnover*). Trinta e cinco possíveis espécies novas foram obtidas a partir das amostras coletadas na RPPN Santuário do Caraça, incluindo a espécie *Phaffia brasiliiana*, descrita a partir de isolados obtidos nesse trabalho. Das amostras coletadas em Itacoatiara 30 possíveis novas espécies de leveduras foram obtidas, além de todas as espécies de *Lipomyces* isoladas. Os resultados desse trabalho mostram que os solos da RPPN Santuário do Caraça e dos sítios de floresta amazônica estudados abrigam comunidades de leveduras com alta diversidade e riqueza de espécies, além de ser fonte de novas espécies ainda não descritas pela ciência.

**Palavras- chave:** Diversidade, leveduras, solo, Amazônia, Itacoatiara, RPPN Santuário do Caraça.



### *Abstract*

Yeasts are an important component of soil microbial community. They play important ecological functions, such as carbon, nitrogen and other nutrients cycling, mineralization of organic matter and solubilization of nutrients as phosphate. They act in the soil structure maintenance through aggregates formation. Yeasts also serve as nutrient source for predators and influence plant growth. Most studies on soil yeast diversity focus on temperate climate regions. In Brazil, few studies have been done to inventory yeast diversity and to determine the ecological role of these microorganisms in soil. The aim of this study was to determine the soil yeast diversity in samples collected at RPPN Santuário do Caraça and Itacoatira city - Amazonas, by using different incubation temperatures and isolation methodologies. In RPPN Santuário do Caraça, 370 yeast isolates, comprising 111 species, were obtained from 90 soil samples collected every two months over an approximate period of one year, in three distinct collection sites (forest soil, field and flooded soil). Yeast isolation was performed using a liquid medium enrichment methodology (Yeast Nitrogen Base – YNB plus 8% glucose), incubated at 10, 25 and 35 °C. In Itacoatiara, two different isolation methodologies were used (direct isolation and enrichment) and also a selective medium for *Lipomyces* species (Yeast Carbon Base-YCB plus 0.1% of cycloheximide). Temperatures of 10°C, 25°C and 35°C were used for incubation in the enrichment methodology. Through the enrichment method, 401 isolates were obtained from 80 soil samples collected at four different collection points. Through direct isolation (plating soil suspension dilutions in YM medium - glucose 1%, peptone 0.5%, yeast extract 0.3% and malt extract 0.3%) a total of 150 isolates and 40 different yeast species were obtained. Using a selective medium for *Lipomyces* species (YCB plus Cycloheximide), 47 were obtained. In both collection sites, for the enrichment methodology, both communities showed high values of species richness and diversity. Ascomycota was the predominant phylum in both locations and the most frequently isolated genera were *Apiotrichum*, *Papiliotrema*, *Schwanniomyces*, *Nakaseomyces*, *Saitozyma* and basal species of Saccharomycetaceae. Most of the isolated species were exclusive to the collection sites, the isolation methodology or the isolation temperature. Few species were shared between the collection sites and dissimilarity between the communities was due to species substitution along sites (turnover). Thirty-five possible new species were obtained from samples collected in the RPPN Santuário do Caraça, including *Phaffia brasiliensis*, described from isolates obtained in this work. From Itacoatiara samples, 30 possible new yeast species were obtained, in addition to all *Lipomyces* species. The results of this work show that soils from RPPN Santuário do Caraça and Itacoatira - AM are

high diversity and species richness yeast communities and may be a source of potential new yeast species.

**Keywords:** Diversity, yeasts, soil, Amazon, Itacoatiara, RPPN Santuário do Caraça.

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Leveduras isoladas de amostras de solo coletadas na RPPN Santuário do Caraça por metodologia de enriquecimento em meio líquido Yeast Nitrogen Base com 8% de glicose. ....   | 57 |
| Tabela 2 - Espécies de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas na RPPN Santuário do Caraça por metodologia de isolamento direto em meio YM.....  | 60 |
| Tabela 3 - Valores de riqueza de espécie, diversidade de Shannon e diversidade de Simpson observados e estimados para os diferentes sítios de coleta da RPPN Santuário do Caraça (s.e. = erro padrão; ICMi= intervalo de confiança mínimo; ICMA= intervalo de confiança máximo).....  | 65 |
| Tabela 4 – Valores de cobertura amostral para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas nos sítios “alagado”, “campo” e “mata” na RPPN Santuário do Caraça. ....   | 66 |
| Tabela 5 - Valores de LCBBD (Contribuição do Local para a Diversidade Beta) para os sítios de coleta da RPPN Santuário do Caraça.....   | 70 |
| Tabela 6 - Valores de LCBBD (Contribuição do Local para a Diversidade Beta) para as diferentes coletas realizadas na RPPN Santuário do Caraça. ....   | 70 |
| Tabela 7 - Valores de LCBBD (Contribuição do Local para a Diversidade Beta) para as diferentes temperaturas utilizadas para o isolamento de leveduras do solo da RPPN Santuário do Caraça. Valores marcados com asterisco (*) representam resultados estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).....  | 71 |
| Tabela 8 - Espécies novas isoladas de amostras de solo coletadas na RPPN Santuário do Caraça: espécies descritas mais próximas e valores de identidade na comparação das sequencias dos domínios D1/D2 do gene do RNA ribossomal. ....  | 73 |
| Tabela 9 - Espécies de leveduras isoladas do solo de diferentes sítios de coleta de Itacoatiara – AM, isoladas por metodologia de enriquecimento em meio líquido (YNB com 8% de glicose). ....  | 77 |
| Tabela 10 - Valores de riqueza de espécie, diversidade de Shannon e diversidade de Simpson para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas nos diferentes sítios de coleta de Itacoatiara - AM. ....  | 81 |
| Tabela 11 - Valores de cobertura amostral para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas nos pontos de coleta “caru”, “piquia”, “TPI” e “UFAM” em Itacoatiara - AM.....  | 81 |
| Tabela 12 - Valores de riqueza de espécie, diversidade de Shannon e diversidade de Simpson observados e estimados para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas em Itacoatiara - AM e incubadas a 10 °C, 25 °C e 35 °C (s.e. = erro padrão; ICMi= intervalo de confiança mínimo; ICMA= intervalo de confiança máximo). .... | 83 |
| Tabela 13 – Valores de cobertura amostral baseados na abundância de espécies para as três temperaturas utilizadas no isolamento de leveduras de amostras de solo de Itacoatiara - AM. ....  | 83 |
| Tabela 14 - Valores de LCBBD (Contribuição do Local para a Diversidade Beta) para as comunidades de leveduras isoladas nos sítios de coleta de Itacoatiara - AM. Valores de p marcados com asterisco (*) representam resultados estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ). 86  | 86 |

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 15 - Valores de LCBD (Contribuição do Local para a Diversidade Beta) para as diferentes temperaturas utilizadas no isolamento de leveduras do solo de Itacoatiara - AM. Valores de <i>p</i> marcados com asterisco (*) representam resultados estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).....   | 87  |
| Tabela 16 - Espécies de leveduras isoladas por metodologia de isolamento direto - Itacoatiara - AM. ....   | 88  |
| Tabela 17 - Valores de riqueza de espécie, diversidade de Shannon e diversidade de Simpson observados e estimados para as comunidades de leveduras para os diferentes sítios de coleta de Itacoatiara – AM. Metodologia de isolamento direto (s.e. = erro padrão; ICMi= intervalo de confiança mínimo; ICMa= intervalo de confiança máximo)..... | 91  |
| Tabela 18 - Valores de cobertura amostral para as comunidades de leveduras obtidas pelo isolamento direto para os diferentes sítios de coleta de Itacoatiara – AM. ....  | 91  |
| Tabela 19 - Perfis de atividade enzimática extracelular dos isolados de levedura obtidos de amostras de solos coletadas em Itacoatiara -AM.....  | 95  |
| Tabela 20 - Espécies possivelmente novas isoladas de solos coletados em Itacoatiara – AM: valores de identidade obtidos na comparação entre as sequências das espécies novas com sequências de linhagens tipo depositadas no GenBank.....  | 102 |
| Tabela 21 -Valores de identidade dos alinhamentos entre as sequências parciais do gene que codifica o fator de alongação EF1- $\alpha$ dos isolados de <i>Lipomyces</i> obtidos com sequências de linhagens tipo depositadas no Genbank. ....  | 109 |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Número de coletas, sítios de coletas, número de amostras e metodologias utilizadas para o isolamento de leveduras do solo. ....38
- Figura 2 - Sítios de coleta na RPPN Santuário do Caraça - MG. MT= mata fechada; CA= campo arbustivo e AL= área alagada. ....39
- Figura 3 - Sítios de coleta na RPPN Santuário do Caraça. Sítio denominado "mata", cuja vegetação apresenta espécies arbóreas de maior porte e vegetação mais densa (a) e (b). Sítio denominado "campo", onde a vegetação é predominantemente arbustiva e apresenta aspecto mais seco. (c) e (d). Sítio denominado "alagado", onde as coletas foram realizadas na margem dos cursos de água (e) e (f). ....40
- Figura 4 - Sítios de coleta em Itacoatiara - AM. ....41
- Figura 5 - Sítio de coleta "terra preta indígena" (TPI). Mancha de terra preta indígena com vegetação característica do bioma amazônico ao redor (a). Aspecto do solo de "terra preta indígena" (b). O solo apresenta uma coloração mais escura. A seta indica um pedaço de cerâmica indígena no solo. ....42
- Figura 6 - Sítio de coleta "Piquiá". Aspecto do solo, coberto de serrapilheira (a). Aspecto da vegetação característica do bioma amazônico (b). ....43
- Figura 7 - Sítio de coleta UFAM. Área localizada atrás da construção do prédio da UFAM. Há regiões de vegetação antropizada (a) e trilhas em área de mata preservada (b). A coleta das amostras de solo foi realizada na região de mata preservada. ....43
- Figura 8 - Sítio de coleta "caru". Aspecto da vegetação de igapó (a). O sítio de coleta fica às margens do rio Urubu (b). Nota-se que o solo é úmido (c). Algumas amostras foram coletadas em região alagada (d). ....44
- Figura 9 - Inoculação de leveduras para os testes de solubilização de fosfato. A imagem corresponde ao teste de solubilização de fosfato após 7 dias de incubação. O teste é considerado positivo quando há a presença de um halo mais claro ao redor da colônia (setas). ....52
- Figura 10 – Compartilhamento de espécies de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas na RPPN Santuário do Caraça, em relação às seis diferentes coletas realizadas. ....61
- Figura 11 - Distribuição dos isolados obtidos em cada coleta realizada na RPPN Santuário do Caraça, considerando-se a temperatura de isolamento. No eixo x estão representadas as coletas realizadas, numeradas de 1 a 6. ....62
- Figura 12 - Compartilhamento de espécies de leveduras isoladas em três diferentes temperaturas a partir de amostras de solo coletadas na RPPN Santuário do Caraça por metodologia de enriquecimento, em relação às seis diferentes coletas realizadas ..... 63
- Figura 13 - Distribuição dos isolados de leveduras obtidos em cada coleta realizada na RPPN Santuário do Caraça, considerando-se o sítio de coleta.....64
- Figura 14 - Compartilhamento de espécies de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas na RPPN Santuário do Caraça por metodologia de enriquecimento, em relação aos sítios de coleta.....64
- Figura 15 - Riqueza de espécie ( $q=0$ , primeiro quadrante), diversidade de Shannon ( $q=1$ , segundo quadrante) e diversidade de Simpson ( $q=2$ , terceiro quadrante) para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas nos sítios "alagado", "campo" e "mata"

(representado como “guides” na figura) na RPPN Santuário do Caraça. As linhas contínua e pontilhada representam valores observados (interpolação) e estimados (extrapolação), respectivamente. A área sombreada corresponde ao intervalo de confiança de 95%. No eixo “x” estão representados os valores de abundância e no eixo “y” os valores de diversidade.... 66

Figura 16 - Curva de acumulação de espécies e suficiência amostral para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas nos sítios “alagado”, “campo” e “mata” na RPPN Santuário do Caraça. As linhas contínua e pontilhada representam valores observados (interpolação) e estimados (extrapolação), respectivamente. A área sombreada corresponde ao intervalo de confiança de 95%. No eixo “x” estão representados os valores de abundância e no eixo “y” os valores de cobertura amostral. .... 67

Figura 17 - Dissimilaridade na comunidade de leveduras do solo da RPPN Santuário do Caraça. Dissimilaridade de Jaccard (JAC), substituição de espécies ou turnover (TUR) e aninhamento (NES) entre os sítios de coleta. .... 68

Figura 18 - Dissimilaridade na comunidade de leveduras do solo da RPPN Santuário do Caraça. Dissimilaridade de Jaccard (JAC), substituição de espécies ou turnover (TUR) e aninhamento (NES) entre as seis diferentes coletas realizadas. .... 69

Figura 19 - Compartilhamento de espécies da comunidade de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas nos pontos de coleta "caru", "UFAM", "piquiá" e "TPI" em Itacoatiara – AM. .... 79

Figura 20 - Compartilhamento de espécies entre as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas em Itacoatiara – AM, por metodologia de enriquecimento em temperaturas de incubação de 10, 25 e 35 °C. .... 80

Figura 21 - Riqueza de espécie (q=0), diversidade de Shannon (q=1) e diversidade de Simpson (q=2) para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas nos sítios “caru”, “piquia”, “TPI” e “UFAM” em Itacoatiara - AM. As linhas contínuas e pontilhadas representam valores observados (interpolação) e estimados (extrapolação), respectivamente. A área sombreada corresponde ao intervalo de confiança de 95%. No eixo “x” estão representados os valores de abundância e no eixo “y” os valores de diversidade.... 82

Figura 22 - Curva de acumulação de espécies e cobertura de amostragem para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas nos pontos de coleta “caru”, “piquia”, “TPI” e “UFAM” em Itacoatiara - AM. As linhas contínuas e pontilhadas representam valores observados (interpolação) e estimados (extrapolação), respectivamente. A área sombreada corresponde ao intervalo de confiança de 95%. No eixo “x” estão representados os valores de abundância e no eixo “y” os valores de cobertura amostral. .... 82

Figura 23 - Riqueza de espécie (q=0), diversidade de Shannon (q=1) e diversidade de Simpson (q=2) para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas em Itacoatiara - AM e incubadas a 10 °C, 25 °C e 35 °C. As linhas contínua e pontilhada representam valores observados (interpolação) e estimados (extrapolação), respectivamente. A área sombreada corresponde ao intervalo de confiança de 95%. No eixo “x” estão representados os valores de abundância e no eixo “y” os valores de diversidade..... 84

Figura 24 - Curva de acumulação de espécies e suficiência amostral para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas em Itacoatiara - AM e incubadas a 10 °C, 25 °C e 35 °C. As linhas contínua e pontilhada representam valores observados (interpolação) e estimados (extrapolação), respectivamente. A área sombreada corresponde ao intervalo de confiança de 95%. No eixo “x” estão representados os valores de abundância e no eixo “y” os valores de cobertura amostral. .... 84

|   |     |
|---|-----|
| Figura 25 – Valores de dissimilaridade encontrados para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo de Itacoatiara – AM. Dissimilaridade de Jaccard (JAC), substituição de espécies ou turnover (TUR) e aninhamento (NES) entre os sítios de coleta...   | 85  |
| Figura 26 - Valores de Unidades Formadoras de colônia (UFC) de leveduras totais em amostras de solo coletadas em Itacoatiara -AM. O eixo y representa os valores de Log <sub>10</sub> de UFC por grama de solo.....   | 89  |
| Figura 27 - Compartilhamento de espécies entre as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas nos sítios de coleta “caru”, “piquia”, TPI” e “UFAM” em Itacoatiara – AM, por metodologia de isolamento direto.....   | 90  |
| Figura 28 - Riqueza de espécie (q=0), diversidade de Shannon (q=1) e diversidade de Simpson (q=2) para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas em Itacoatiara - AM e isoladas por metodologia de isolamento direto e enriquecimento. As linhas contínua e pontilhada representam valores observados (interpolação) e estimados (extrapolação), respectivamente. A área sombreada corresponde ao intervalo de confiança de 95%. No eixo “x” estão representados os valores de abundância e no eixo “y” os valores de diversidade..... | 92  |
| Figura 29 - Curva de acumulação de espécies e cobertura amostral para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas em Itacoatiara - AM e isoladas por metodologia de isolamento direto e enriquecimento. As linhas contínua e pontilhada representam valores observados (interpolação) e estimados (extrapolação), respectivamente. A área sombreada corresponde ao intervalo de confiança de 95%. No eixo “x” estão representados os valores de abundância e no eixo “y” os valores de cobertura amostral. ....                          | 93  |
| Figura 30 - Compartilhamento de espécies de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas em Itacoatiara -AM. As espécies estão organizadas em relação à metodologia utilizada para o isolamento.....  | 93  |
| Figura 31 - Fotos de microscopia de campo claro de interações predador-presa entre linhagens da possível espécie nova de <i>Saccharomycopsis</i> e linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Células colapsadas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> estão marcadas com asteriscos (a, b, c) As setas indicam a presença de "pegs" de predação e haustórios no interior das células predadas (d, e, f). ....   | 100 |
| Figura 32 - Valores de Unidades Formadoras de colônia (UFC) de leveduras totais do gênero <i>Lipomyces</i> , presentes em amostras de solo coletadas em Itacoatiara -AM. O eixo y representa os valores de UFC por grama de solo.....   | 106 |
| Figura 33 - Arvore filogenética construída a partir do alinhamento de sequências parciais do gene do EF1-alfa. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. Valores de bootstrap (50 replicatas) são mostrados ao lado dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas pelo método de Tamura-Nei com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 1). A análise envolveu 40 sequências nucleotídicas em um total de 896 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA11                       | 107 |
| Figura 34 - Esporos sexuais produzidos por isolados de <i>Lipomyces</i> , após 7 dias de incubação, a 25 °C, em meio V8. ....   | 108 |
| Figura 35 - Compartilhamento de espécies entre as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas na RPPN Santuário do Caraça e em Itacoatiara – AM, por metodologia de enriquecimento em meio YNB + 8% de glicose. ....  | 112 |

## LISTA DE APÊNDICES

|  |            |
|--|------------|
| <b>APÊNDICE A Artigo publicado no International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology: <i>Phaffia brasiliiana</i> sp. nov., a yeast species isolated from soil in a Cerrado – Atlantic Rain Forest ecotone site in Brazil.....</b> | <b>131</b> |
| <b>APÊNDICE B Tabela com os valores par-a-par de turnover, aninhamento e dissimilaridade entre os sítios de coleta da RPPN Santuário do Caraça. ....</b>   | <b>139</b> |
| <b>APÊNDICE C Tabela com os valores par-a-par de turnover, aninhamento e dissimilaridade entre as seis coletas realizadas na RPPN Santuário do Caraça. ....</b>  | <b>140</b> |
| <b>APÊNDICE D Tabela com os valores de SCBD para as espécies de leveduras isoladas do solo da RPPN Santuário do Caraça. Apenas espécies cujos valores foram superiores à média estão listadas.....</b>   | <b>141</b> |
| <b>APÊNDICE E Tabela com os valores par-a-par de turnover, aninhamento e dissimilaridade entre os sítios de coleta de Itacoatiara - AM.....</b>  | <b>142</b> |
| <b>APÊNDICE F Tabela com os valores de SCBD para as espécies de leveduras isoladas do solo coletado em Itacoatiara- AM. Apenas espécies cujos valores foram superiores à média estão listadas.....</b>   | <b>143</b> |
| <b>APÊNDICE G Valores de identidade e gaps das sequências dos domínios D1/D2 e ITS entre as linhagens de <i>Lipomyces</i> isolados e as linhagens tipo.....</b>  | <b>144</b> |



## Sumário

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>18</b> |
| <b>1.1 Leveduras</b> .....   | <b>18</b> |
| <b>1.2 Identificação molecular de leveduras</b> .....  | <b>20</b> |
| <b>1.3 Leveduras associadas ao solo</b> .....  | <b>27</b> |
| <b>2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b> .....  | <b>35</b> |
| <b>3 OBJETIVOS</b> .....   | <b>36</b> |
| <b>3.1 Objetivo Geral</b> .....  | <b>36</b> |
| <b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....   | <b>36</b> |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | <b>37</b> |
| <b>4.1 Áreas de coleta</b> .....   | <b>37</b> |
| 4.1.1 RESERVA PARTICULAR DO PATRIMÔNIO NATURAL (RPPN)<br>SANTUÁRIO DO CARAÇA .....   | 37        |
| 4.1.2 ITACOATIARA – AMAZONAS .....   | 37        |
| <b>4.2 Coleta e processamento das amostras</b> .....   | <b>37</b> |
| 4.2.1 RPPN SANTUÁRIO DO CARAÇA .....   | 38        |
| 4.2.2 ITACOATIARA – AMAZONAS .....   | 39        |
| 4.2.3 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS DO SOLO POR ENRIQUECIMENTO .....  | 44        |
| 4.2.4 ISOLAMENTO DIRETO DAS LEVEDURAS DO SOLO .....  | 45        |
| 4.2.5 ISOLAMENTO DE LEVEDURAS PELO USO DE MEIO SELETIVO PARA<br><i>LIPOMYCES</i> .....                                       | 45        |
| <b>4.3 Purificação e manutenção das leveduras</b> .....  | <b>45</b> |
| <b>4.4 Identificação das leveduras</b> .....   | <b>46</b> |
| 4.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA .....  | 46        |
| 4.4.2 PCR <i>FINGERPRINTING</i> COM INICIADOR (GTG) <sub>5</sub> .....   | 47        |
| 4.4.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO D1/D2 DA SUBUNIDADE MAIOR DO GENE<br>DO RNA RIBOSSOMAL UTILIZANDO OS INICIADORES NL1 E NL4..... | 47        |
| 4.4.4 AMPLIFICAÇÃO UTILIZANDO OS INICIADORES ITS1 E ITS4 .....   | 48        |
| 4.4.5 AMPLIFICAÇÃO UTILIZANDO OS INICIADORES EF1-983F E EF1-2218R ..   | 48        |
| 4.4.6 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR .....  | 49        |
| 4.4.7 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO .....   | 49        |
| 4.4.8 ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS SEQUÊNCIAS .....   | 50        |
| <b>4.5 Análises de diversidade</b> .....   | <b>50</b> |
| <b>4.6 Testes enzimáticos e teste de solubilização de fosfato</b> .....  | <b>51</b> |
| <b>4.7 Caracterização morfológica e fisiológica das espécies novas</b> .....   | <b>53</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.7.1 TESTES DE ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO EM MEIO SÓLIDO .....   | 53        |
| 4.7.2 TESTES DE ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO EM MEIO LÍQUIDO .....  | 54        |
| 4.7.3 MEDIÇÃO DAS CÉLULAS E FORMAÇÃO DE PSEUDOHIFAS.....   | 55        |
| 4.7.4 TESTES DE REPRODUÇÃO SEXUADA .....   | 55        |
| <b>4.8 Teste de predação de linhagem de <i>Saccharomyopsis</i> .....</b>   | <b>55</b> |
| <b>5 RESULTADOS .....</b>  | <b>56</b> |
| <b>5.1 RPPN Santuário do Caraça .....</b>  | <b>56</b> |
| 5.1.1 DIVERSIDADE DA COMUNIDADE DE LEVEDURAS ISOLADA DE SOLO NA RPPN SANTUÁRIO DO CARAÇA ENTRE AS DIFERENTES COLETAS REALIZADAS.....                     | 60        |
| 5.1.2 DIVERSIDADE DA COMUNIDADE DE LEVEDURAS ISOLADA DE SOLO NA RPPN SANTUÁRIO DO CARAÇA ENTRE OS DIFERENTES SÍTIOS DE COLETA .....                      | 63        |
| 5.1.3 ANÁLISES DE DIVERSIDADE DA COMUNIDADE DE LEVEDURAS ISOLADA DE SOLO DA RPPN SANTUÁRIO DO CARAÇA .....   | 65        |
| 5.1.4 DIVERSIDADE BETA E PARTIÇÃO DA DIVERSIDADE DA COMUNIDADE DE LEVEDURAS ISOLADA DE SOLO NA RPPN SANTUÁRIO DO CARAÇA. ....                            | 67        |
| 5.1.5 SINGULARIDADE ECOLÓGICA DA COMUNIDADE DE LEVEDURAS ISOLADA DE SOLO NA RPPN SANTUÁRIO DO CARAÇA. ....   | 69        |
| 5.1.6 ESPÉCIES NOVAS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE SOLOS COLETADOS NA RPPN SANTUÁRIO DO CARAÇA.....   | 71        |
| <b>5.2 Itacoatiara – Amazonas.....</b>   | <b>76</b> |
| 5.2.1 COMUNIDADE DE LEVEDURAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE SOLO COLETADAS EM ITACOATIARA – AM POR METODOLOGIA DE ISOLAMENTO POR ENRIQUECIMENTO .....          | 76        |
| 5.2.2 COMUNIDADE DE LEVEDURAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE SOLO COLETADAS EM ITACOATIARA – AM POR METODOLOGIA DE ISOLAMENTO DIRETO .....                      | 87        |
| 5.2.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS DUAS METODOLOGIAS DE ISOLAMENTO DE LEVEDURAS (DIRETO E ENRIQUECIMENTO) DE AMOSTRAS DE SOLO COLETADAS EM ITACOATIARA – AM. .... | 91        |
| 5.2.4 TESTES ENZIMÁTICOS E TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO.....  | 94        |
| 5.2.5 TESTE DE PREDACÃO POR LINHAGENS DE <i>SACCHAROMYCOPSIS</i> .....   | 94        |
| 5.2.6 ESPÉCIES POSSIVELMENTE NOVAS ISOLADAS DE SOLOS COLETADOS EM ITACOATIARA – AM.....  | 100       |
| 5.2.7 MEIO SELETIVO PARA LEVEDURAS DO GÊNERO <i>LIPOMYCES</i> .....  | 105       |

|   |            |
|---|------------|
| <b>5.3 Comparação entre a comunidade de leveduras isoladas de solos coletados na RPPN Santuário do Caraça e a comunidade de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas em Itacoatiara – AM.</b> ..... | <b>112</b> |
| <b>6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b> .....   | <b>113</b> |
| <b>7 CONCLUSÕES</b> .....   | <b>119</b> |
| <b>8 REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>120</b> |
| <b>9 PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM ATIVIDADES</b> .....  | <b>128</b> |
| <b>9.1 Artigos publicados</b> .....   | <b>128</b> |
| <b>9.2 Capítulos de livros publicados</b> .....   | <b>129</b> |
| <b>9.3 Resumos expandidos</b> .....   | <b>129</b> |
| <b>9.4 Orientações</b> .....  | <b>129</b> |
| <b>9.5 Participação em bancas</b> .....   | <b>130</b> |
| <b>9.6 Participação em eventos</b> .....  | <b>130</b> |
| <b>9.7 Participação em comissões</b> .....  | <b>130</b> |
| <b>APÊNDICES</b> .....  | <b>131</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Leveduras

As leveduras podem ser definidas como fungos de crescimento unicelular cuja reprodução é predominantemente assexuada, por fissão ou brotamento. As principais características celulares das leveduras são a presença de parede celular rígida, presença de membrana nuclear, ausência de motilidade, reprodução sexuada e assexuada e ausência de clorofila (KURTZMAN, FELL; BOEKHOUT, 2011). As leveduras são microrganismos mesófilos, que geralmente crescem em temperaturas que variam de 18°C a 45°C (PÉTER; TAKASHIMA; ČADEŽ, 2017). São raras as espécies capazes de crescer acima desta faixa de temperatura, como a espécie *Ogataea polymorpha* isolada de solo na Coréia do Sul, capaz de crescer a 50-51°C (SHIN *et al.*, 2001) e várias linhagens de *Kluyveromyces marxianus*, capazes de crescer a 45-47°C. Espécies como *Leucosporidium scottii* e *Mrakia frigida*, podem ser consideradas psicrófilas, tendo uma temperatura mínima de crescimento entre -1 e 4 °C e uma temperatura máxima de crescimento de cerca de 20°C (DEAK, 2006).

Na natureza, as leveduras são encontradas principalmente associadas a plantas ou animais, mas também estão presentes no solo e ambientes aquáticos. Participam de diversos processos nos ecossistemas, sendo primariamente decompositores de matéria orgânica, participando também da colonização primária de substratos ricos em nutrientes. Além disso, esses microrganismos podem formar diversas relações ecológicas com outros organismos, podendo ser mutualistas, competidoras, parasitas ou patógenos (STARMER; LACHANCE, 2011). São microrganismos imóveis e heterotróficos, apresentando uma grande diversidade fisiológica e bioquímica. Em geral, necessitam de quantidades significativas de carbono orgânico como fonte de energia e minerais para sintetizar a maioria dos constituintes celulares (LACHANCE; STARMER, 1998). O tamanho reduzido das células de leveduras resulta numa alta relação de superfície/ volume, o que favorece uma rápida aquisição de nutrientes essenciais por esses microrganismos. Além disso, as leveduras podem tolerar amplas faixas de pH e muitas vezes são encontradas em substratos muito ácidos, nos quais a maioria das bactérias não é capaz de se multiplicar (STARMER; LACHANCE, 2011). As leveduras podem se desenvolver até mesmo em superfícies lisas e inertes, sendo capazes de formar pseudohifas ou hifas que penetram ou se espalham na superfície do substrato, formando biofilmes (LACHANCE, 2011).

Leveduras são membros de dois grandes filos caracterizados por diferentes modos de reprodução sexual. Representantes do filo Ascomycota produzem ascósporos de diferentes

formatos que se desenvolvem a partir de uma meiose (divisão reducional) de um núcleo diploide dentro de uma asca (estrutura em forma de saco). Tal estrutura não está contida em um corpo de frutificação, ao contrário do que acontece com os fungos filamentosos. Leveduras do filo Basidiomycota exibem uma grande variedade na morfologia do basídio, onde os esporos meióticos são formados externamente (HOFFMAN; WOOD; FANTES, 2015). Em leveduras heterotáticas, a fusão ou conjugação de duas células haploides de *mating-type* (linhagens sexuais) opostos ocorre antes da meiose que leva à produção dos esporos. Em muitos fungos unicelulares, o ciclo sexual está ausente ou ainda não foi descoberto. Nesse caso, a falta de ciclo sexuado pode ser devido à ausência de linhagens compatíveis sexualmente ou ao desconhecimento das condições ideais para a esporulação destes microrganismos. Espécies sem o ciclo sexual conhecido eram classificadas em gêneros distintos, aguardando a descoberta da reprodução sexuada. Atualmente há um esforço para se adotar uma classificação única para espécies sexuadas e assexuadas. O gênero *Candida* é um exemplo de grupo de leveduras que contém espécies sem ciclo sexual conhecido que podem ter homólogos sexuais em outros gêneros. A afinidade de tais leveduras para seus correspondentes teleomórficos pode ser determinada por comparação de sequências de DNA (LACHANCE; WALKER, 2018).

As leveduras ascomicéticas possuem brotamento holoblástico bipolar ou multilateral diferente do brotamento enteroblástico presente em muitas leveduras basidiomicéticas. Além disso, há também diferenças na composição de polissacarídeos da parede celular e na morfologia dos septos das hifas, quando presentes. Ecologicamente, leveduras ascomicéticas podem ser encontradas em habitats com presença de alta concentração de nutrientes (copiotróficas), e são dependentes de vetores animais para a dispersão. Por outro lado, leveduras basidiomicéticas muitas vezes têm a habilidade de captar nutrientes que estão presentes em baixas concentrações no ambiente e possuem adaptações para crescimento em superfície, além de capacidade de dispersão pelo ar. Como exemplo, muitas leveduras basidiomicéticas formam uma cápsula mucilaginosa que pode proteger as células da dessecação e outras dispersam seus esporos assexuados lançando-os ao ar (balistoporos) (LACHANCE, 2011).

Além do papel ecológico, as leveduras e os seus produtos metabólicos têm sido utilizados por seres humanos de maneiras empíricas desde tempos antigos. Foram os primeiros microrganismos a serem domesticados para a produção de cerveja, pão e vinho, e continuam a ser utilizados na produção de proteínas recombinantes, bioetanol, vitaminas, pigmentos, e na alimentação de animais, dentre outras aplicações (LACHANCE, 2011).

## 1.2 Identificação molecular de leveduras

As regras para taxonomia de leveduras e fungos filamentosos seguem as diretrizes presentes no Código Internacional de Nomenclatura Botânica. A descrição de espécies novas de leveduras deve incluir uma caracterização morfológica e fisiológica, bem como um diagnóstico com as características capazes de diferenciar o grupo taxonômico que está sendo descrito das espécies previamente descritas. Os nomes dos novos *taxa* devem ser em latim ou modificados de acordo com as regras de derivação Latina, incluindo denominações de gênero apropriadas. Em julho de 2011, o Congresso Internacional de Botânica adotou uma alteração no artigo 59 do Código Internacional de Nomenclatura Botânica, que estabeleceu o princípio de um nome, uma espécie. Dessa maneira espécies sexuadas e assexuadas devem possuir um só nome (NORVELL, 2011). Outras recomendações importantes são o depósito da linhagem tipo da espécie a ser descrita em pelo menos duas coleções de cultura públicas, além do depósito da sequência genética de regiões *barcode*, como dos domínios D1/D2 e a região dos espaçadores transcritos internos 1 e 2 (ITS), presentes no gene do rRNA (RNA ribossomal) das leveduras, em banco de dados de acesso público, como o Genbank (NCBI). As regras para a descrição de novos gêneros, famílias e ordens são similares àquelas para a descrição de novas espécies. A não observação das normas propostas pelo código pode resultar na tipificação inadequada de leveduras, resultando em um grande número de nomes de espécies considerados inválidos. Nesse contexto YURKOV et al. (2021) discutem o impacto das mudanças de nomenclatura nos nomes das espécies de leveduras na comunidade de usuários, seja ela clínica, biotecnológica, associada a alimentos ou do campo da propriedade intelectual. Os autores citam como exemplo a espécie *Candida auris*, que foi descrita com base em um único isolado (SATO et al., 2009). A linhagem tipo, JCM 15448, também foi depositada como CBS10913 e DSM 21092, sem se referir a holótipo, ex-tipo ou isotipo, com a redação "*Typus stirps JCM15448*" na descrição latina. Se as regras do código fossem seguidas estritamente, a publicação da espécie seria considerada inválida. Contudo, essa espécie de levedura e seu nome são de grande relevância clínica, com 16.100 registros no *Google Scholar* e 759 publicações listadas no PubMed (dados de 15 de outubro de 2021). A possível alteração do nome dessa espécie com base no equívoco da ambiguidade da indicação do holótipo teria enorme impacto na clínica, epidemiologia, infectologia e também para os pacientes que sofrem de infecção por *C. auris*, uma vez que o nome já se encontra consolidado. Dessa maneira é importante que as normas de publicação de novas espécies sejam valorizadas e seguidas pelos taxonomistas, assim

também como é importante evitar mudanças taxonômicas desnecessárias sobretudo em espécies de grande relevância clínica ou biotecnológica.

Os procedimentos tradicionais utilizados para a identificação de leveduras se baseiam na morfologia celular e em um conjunto padronizado de testes de fermentação e assimilação de compostos de carbono e nitrogênio. Estes ensaios são trabalhosos e por vezes produzem resultados ambíguos devido à variabilidade fisiológica das linhagens. Dadas essas dificuldades, atualmente são utilizados métodos moleculares para a identificação das leveduras (KURTZMAN; BOEKHOUT, 2017). Com o advento das técnicas de sequenciamento de DNA, é possível obter uma identificação rápida e precisa desses microrganismos (KURTZMAN; SUZUKI, 2010).

Atualmente, o conceito filogenético de espécie, baseado em dados de sequência de DNAr e outros genes, é universalmente aplicado na taxonomia de leveduras, pois vários estudos revelaram uma correlação relativamente boa entre o conceito de espécie biológica e a divergência dessas sequências (BOEKHOUT *et al.*, 2021). A análise da sequência de nucleotídeos dos domínios 1 e 2 (D1/D2) da subunidade maior (26S) do gene do RNAr é utilizada para diferenciar a maioria das espécies de leveduras. Essa região possui cerca de 600 nucleotídeos e foi utilizada por Kurtzman e Robnett em 1998, e por Fell *et al.* em 2000, para criar um banco de dados universal de sequências para a identificação de leveduras ascomicéticas e basiomicéticas.

A região dos espaçadores transcritos internos ITS1 e ITS2, separados pelo gene 5.8S, também é utilizada para identificação de espécies de leveduras. Tal região é frequentemente utilizada para separar espécies de leveduras filogeneticamente relacionadas quando a análise da região D1/D2 não é suficiente. A existência de polimorfismos intraespecíficos nas sequências genéticas, os eventos de hibridização e as diferentes taxas de substituição de nucleotídeos entre as espécies podem dificultar a diferenciação de leveduras em espécies diferentes (GROTH; HANSEN; PISKUR, 1999; KURTZMAN, FELL; BOEKHOUT, 2011). Para a diferenciação de linhagens filogeneticamente relacionadas pode-se realizar o sequenciamento de outras regiões do gene do RNA ribossomal, tal como a região espaçadora intergênica (IGS). O sequenciamento da região IGS já foi utilizado para separar linhagens relacionadas de *Cryptococcus* (DIAZ *et al.*, 2000), *Xanthopyllomyces* (FELL; BLATT, 1999), *Mrakia* (DIAZ; FELL, 2000), *Saccharomyces* (KURTZMAN, 2006) e *Trichosporon* (SUGITA *et al.*, 2002). No entanto, a ocorrência de sequências repetitivas e regiões homopoliméricas faz com que a região IGS seja difícil de sequenciar para algumas espécies (KURTZMAN, 2006). O

sequenciamento dos genes do fator de alongação 1- $\alpha$  e da RNA polimerase II também é utilizado para separação de espécies filogeneticamente próximas quando D1/D2 e ITS não são capazes de distingui-las. Porém o maior desafio para a utilização destas outras sequências é a dificuldade de se desenvolver iniciadores universais, além da construção de bancos de dados que incluam as sequências de todas as espécies conhecidas. WRENT et al. (2010) desenvolveram um método independente de sequenciamento para diferenciar espécies de *Zygosaccharomyces*, especialmente para as espécies *Z. bailii*, *Z. mellis* e *Z. rouxii*, a partir da análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de DNA (RFLP) da região IGS. O método utiliza endonucleases para gerar um padrão de fragmentos a partir de sequências de DNA da região IGS. O método proposto foi capaz também de diferenciar híbridos, o que não é possível em testes de identificação baseados em sequenciamento de determinadas regiões.

Kurtzman e Robnett (2013) mostraram o uso da análise filogenética multigênica para o posicionamento filogenético de espécies tipo dos 70 gêneros de leveduras ascomicéticas (sub-filo Saccharomycotina) reconhecidos até aquele momento. Os autores utilizaram sequências concatenadas dos genes nucleares da subunidade maior e da subunidade menor do gene do rRNA, do fator de alongação da tradução 1- $\alpha$ , e das sub-unidades 1 (*RPB1*) e 2 (*RPB2*) da RNA polimerase II. A análise utilizada na comparação das sequências (“*maximum likelihood*”) proporcionou uma visão geral das relações filogenéticas entre os gêneros de leveduras ascomicéticas, além de mostrar que todos os gêneros pertencentes ao sub-filo Saccharomycotina representavam um grupo monofilético, como já havia sido proposto anteriormente. Os autores salientaram que, a partir de uma melhor compreensão das relações filogenéticas entre as espécies de leveduras por meio da análise de sequências gênicas, muitas espécies deveriam ser reposicionadas em gêneros filogeneticamente circunscritos. Isto deve ser feito especialmente para as espécies que foram classificadas em gêneros sem fase sexual observada, como espécies de *Candida*.

O gênero *Candida* é um grupo polifilético que consiste em espécies de leveduras que possuem afinidade ascomicética, mas que não formam ascósporos. Tais leveduras se dividem por brotamento multilateral e não possuem morfologia celular distintiva. Daniel et al. (2014) discutem o reposicionamento filogenético de espécies classificadas no gênero *Candida*. Os autores sugerem que, a partir de análises filogenéticas multigênicas, as espécies de *Candida* possam ser transferidas para gêneros teleomórficos com grande confiabilidade. Para espécies de *Candida* que formam grupos filogeneticamente bem circunscritos, mas não possuem representantes teleomórficos, é justificável a criação de novos gêneros para a acomodação destas leveduras. Entretanto, um número considerável de espécies é filogeneticamente basal nas



árvores filogenéticas analisadas no estudo e, dada a falta de banco de dados para a realização de estudos multigênicos, não puderam ser classificadas nos grandes grupos existentes. Daniel *et al.* (2014) sugerem que tais espécies sejam mantidas em *Candida*, com a indicação *pro tempore*, até que se possa fazer um estudo multigênico com um banco de dados mais abrangente.

Vários trabalhos têm sido publicados reclassificando e criando gêneros para a acomodação das espécies de leveduras descritas em *Candida*. Estes trabalhos incluem a criação do gênero *Diutina* para a acomodação da espécie nova *Diutina siamensis* e reclassificação das espécies *Candida catenulata*, *Candida mesorugosa*, *Candida neorugosa*, *Candida pseudorugosa*, *Candida ranongensis*, *Candida rugosa* e *Candida scorzettiae* (KHUNNAMWONG *et al.*, 2015); a criação dos gêneros *Teunomyces* e *Suhomyces* para a transferência de espécies do clado *C. kruisii* e do clado *C. tanzawaensis*, respectivamente (KURTZMAN; ROBNETT; BLACKWELL, 2016); a criação do gênero *Groenewaldozyma* para a transferência de três espécies de *Candida* (*C. auringiensis*, *C. salmanticensis* e *C. tartarivorans*) (KURTZMAN, 2016); a criação do gênero *Martiniozyma* para a acomodação das espécies *C. abiesophila* e *C. asiatica* e a transferência de sete outras espécies para o gênero *Saturnispora* (KURTZMAN, 2015); a transferência de 25 espécies de *Candida* para o gênero *Starmerella* (SANTOS *et al.*, 2018), seis espécies de *Candida* para *Hyphopichia* (RIBEIRO *et al.*, 2017), cinco espécies para *Meyerozyma* (YURKOV.; DLAUCHY; PÉTER, 2017) 18 para *Wickerhamiella* (DE VEGA *et al.*, 2017) e a transferência de seis espécies de *Candida* para *Metschnikowia* e três para *Clavispora* (KURTZMAN *et al.*, 2018), a transferência de *C. cylindracea* para o então criado gênero *Limtongozyma* (BOONTHAM *et al.*, 2020), entre outros.

A partir de 2015, partindo do princípio um nome = um fungo, vários grupos polifiléticos de leveduras basidiomicéticas foram revisados e reclassificados. Wang *et al.* (2015b), a partir de análises filogenéticas multi-gênicas, assim como comparações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, reclassificaram espécies de leveduras do subfilo Pucciniomycotina, criando 26 novos gêneros e propondo 111 novas combinações de espécies. No grupo Pucciniomycotina estão os gêneros *Bensingtonia*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* e *Sporobolomyces*, todos polifiléticos anteriormente ao estudo.

Wang *et al.* (2015a) realizaram um estudo filogenético de leveduras do Subfilo Ustilaginomycotina. Este grupo é composto principalmente por fungos dimórficos, patógenos de plantas, que apresentam um estágio leveduriforme durante o ciclo de vida. A partir dos

estudos genéticos realizados, os autores comprovaram que as classes Malasseziomycetes, Moniliellomycetes e Ustilaginomycetes são monofiléticas e a classe Exobasidiomycetes é parafilética. Os gêneros *Dirkmeia*, *Kalmanozyma*, *Golubevia* e *Robbauera* foram criados para acomodar as espécies de *Pseudozyma* e *Tilletiopsis* filogeneticamente não relacionadas às espécies tipos dos mesmos. Vinte e oito novas combinações foram formadas com a transferência da maioria das espécies anamórficas para os gêneros teleomorfos correspondentes. Algumas espécies de *Pseudozyma* não puderam ser filogeneticamente posicionadas e os autores propõe o uso do termo *pro tempore* (ou *pro tem.* em abreviação) para indicar tais espécies.

Tremellomycetes é um grupo basal em Agaricomycotina composto principalmente por espécies dimórficas com fase de vida leveduriforme monocariótica e fase dicariótica na forma filamentosa, e algumas espécies produzem corpos de frutificação gelatinosos (WEISS *et al.*, 2014). Liu *et al.* (2015) realizaram estudo filogenético de classificação de espécies de leveduras de Tremellomycetes, com base em sequências de sete genes da maioria das espécies de leveduras do grupo e também táxons filamentosos relacionados. A partir do estudo, o grupo foi organizado em cinco ordens, 14 famílias e 54 gêneros, dos quais sete são famílias novas e 18 são gêneros novos, além de 185 novas combinações de espécies.

Ainda em Basidiomycota, com base em análises filogenéticas multi-locus, 107 novas espécies de leveduras obtidas de amostras de solo e filoplano coletadas principalmente na China, foram descritas e posicionadas em oito novos gêneros (*Begerowomyces*, *Boekhoutia*, *Meniscomyces*, *Pseudosterigmatospora*, *Robertozyma*, *Rosettozyma*, *Sterigmatospora* e *Teunia*, três novas famílias (Heitmaniaceae, Jianyuniaceae e Rosettozymaceae) e duas novas ordens (Heitmaniales e Rosettozymales). No mesmo estudo, foram feitas três reclassificações de espécies e a validação de 66 táxons (LI *et al.*, 2020).

Com o barateamento e maior acessibilidade das técnicas de sequenciamento de segunda geração alguns trabalhos têm sido publicados com análises filogenéticas que utilizam o genoma completo da espécie de levedura (filogenômica). Libkind *et al.*, (2011) descreveram a espécie *Saccharomyces eubayanus* a partir de isolados obtidos de cascas de árvores (*Nothofagus* sp.), de estromas do fungo ascomiceto parasita obrigatório *Cyttaria hariotii* e de amostras de solo coletadas próximas a essas árvores, nos arredores do Parque Nacional Nahuel Huapi, Argentina. A partir da análise do genoma completo, os autores perceberam que 99,5% de uma porção do genoma da espécie isolada é idêntica à porção não-*S. cerevisiae* de *S. pastorianus*, ou seja, *S. eubayanus* é uma das linhagens parentais da espécie híbrida *S. pastorianus*. Lopes *et al* (2017) descreveram três novas espécies de *Spathaspora* (*S. girioi*, *S. hagerdaliae*, e *S. gorwiae*) a

partir de isolados obtidos de madeira em decomposição coletada em regiões de ecossistema de Mata Atlântica no território brasileiro. Apenas a partir da análise filogenômica foi obtido suporte robusto no posicionamento das três novas espécies descritas dentro do gênero *Spathaspora*, livre de intrusões de espécies de famílias menos relacionadas, como Metschnikowiaceae ou Debaryomycetaceae. A análise do genoma dessas espécies possibilitou também a identificação de genes relacionados a características metabólicas das novas espécies, tais como a presença de genes que codificam enzimas de interesse biotecnológico (xilosidases), a perda de genes devido à uma possível adaptação ao metabolismo anaeróbio/ fermentativo e uma duplicação de gene que codifica a enzima sorbose-redutase. Morais *et al.* (2017) descreveram a espécie *Spathaspora boniae* e, a partir da análise filogenômica de 510 genes conservados, mostraram diferença no posicionamento filogenético da espécie descrita em relação à análise apenas dos domínios D1/D2. De acordo com os autores, o grupo *Spathaspora* seria parafilético e a nova espécie *S. boniae* seria basal às espécies do clado *Candida albicans*/*Lodderomyces*. Contudo o genoma completo de todas as espécies do gênero não estava disponível no momento da realização das análises. Os autores então sugeriram a manutenção da nova espécie em *Spathaspora* até a disponibilidade de dados suficientes a realização de novas análises.

O gênero *Scheffersomyces* também seria um gênero parafiléticos se considerada a análise filogenômica. A espécie *Scheffersomyces stambukii* foi descrita em 2018 e posicionada no gênero *Scheffersomyces* com base em análises dos domínios D1/D2 do gene do RNA ribossomal. Contudo, ao considerar a análise filogenômica de 473 genes conservados compartilhados pela linhagem tipo de *S. stambukii* e de 39 outras espécies relacionadas com sequências genômicas disponíveis, *S. stambukii* é posicionada em uma posição basal em relação às espécies do gênero *Spathaspora* e espécies do clado *C. albicans* / *Lodderomyces*, juntamente com outras espécies de *Scheffersomyces* (LOPES *et al.*, 2018).

Shen *et al.* (2018) analisaram os genomas de 332 espécies de leveduras do subfilo Saccharomycotina, total que representa quase um terço de toda a diversidade de leveduras do grupo. No estudo foi construída uma nova filogenia que divide o subfilo em 12 clados principais. Várias famílias estão agora bem circunscritas (por exemplo, Pichiaceae), enquanto outras famílias, ao contrário do que se afirmava anteriormente, não são monofiléticas (por exemplo, Dipodascaceae e Trichomonascaceae). Com relação ao tempo de evolução, os autores estimaram a origem do subfilo entre 317 e 523 milhões de anos atrás (m.a.a.); a origem do clado CUGSer1, (onde *C. albicans*, está inserida) entre 178 e 248 (210) m.m.a, e a divergência de *S. cerevisiae* e *C. albicans* de suas espécies irmãs (*Saccharomyces paradoxus* e *Candida*

*dublinskiensis*) entre 4,0 e 5,8 m.a.a e 5,0 e 14,0 m.a.a., respectivamente. Poucos genes (878 em 186 genomas completos) foram adquiridos através de 365 eventos distintos de transferência horizontal a partir de fontes não-fúngicas (principalmente bacterianas) e a maior parte deles está relacionada a caracteres metabólicos. Tais genes adquiridos representam uma pequena parcela do genoma (0,04 a 0,06%) e tiveram pouco impacto na diversificação global dos genomas estudados. Os autores também estimaram as taxas de ganho e perda de uma compilação de 45 características metabólicas distintas em 274 espécies e inferiram que o último ancestral comum das leveduras era metabolicamente complexo, capaz de assimilar 27/45 dos compostos de carbono e nitrogênio analisados (por exemplo, nitrato, xilose e galactose) e oito das características testadas estavam provavelmente ausentes (por exemplo, fermentação de glicose e assimilação de metanol, ribose e hexadecano). Esse ancestral seria similar a alguma espécie típica do subfilo Pezizomycotina (que contém os gêneros *Aspergillus* e *Neurospora*, por exemplo), com um genoma maior e conseqüentemente genes metabólicos para assimilação de uma ampla gama de fontes de nitrogênio e carbono (o que não é observado nas espécies existentes atualmente, como *S. cerevisiae*). A partir desses resultados os autores concluem que a diversidade metabólica observada atualmente no subfilo Saccharomycotina foi alcançada por meio de repetidas e extensas perdas de características metabólicas, e essa evolução redutiva foi importante na diversificação evolutiva das espécies.

Abordagens genômicas têm sido cada vez mais utilizadas para a descrição de novas espécies de leveduras. Cerca de 3077 genomas completos de leveduras estão publicados e dentre eles 70% correspondem a genomas de linhagens da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (LIBKIND *et al.*, 2020a). Dentre as principais vantagens do uso de genomas completos na taxonomia de leveduras se destacam a construção de filogenias mais robustas e a caracterização completa dos genes, que por sua vez contribuem para o estudo das características fenotípicas das leveduras (LIBKIND *et al.*, 2020b).

Dentro do contexto apresentado, atualmente é possível realizar a identificação rápida e precisa de leveduras pela comparação de sequências, obtidas a partir do sequenciamento de regiões específicas do DNA, com aquelas depositadas em banco de dados de acesso público. Porém, a interpretação dos resultados deve ser realizada com cautela. Muitas vezes, o estudo de vários genes se faz necessário para poder elucidar as relações filogenéticas entre as leveduras, principalmente para separar espécies intimamente relacionadas. Os estudos de classificação filogenética são essenciais para a revisão e reclassificação de espécies de leveduras que foram descritas com base em características morfológicas e contribuem para a

formação de bancos de dados de sequências acurados, facilitando a descrição de novas espécies. Assim, a correta identificação desses microrganismos contribui para o conhecimento das comunidades de leveduras existentes em diversos substratos, possibilitando o melhor entendimento do papel ecológico que exercem nesses hábitats. A partir do sequenciamento do genoma completo das espécies de leveduras será possível a construção de um sistema natural de classificação além uma melhor compreensão da história evolutiva desses microrganismos.

### 1.3 Leveduras associadas ao solo

O solo consiste em uma mistura de partículas orgânicas e inorgânicas que formam agregados heterogêneos de diferentes tamanhos e contém uma rede complexa de poros. Tal rede pode estar preenchida de gases atmosféricos, vapor de água ou por soluções aquosas de sais variados (YOUNG; CRAWFORD, 2004). Os solos desempenham um papel importante na dinâmica dos ecossistemas, na diversidade biótica, na infiltração de água, no controle da erosão, na produção agrícola, na produção de combustíveis e na qualidade da água doce do planeta (PAUL, 2016). Por serem os maiores reservatórios de matéria orgânica em decomposição, os solos suportam uma comunidade microbiana extremamente rica. Apesar da grande quantidade de carbono orgânico presente nos solos, ele pode ser considerado um substrato pobre em nutrientes pelo fato da maioria do carbono e nitrogênio estar disponível na forma de compostos heterocíclicos (substância húmica) e dessa forma, indisponível para os microrganismos do solo (BUZZINI; LACHANCE; YURKOV, 2017). Leveduras já foram recuperadas de vários tipos de solo, incluindo solos extremamente ácidos, alcalinos, vulcânicos e solos criogênicos (YURKOV, 2018). As leveduras comumente encontradas no solo em geral são capazes de utilizar L-arabinose, D-xilose e celbiose aerobicamente (BOTHÁ, 2006; LEGUINA *et al.*, 2019). Esses carboidratos são os produzidos a partir de matéria vegetal lignocelulósica pela ação de enzimas hidrolíticas de bactérias ou fungos. Algumas leveduras do solo também podem assimilar intermediários da degradação da lignina, como ácido ferúlico, ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido protocatecuico e ácido vanílico (BOTHÁ, 2011).

As leveduras não apresentam contagens numerosas no solo. Raramente são encontradas mais que alguns milhares de células destes microrganismos por grama de solo. Em geral, são encontradas entre  $10^3$  e  $10^4$  células de leveduras em amostras de um grama de solo. Solos ricos em matéria orgânica geralmente possuem um maior número de colônias de levedura (BOTHÁ, 2006). Índices maiores de abundância são observados em solos agrícolas fertilizados (VADKERTIOVÁ; DUDÁŠOVÁ; BALÁŠČÁKOVÁ, 2017) e em solos temperados e boreais

não fertilizados, onde as taxas de decomposição matéria orgânica são lentas (CHERNOV, 2005). A quantidade de células de levedura presente no solo geralmente diminui com a profundidade do solo, devido à também redução da quantidade de nutrientes disponíveis e concentração de matéria orgânica (BOTHA, 2006) sendo que é raro encontrar leveduras abaixo dos 20-30 cm de profundidade (MAKSIMOVA; CHERNOV, 2004; WUCZKOWSKI *et al.*, 2005).

O solo representa um reduto para os propágulos de leveduras provenientes de fontes presentes sobre o solo, como frutos, folhas e pela atividade dos animais (YURKOV, 2017). A maior parte das leveduras do solo é encontrada próxima a árvores frutíferas, uma vez que os frutos em decomposição caídos no solo podem funcionar como inóculo destes microrganismos. Assim também, os compostos orgânicos associados aos exsudatos liberados pelas raízes das plantas são rapidamente assimilados pelas leveduras, o que resulta em uma maior população desses microrganismos na rizosfera (BOTHA, 2011).

Algumas características podem ser utilizadas para confirmar que determinada levedura tem como verdadeiro habitat o solo, e que não foi encontrada nesse substrato apenas transitoriamente, como, por exemplo, o isolamento frequente da mesma espécie de levedura no solo e a ausência desta em outras fontes sobre o solo. Uma das maiores limitações do solo é a baixa disponibilidade de nitrogênio, uma vez que nesse substrato o nitrogênio está associado a matéria orgânica na forma de polímeros como a quitina, proteínas e ácidos nucleicos. Algumas adaptações favorecem a capacidade de algumas espécies de leveduras de crescer no solo. As leveduras basidiomicéticas, por exemplo, podem utilizar uma ampla variedade de fontes de carbono, incluindo compostos complexos. Outra característica vantajosa observada em microrganismos do solo é a formação de capsula extracelular de polissacarídeos. Tal estrutura possibilita a captação e concentração de nutrientes em um solo nutricionalmente pobre. Também oferece proteção contra a dessecação em ambientes com baixa atividade de água. Estas características são bem observadas nas leveduras dos gêneros *Lipomyces*, *Naganishia* e *Solicoccozyma* (YURKOV, 2017).

As comunidades de leveduras no solo freqüentemente apresentam baixa diversidade de espécies. Entretanto, a baixa riqueza de espécies observada em um único ponto de coleta (diversidade alfa) contrasta com o maior número de leveduras que podem ser isoladas de uma floresta inteira ou de uma região. Isso acontece porque a distribuição de leveduras nos solos é fragmentada, onde poucas espécies são comuns entre os locais de amostragem. Essa distribuição irregular de espécies entre os diferentes pontos de coleta resulta em um maior valor de diversidade quando considerada a região como um todo (YURKOV, 2018). Yurkov *et al.*

(2016) isolaram e identificaram leveduras de solos coletados em três sítios diferentes no Parque Natural da Serra da Arrábida (Portugal), na região do mediterrâneo. O isolamento foi realizado por plaqueamento de diferentes diluições de suspensão de solo em meio sólido com glicose como fonte de carbono. No local foram amostradas áreas de floresta úmida, floresta semi-seca e campo arbustivo. Um total de 613 linhagens de leveduras foi isolado, distribuído em 57 espécies, das quais 13 ascomicéticas e 44 basidiomicéticas. Vinte espécies representaram possíveis espécies novas. Apenas oito espécies ocorreram em todos os três locais de amostragem. Os valores mais altos de contagem total de leveduras variaram entre  $1,3 \times 10^5$  a  $1,3 \times 10^6$  UFC (Unidades Formadoras de Colônias) por grama de solo. A comunidade mais rica em espécies (34 espécies) foi a de solo coletado em campo arbustivo, seguido de comunidade de florestas úmidas (31 espécies) e floresta semi-seca (25 espécies). Em todos os três sítios de coleta, as leveduras basidiomicéticas prevaleceram sobre as espécies ascomicéticas. Dentre as espécies basidiomicéticas, as mais frequentes foram *Cryptococcus terreus* (= *Solicoccozyma terreus*), *Rhodotorula mucilaginosa*, e *Cr. aerius* (= *Solicoccozyma aerius*). Entre as leveduras ascomicéticas, *Candida quercitrusa*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Aureobasidium namibiae* e *Lachancea thermotolerans* foram as mais frequentes. Os valores dos índices de diversidade de leveduras obtidos foram maiores do que os apresentados para outros solos da Europa. Com relação à influências climáticas, as áreas de coleta com menor nível de precipitação mostraram forte impacto na diversidade de leveduras e na estrutura da comunidade. A menor precipitação resultou em um aumento no número de espécies raras e diminuição dos valores de uniformidade da comunidade. A partir dos resultados do estudo, os autores concluíram que a estrutura da comunidade de leveduras do solo está relacionada à cobertura vegetal e à fragmentação do habitat.

Alguns estudos de diversidade de leveduras associadas ao solo foram conduzidos em florestas da Patagônia Argentina. Mestre *et al.* (2011) estudaram a diversidade, distribuição e propriedades fisiológicas de leveduras que habitam a rizosfera, ectomicorrizosfera e o solo associado a árvores de *Notophagus pumilio* no Parque Nacional Nahuel Huapi (San Carlos de Bariloche - Río Negro, Argentina). Grandes populações microbianas habitam a zona que circunda as raízes e as camadas superiores do solo, e nesse ambiente os fungos micorrízicos são um dos microrganismos predominantes (BOTHÁ, 2006). No estudo foram encontradas contagens médias na ordem de  $10^3$  UFC de leveduras por grama de solo. Um total de 126 isolados foi obtido, sendo 38 leveduras a partir de amostras de solo, 43 da rizosfera e 45 das frações ectomicorrizosféricas. Vinte e duas espécies de leveduras foram identificadas (14 do

Filo Basidiomycota e oito Ascomycota), incluindo a espécie *Lindnera rhizosphaerae* (= *Cyberlindnera rhizosphaerae*) que foi descrita a partir dos isolados encontrados no estudo (MESTRE; ROSA; FONTENLA, 2011). Dentre as leveduras basidiomicéticas, as espécies mais frequentes foram *Cryptococcus podzolicus* (= *Saitozyma podzolica*), *Cr. phenolicus* (= *Solicoccozyma phenolicus*) e *Cr. aerius* (= *Solicoccozyma aerius*). Entre as leveduras ascomicéticas, as mais prevalentes foram *Candida maritima*, uma possível espécie nova de *Candida* (próxima a *C. boleticola* - clado *Kurtzmaniella*) e *Hanseniaspora valbyensis*. Em relação às propriedades fisiológicas, os autores observaram que muitas das espécies de leveduras recuperadas foram capazes de assimilar celobiose, D-xilose, L-arabinose, trealose e mio-inositol. Estes dados sugerem que estes microrganismos têm um papel importante como decompositores de material lignocelulósico depositado no solo de florestas pela deposição de folhas e troncos de árvores. Um maior número de espécies capazes de fermentar glicose foi encontrado nas amostras de solo associado à rizosfera, o que pode ser relacionado à maior disponibilidade de fontes de carbono provenientes do exsudato liberado pelas raízes das árvores.

Mestre *et al.* (2014) coletaram amostras de solo em quatro locais de floresta de *N. pumilio* e *N. antarctica* no Parque Nacional Nahuel Huapi, perto da cidade de San Carlos de Bariloche (Río Negro, Argentina). Um total de 123 linhagens de leveduras foi obtido no estudo, distribuído em 28 espécies diferentes. Dentre essas, 20 (incluindo duas possíveis novas espécies) pertencem ao filo Basidiomycota, o que corresponde a 76% dos isolados. A espécie mais frequente foi *Trichosporon porosum* (= *Apiotrichum porosum*) (26% dos isolados). Outras leveduras basidiomicéticas com mais de dois isolados foram *Cr. phenolicus* (*Solicoccozyma phenolicus*), *Holtermanniella wattica*, *Cr. podzolicus* (= *Saitozyma podzolica*), *Cr. saitoi/friedmannii* (= *Naganishia globosa*/ *N. friedmannii*) e a possível espécie nova *Cryptococcus* sp., próxima a *So. aerius*. Dentre as leveduras ascomicéticas, todas as espécies pertencem à ordem Saccharomycetales e as mais frequentes foram *Candida sake* (9 isolados), *Saccharomyces eubayanus* (6), *L. nothofagi* (5) e a possível espécie nova *Wickerhamomyces* sp. (próxima a *W. alni*). Uma média de 10<sup>3</sup> UFC leveduras por grama de solo foi encontrada. Os autores observaram que muitas das espécies de leveduras isoladas também foram encontradas em outros habitats da região (lagos, folhas, geleiras), o que sugere uma estreita relação entre as comunidades de leveduras destes habitats.

Leveduras estão presentes em diversos tipos de solo, e são mais estudadas em solos de vinhedos, pomares e solos de agricultura. Devido à escassez de estudos ecológicos, as leveduras



representam uma fração muito pouco estudada de microrganismos presentes nos solos de florestas. A maior parte dos estudos é concentrada em regiões de floresta temperada e boreal, enquanto estudos na África, nas Américas e na Ásia são escassos. Solos de floresta do Hemisfério Sul são pouco estudados (YURKOV, 2018). Além disso, muitos estudos são focados apenas na descrição de espécies novas e não fornecem dados sobre os outros microrganismos isolados. As principais leveduras encontradas em solos de florestas em regiões de clima temperado pertencem aos gêneros *Apiotrichum*, *Colacogloea*, *Curvibasidium*, *Cutaneotrichosporon*, *Cystobasidium*, *Cystofilobasidium*, *Dioszegia*, *Filobasidium*, *Hanaella*, *Leucosporidium*, *Naganishia*, *Papiliotrema*, *Piskurozyma*, *Rhodotorula*, *Rhodospordiobolus*, *Saitozyma*, *Solicoccozyma*, *Vanrija* e *Visniacozyma*. Já os principais gêneros de leveduras ascomicéticas são *Barnettozyma*, *Cyberlindnera*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Kazachstania*, *Kodamaea*, *Meyerozyma*, *Nadsonia*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Teunomyces*, *Wickerhamomyces* e espécies de *Candida*.

Spurley *et al* (2021) analisaram a diversidade de quase 2000 isolados de leveduras coletadas em associação a substratos naturais tais como solo, casca de árvore, folhas, flores, frutos etc., coletados ao longo do território dos Estados Unidos, incluindo o estado do Alasca. Para o isolamento foi utilizado meio líquido com 0,8 ou 8% de glicose, e temperaturas de incubação de 10, 22 e 30 °C, e para algumas amostras 4 °C. O solo foi o substrato mais amostrado e os autores observaram uma associação estatisticamente significativa a duas OTUs do Filo Basidiomycota (*Trichosporon porosum*, e *Mrakia* spp.) e três OTUs de Saccharomycotina (*T. delbrueckii*, *Cy. saturnus*, e *S. Paradoxus*). Além disso, espécies de Saccharomycotina foram as OTUs mais associadas ao solo (339 OTUs observadas *versus* 152 OTUs não Saccharomycotina).

A maior parte dos estudos de leveduras do solo é baseada em métodos dependentes de cultivo. Mašínová *et al.* (2017) utilizaram método independente de cultivo para estimar a diversidade de leveduras em amostras de solo e serapilheira coletados em bioma de floresta temperada na República Checa. As leveduras basidiomicéticas foram o grupo dominante tanto em amostra de solo como em amostras de serapilheira. A composição das comunidades de leveduras foi significativamente diferente, com dominância de basidiomicetos em ambos os substratos estudados, com valores de abundância entre 32 e 100% das sequências obtidas. Nas amostras de solo, os gêneros mais abundantes foram *Saitozyma* (40,9%), *Solicoccozyma* (33,1%) e *Apiotrichum* (11,6%). Nas amostras de serrapilheira foram observadas mais espécies e uma abundância relativa maior, e os gêneros mais frequentes foram *Saitozyma* (13,7%),

*Solicoccozyma* (10,9%) e *Apiotrichum* (6,4%). Outros gêneros com alta abundância incluíram *Curvibasidium* (6,4%), *Vishniacozyma* (4,8%), *Fellozyma* (4,7%) e *Phaeotremella* (4,7%). O número de OTUs (*Operational Taxonomic Unit* = Unidade Taxonômica Operacional) obtidos para leveduras variou entre 10 e 44. De acordo com os autores esses valores são comparáveis ao número de espécies obtidas em estudos realizados anteriormente com métodos dependentes de cultivos e sugerem que as leveduras do solo representam um grupo de microrganismos que podem ser obtidos por métodos dependente de cultivo.

Mozzachiodi *et al.*, (2022) analisaram sequências genéticas *barcode* do espaçador transcrito interno (ITS) de amostras de solo e serapilheira de floresta temperada depositadas no banco de dados GlobalFungi. A análise revelou 3.783.412 sequências totais de levedura pertencentes a 859 espécies hipotéticas. A abundância média de levedura no solo foi significativamente maior do que na serapilheira e apenas veduras geralmente não eram comuns: apenas 12% das amostras de solo e 3% das amostras de serapilheira incluíam mais de 8% de seqüências ITS de levedura. A riqueza variou entre 1–31 nas amostras de solo e 1–35 nas de serapilheira. %). As espécies de leveduras mais prevalentes, com prevalência significando a porcentagem de amostras em que uma espécie foi encontrada, foram *Saitozyma podzolica*, *Solicoccozyma terricola*, *Apiotrichum xylopiniporosum*, *Tausonia pullulans* e *Cutaneotrichosporon moniliforme*. Essas cinco espécies de leveduras são amplamente difundidas e consideradas cosmopolitas.

No Brasil poucos estudos sobre diversidade de leveduras em amostras de solo estão disponíveis. Mok *et al.* (1984) coletaram 1949 amostras de solo em 15 regiões distintas da floresta amazônica brasileira. Com objetivo de isolar fungos patogênicos, foram utilizadas metodologias indiretas para isolamento de fungos não queratinolíticos por meio de inoculação em peritônio de ratos e para fungos queratinolíticos foi utilizada uma isca de cabelo humano. Todos os isolados recuperados a partir da técnica de inoculação em peritônio de ratos foram leveduras e fungos leveduriformes distribuídos em 82 espécies, num total de 241 isolados. As espécies mais frequentes foram *Torulopsis glabrata* (= *C. glabrata*), *T. famata* (= *Debaryomyces hansenii*) e *Candida guilliermondii* (= *M. guilliermondii*). Vinte e cinco isolados não puderam ser identificados a nível de espécie dentro do gênero *Torulopsis* (= *Candida*). Treze isolados no gênero *Candida* e oito isolados de leveduras ascomicéticas também não puderam ser inseridas nos grupos conhecidos na época do estudo. Apenas três espécies de leveduras basidiomicéticas foram isoladas: *Rhodotorula rubra* (= *Rh. mucilaginoso*), *Trichosporon cutaneum* (= *Cutaneotrichosporon cutaneum*) e *T. inkin*.

Vital *et al.* (2002) isolaram 240 leveduras a partir de amostras de solos coletadas na Estação Ecológica de Maracá, no estado de Roraima na Amazônia brasileira. As leveduras isoladas pertenciam a 66 espécies diferentes, distribuídas em 16 gêneros, sendo 82% dos isolados do Filo Ascomycota. Neste grupo, as espécies mais frequentes foram *Debaryomyces hansenii*, *Candida etchellsii* (= *Starmerella etchellsii*), *Candida robusta* (= *S. cerevisiae*) e *Candida famata* (= *Debaryomyces hansenii*). Outros gêneros isolados foram *Pichia*, *Issatchenkia*, *Lipomyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Williopsis*, *Geotrichum* e *Zygosaccharomyces*. Apenas 13 das 66 espécies isoladas foram do filo Basidiomycota e as mais abundantes foram *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rh. glutinis* e *Cryptococcus laurentii* (= *Papiliotrema laurentii*). Os outros gêneros isolados nesse grupo foram *Fellomyces*, *Sporobolomyces* e *Trichosporon*. Contudo, nesse trabalho a identificação das espécies de leveduras foi feita por métodos clássicos de identificação (baseados em características fenotípicas e fisiológicas) o que pode produzir resultados errôneos.

Costa (2006) estudou a diversidade de leveduras do solo em três municípios do semi-árido da Bahia (Mucugê, Ipirá e Paulo Afonso). As amostras foram coletadas tanto em período seco como em período chuvoso. Um total de 100 isolados foi obtido, sendo 67 em período de seca e 33 no período chuvoso, representando 57 espécies diferentes. As espécies mais frequentes foram *Rh. mucilaginosa*, *Rh. glutinis* e *C. catenulata*. Outras espécies frequentes foram *Brettanomyces bruxellensis*, *Bullera alba*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. sake*, *C. zeylanoides*, *Cr. humicola* (= *Vanrija humicola*), *Cr. laurentii* (= *Papiliotrema laurentii*), *Cr. luteolus* (= *Hannaella luteola*), *Rh. minuta* (= *Cystobasidium minuta*), *Sporobolomyces roseus* e *Tr. pullulans* (= *Guehomyces pullulans*). As espécies foram identificadas a partir das características bioquímicas e fenotípicas e por sequenciamento quando a identificação fisiológica não foi possível.

Carvalho *et al.* (2013) isolaram 307 leveduras a partir de amostras de solo coletadas em três diferentes áreas de Cerrado em Minas Gerais. As coletas foram realizadas em períodos seco e chuvoso. As leveduras foram identificadas pelo sequenciamento dos espaçadores transcritos internos 1 e 2. Nesse trabalho foram isoladas 23 espécies diferentes de leveduras, pertencentes aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kazachstania*, *Kodamaea*, *Cyberlindnera*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Torulaspora* e *Trichosporon*. A maioria das espécies (22) foi isolada durante o período de seca, e apenas nove espécies foram isoladas no período chuvoso. A abundância relativa de leveduras do filo Ascomycota foi de 80% frente a 20% de leveduras do filo Basidiomycota. Os autores não encontraram diferenças significativas nos

componentes físico-químicos analisados no solo (concentrações de fósforo, magnésio e matéria orgânica).

A biodiversidade de leveduras do solo em região do quadrilátero ferrífero (Minas Gerais) foi avaliada em área de vegetação natural (Mata Atlântica, Cerrado e afloramento rochoso); e áreas de mineração com impacto antropogênico (plantação de *Eucalyptus* e área replantada com grama) (MOREIRA; VALE, 2018). A identificação dos isolados foi feita pelo sequenciamento dos domínios D1/D2 do gene do RNA ribossomal. As leveduras encontradas pertencem aos gêneros *Saitozyma*, *Pseudozyma*, *Meyerozyma*, *Debaryomyces*, *Lipomyces* e *Aureobasidium*. Baixa riqueza de espécies foi observada para todas as regiões de coleta (2 a 4 espécies por região), e a predominância foi de leveduras do filo Basidiomycota (82%), com dominância da espécie *Sa. podzolica*.

As comunidades de leveduras do solo em uma área pós-mineração com áreas revegetadas e nativas, ao longo dos biomas Savana Neotropical e Mata Atlântica foram estudadas em Nova Lima e Brumadinho, estado de Minas Gerais por metodologia dependente de cultivo (MOREIRA; DO VALE, 2020). Uma maior riqueza de espécies foi observada nas comunidades de leveduras na área revegetada. Leveduras do Filo Ascomycota foram dominantes e *C. maltosa* foi a mais frequente em duas fitocenoses.

Os estudos disponíveis relativos à diversidade e densidade de leveduras do solo se restringem a um número limitado de tipos de solo como solos cultiváveis e alguns tipos de florestas. Ainda assim, muitos desses estudos são antigos e é difícil rastrear espécies em publicações antigas devido ao uso de nomenclaturas diferentes (YURKOV, 2018). No Brasil, apesar da importância de alguns ecossistemas como *hotspot* de diversidade, poucos estudos de diversidade de leveduras associadas ao solo foram feitos, e na maioria deles o foco dos trabalhos foi no isolamento de fungos patogênicos para o homem ou leveduras produtoras de enzimas ou toxinas *killer*. Além disso, a maior parte da identificação das leveduras foi feita com base em características morfológicas e fisiológicas, que produzem resultados errôneos, impactando os valores dos índices de diversidade encontrados. Sendo assim, é importante a realização de estudos que visem conhecer a biodiversidade de leveduras associadas ao solo nos diferentes biomas brasileiros tanto para o entendimento do papel desses microrganismos no solo como para o estabelecimento de estratégias de conservação de espécies importante em biotecnologia, além da possibilidade do uso destas linhagens em pesquisas de inovação tecnológica.

## 2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Os solos desempenham um papel importante na dinâmica dos ecossistemas, na diversidade biótica, na infiltração de água, no controle da erosão e na qualidade da água doce do planeta. Por serem os maiores reservatórios de matéria orgânica em decomposição, os solos abrigam uma comunidade microbiana extremamente diversa. Leveduras representam um componente importante da comunidade microbiana encontrada em solos. As espécies encontradas nesse habitat são capazes de utilizar um amplo espectro de fontes de carbono, incluindo produtos da hidrólise enzimática de material lignocelulósico tais como compostos aromáticos simples, hemicelulose e ácidos orgânicos. Leveduras são microrganismos heterotróficos, capazes de colonizar diversos substratos presentes em solos. Os estudos disponíveis relativos à diversidade e densidade de leveduras do solo se restringem a um número limitado de tipos de solo, como os cultiváveis, além de alguns tipos de solos florestais. Ainda assim, muitos desses estudos são antigos e as espécies relatadas podem não ter sido identificadas corretamente devido a mudanças taxonômicas ocorridas a partir do uso de ferramentas moleculares. Em muitos destes trabalhos a identificação das leveduras foi feita baseada apenas em características morfológicas e fisiológicas. No Brasil, apesar da presença de ecossistemas caracterizados como *hotspots* de diversidade, poucos estudos de diversidade de leveduras associadas ao solo destes ecossistemas hiperdiversos foram realizadas. A partir do exposto acima, é evidente a importância da realização de estudos que visem conhecer a biodiversidade de leveduras associadas ao solo nos diferentes biomas brasileiros, tanto para o entendimento do papel desses microrganismos no solo, como para o estabelecimento de estratégias de conservação de espécies importante em biotecnologia, além da possibilidade do uso destas linhagens em pesquisas de inovação tecnológica, tais como produção de enzimas, surfactantes, uso na indústria de alimento e como agentes de controle biológico.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Determinar a diversidade de leveduras presente em amostras de solo coletadas na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Santuário do Caraça (Minas Gerais) e áreas de floresta amazônica da cidade de Itacoatiara (Amazonas), utilizando-se diferentes temperaturas e metodologias de isolamento.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Isolar leveduras presentes em amostras de solo a partir de isolamento direto e enriquecimento;
- Comparar três diferentes temperaturas de incubação (10, 25 e 35 °C) para o isolamento de leveduras de solo por meio de metodologia de enriquecimento;
- Identificar as espécies de leveduras utilizando testes moleculares;
- Descrever e caracterizar novas espécies de leveduras;
- Determinar a diversidade das comunidades de leveduras presentes nas amostras de solo nas diferentes regiões estudadas;
- Avaliar a produção de enzimas extracelulares (amilases, celulasas, esterase, lipases, pectinases, proteases, tanases, xilanases) e a solubilização de fosfatos pelos isolados de leveduras;
- Depositar os isolados na coleção de Microrganismos e Células da UFMG.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Áreas de coleta**

#### **4.1.1 RESERVA PARTICULAR DO PATRIMÔNIO NATURAL (RPPN) SANTUÁRIO DO CARAÇA**

A RPPN Santuário do Caraça está localizada na Serra do Caraça, na Cadeia do espinhaço, parte Leste do Quadrilátero ferrífero de Minas Gerais, a 120 quilômetros de Belo Horizonte. Possui uma área de 11.233 hectares, e pertence aos municípios de Catas Altas e Santa Bárbara (CANELAS; BERTOLUCI, 2007). A temperatura média anual varia em torno dos 15 °C (MOREIRA *et al.*, 2004). Através da portaria nº 32, de 30 de março de 1994 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), 1994, foi reconhecida como Unidade de Conservação de Uso Sustentável, na categoria de Reserva Particular do Patrimônio Natural. A Serra do Caraça situa-se em uma região de transição entre os domínios do Cerrado e da Mata Atlântica. Na RPPN Santuário do Caraça existem duas formações vegetais básicas, que são as campestres e as florestais. As campestres, dentro do domínio do Cerrado, e as florestais, dentro do domínio da Mata Atlântica (ABREU, 2013).

#### **4.1.2 ITACOATIARA – AMAZONAS**

A cidade de Itacoatiara pertence à região metropolitana de Manaus e é a terceira cidade mais populosa no estado do Amazonas (IBGE, 2020). Está situada na região nordeste do estado, abrangendo uma área aproximada de 7.426,88 Km<sup>2</sup>. A temperatura média anual varia entre 25° C e 32° C. O bioma amazônico é a vegetação predominante, caracterizado pela presença de três formações florestais bem definidas, tais como: Floresta equatorial subperenifólia. Floresta Equatorial Higrófila de Várzea e Floresta Equatorial Hidrófila de Várzea (SILVA, 2007).

### **4.2 Coleta e processamento das amostras**

Para cada local de coleta foram utilizados metodologias e meios de cultura diferentes para o isolamento das leveduras. A figura 1 apresenta esquema com os locais de coleta, número de amostras coletadas, meios de cultura utilizados e metodologia de isolamento utilizadas.

Figura 1 - Número de coletas, sítios de coletas, número de amostras e metodologias utilizadas para o isolamento de leveduras do solo.

|                                  |  |  |
|----------------------------------|--|--|
| Local                            | RPPN Santuário do Caraça                   | Itacoatiara - AM                             |
| Coletas                          | 6 coletas, a cada 2 meses                  | 1 coleta                                     |
| Sítios de coleta                 | 3 sítios de coleta (mata, campo e alagado) | 4 sítios de coleta (TPI, piquiá, UFAM, carú) |
| N° de amostras                   | 6 x 15 (5 mata, 5 campo, 5 alagado) = 90   | 20 x 4 (TPI, piquiá, UFAM, carú) = 80        |
| Metodologia/<br>meios de cultura | Enriquecimento (Meio líquido)              | Enriquecimento (Meio líquido)                |
|                                  | Direto (YM ágar) → apenas última coleta    | Direto (YM ágar)                             |
|                                  |  | Seletivo para <i>Lipomyces</i>               |

#### 4.2.1 RPPN SANTUÁRIO DO CARAÇA

Seis coletas foram realizadas em intervalos de aproximadamente 2 meses, durante o período de 14 meses. Três sítios diferentes foram escolhidos, com base nas características vegetais do entorno. O sítio “alagado” foi determinado em um local onde o solo recebe influência constante de água doce. O sítio “campo” foi localizado em área de campo arbustivo característico de vegetação do Cerrado. O sítio “mata” foi localizado em um local de vegetação característica de mata atlântica (figura 2; figura 3). Em cada sítio, amostras de solo foram coletadas a cada 50 metros ao longo de um transecto, num total de cinco amostras por sítio e 15 amostras por coleta. Noventa mostras de solo foram coletadas durante todo o período de realização da pesquisa.

A superfície do solo foi raspada com auxílio de uma pá para a retirada de restos de detritos vegetais (serapilheira). Com o auxílio de uma espátula de metal, na qual foi realizada assepsia prévia em etanol 70%, aproximadamente 25 gramas de solo foram coletados em cada ponto. O material de coleta foi acondicionado em sacos plásticos estéreis. As amostras foram mantidas em caixa de isopor com gelo até o processamento, que foi realizado no mesmo dia da coleta.



Figura 2 - Sítios de coleta na RPPN Santuário do Caraça - MG. MT= mata fechada; CA= campo arbustivo e AL= área alagada.



#### 4.2.2 ITACOATIARA – AMAZONAS

Amostras de solo foram coletadas de quatro pontos diferentes, sendo 20 amostras por ponto, totalizando 80 amostras. Em cada ponto de coleta as amostras foram coletadas a cada 50 metros ao longo de um transecto (figura 4). “TPI (Terra preta de índio)” corresponde ao ponto cujo solo é denominado terra preta indígena (figura 5). “UFAM (Universidade Federal do Amazonas)” (figura 6) e “piquiá” (figura 7) são sítios de vegetação típica do bioma amazônico. “Caru” corresponde ao ponto de coleta com solo de igapó, às margens do rio Urubu (figura 8).

A superfície do solo foi raspada com auxílio de uma pá para a retirada de restos de detritos vegetais (serapilheira). Com o auxílio de uma espátula de metal, na qual foi realizada assepsia prévia em etanol 70%, aproximadamente 25 gramas de solo, da camada superficial (até 5 centímetros de profundidade), foram coletados em cada ponto e acondicionados em sacos plásticos estéreis. As amostras foram mantidas em caixa de isopor com gelo e posteriormente em geladeira até o processamento, que foi realizado em até seis dias após a coleta.

Figura 3 - Sítios de coleta na RPPN Santuário do Caraça. Sítio denominado "mata", cuja vegetação apresenta espécies arbóreas de maior porte e vegetação mais densa (a) e (b). Sítio denominado "campo", onde a vegetação é predominantemente arbustiva e apresenta aspecto mais seco. (c) e (d). Sítio denominado "alagado", onde as coletas foram realizadas na margem dos cursos de água (e) e (f).



Figura 4 - Sítios de coleta em Itacoatiara - AM.

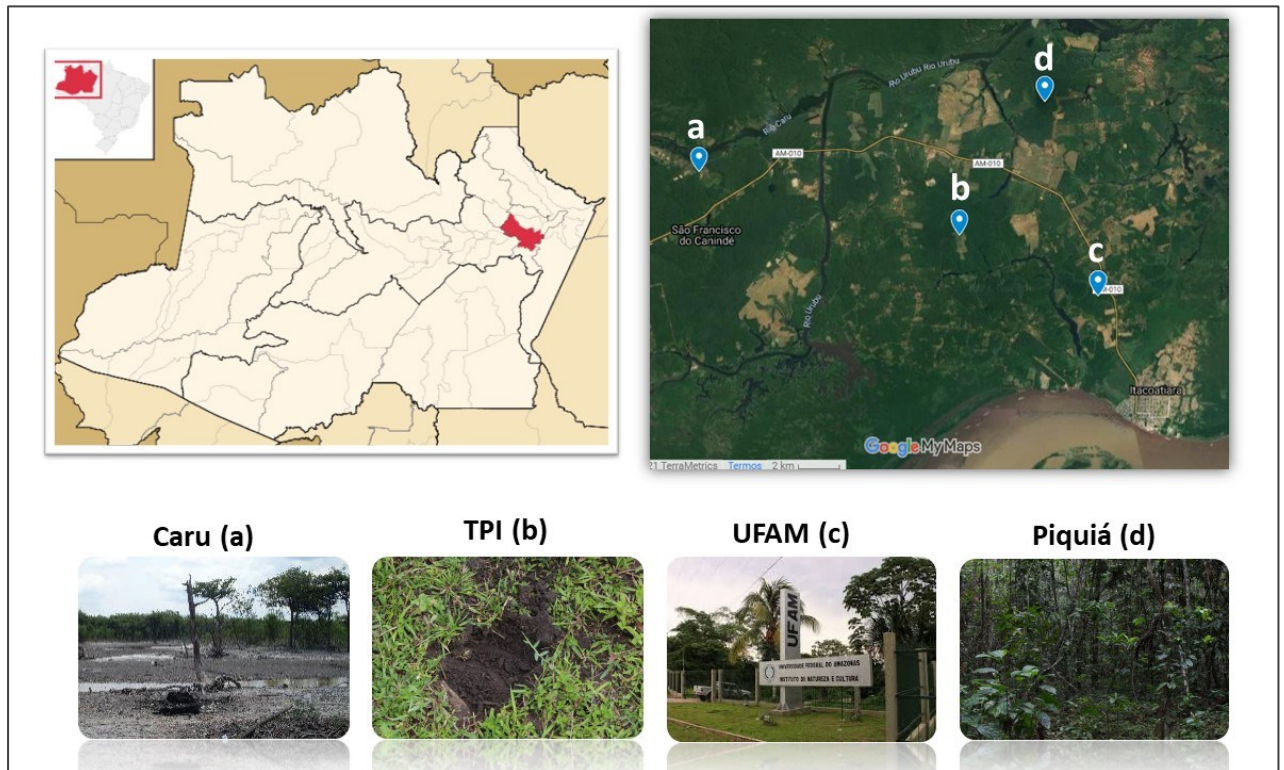


Figura 5 - Sítio de coleta "terra preta indígena" (TPI). Mancha de terra preta indígena com vegetação característica do bioma amazônico ao redor (a). Aspecto do solo de "terra preta indígena" (b). O solo apresenta uma coloração mais escura. A seta indica um pedaço de cerâmica indígena no solo.



Figura 6 - Sítio de coleta "Piquiá". Aspecto do solo, coberto de serrapilheira (a). Aspecto da vegetação característica do bioma amazônico (b).



Figura 7 - Sítio de coleta UFAM. Área localizada atrás da construção do prédio da UFAM. Há regiões de vegetação antropizada (a) e trilhas em área de mata preservada (b). A coleta das amostras de solo foi realizada na região de mata preservada.



Figura 8 - Sítio de coleta "caru". Aspecto da vegetação de igapó (a). O sítio de coleta fica às margens do rio Urubu (b). Nota-se que o solo é úmido (c). Algumas amostras foram coletadas em região alagada (d).



#### 4.2.3 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS DO SOLO POR ENRIQUECIMENTO

O isolamento de leveduras pela metodologia de enriquecimento foi realizado nos dois locais de coleta (RPPN Santuário do Caraça e Itacoatiara – AM). Aproximadamente um grama de cada amostra de solo foi colocado em tubo plástico cônico contendo 10 ml de meio YNB com glicose (YNB 0,67%, glicose 8%, cloranfenicol 0,02%, ampicilina 0,02%). Os tubos foram homogeneizados em agitador tipo vórtex e incubados a 10°C, 25°C e 35°C, em estufa. As amostras foram analisadas todos os dias até a evidenciação de crescimento de microrganismos (turvação do meio, presença de bolhas). Após o crescimento, um ml de cada tubo de cultura foi transferido para novo tubo contendo o mesmo meio e novamente incubado na temperatura correspondente. Após turvação, os frascos foram então homogeneizados e foi realizada uma diluição decimal seriada de cada amostra adicionando 100 µl do meio inicial a 900 µL de água destilada estéril (diluição de 10 vezes), 100 µL desta primeira diluição em outros 900 µL de água destilada estéril e assim sucessivamente, até a amostra inicial ser diluída 10000 vezes. Cem microlitros de cada diluição foram adicionados a uma placa contendo meio YM (glicose 1%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, ágar 2%) e distribuídos uniformemente na placa com auxílio de alça de *Drigalski* ou esferas de vidros esterilizadas. As placas foram incubadas a 10°C, 25°C e 35°C, conforme a temperatura de incubação inicial, até a visualização do crescimento de colônias típicas de leveduras.

#### 4.2.4 ISOLAMENTO DIRETO DAS LEVEDURAS DO SOLO

A metodologia de isolamento direto foi utilizada apenas com as amostras coletadas em Itacoatiara AM. Para isolamento direto das leveduras a partir de amostras do solo foi seguida a metodologia conforme Yurkov *et al.* (2016). Um grama de cada amostra de solo foi colocado em tubos plásticos de 50 ml, e suspenso em água estéril nas diluições 1: 5, 1:10 e 1:20 (p / v) e posteriormente agitado em agitador orbital a 200 rpm por 1 hora. Uma alíquota de 100 µL de cada tubo foi distribuída na superfície de meio YM com auxílio de alça de *Drigalski*. As placas foram incubadas a 22°C por 2 dias e, em seguida, a 4°C para evitar o rápido desenvolvimento dos fungos filamentosos. As placas foram verificadas diariamente por um período de uma semana e após 10, 14 e 21 dias de incubação. As colônias foram diferenciadas em tipos macromorfológicos, contadas e um representante de cada tipo de colônia foi purificado.

#### 4.2.5 ISOLAMENTO DE LEVEDURAS PELO USO DE MEIO SELETIVO PARA *LIPOMYCES*

O meio seletivo para leveduras do gênero *Lipomyces* (YCB + 0,1% de cicloheximida) foi utilizado para o isolamento seletivo de leveduras a partir de amostras de solo coletadas em Itacoatiara – AM. Um grama de cada amostra de solo foi colocado em tubos plásticos de capacidade para 50 ml, e suspenso em água estéril nas diluições 1: 5 e 1:10 (p/v) e posteriormente agitado em agitador orbital a 200 rpm por 1 hora. Uma alíquota de 100 µL de cada suspensão foi espalhada na superfície de meio YCB + 0,1% de cicloheximida com auxílio de alça de *Drigalski*. As placas foram incubadas a 22°C por até 14 dias. As placas foram verificadas diariamente por um período de uma semana e após 10 e 14 dias de incubação. As colônias de leveduras obtidas foram contadas e, para cada amostra, até duas colônias de cada morfotipo diferente foram purificadas e preservadas.

#### 4.3 Purificação e manutenção das leveduras

Os diferentes morfotipos de leveduras foram analisados e, para cada amostra, pelo menos um representante de cada morfotipo foi purificado e preservado para posterior identificação. Colônias purificadas foram descritas conforme a morfologia macroscópica. Para preservação, uma alçada de cada colônia purificada foi inoculada em tubos contendo caldo GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5 %, extrato de malte 1%, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2%) e incubada a 25°C, sob agitação, ou a 10°C em estufa. Após 24 a 72 horas, de acordo com o crescimento

de cada amostra, foram transferidos 0.8 ml da cultura para criotubos de dois ml esterilizados juntamente com 0.2 ml de glicerol estéril para preservação das amostras em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As leveduras isoladas foram depositadas na Coleção de Microrganismos e Células da UFMG.

#### 4.4 Identificação das leveduras

Todas as leveduras foram identificadas pelo sequenciamento de porções do gene do RNA ribossomal. Inicialmente os isolados foram agrupados com base na morfologia colonial. Amostras que apresentarem a mesma morfologia foram submetidas ao agrupamento molecular pela utilização do iniciador (GTG)<sub>5</sub>. Sempre que possível, mais de um representante cada grupo molecular foi submetido ao sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do RNA ribossomal. Quando necessário foi realizado o sequenciamento dos espaçadores transcritos internos (ITS) 1 e 2 para confirmar a identificação da espécie de levedura.

##### 4.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA total foi realizada em isolados crescidos em meio YM (glicose 1%, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona bacteriológica 0,5% ágar 2%), após 24 a 48 horas de crescimento a  $25^{\circ}\text{C}$ . Após crescimento satisfatório as colônias foram adicionadas a 100  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (Tris-HCl 0,05 M, EDTA 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS 10%). A suspensão formada foi agitada em *vortex* por 1 minuto e incubada em banho-maria a  $65^{\circ}\text{C}$  por um tempo mínimo de 30 minutos. Após este período, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) a cada tubo e essa mistura foi homogeneizada por inversão e então centrifugada a 14.500 xg por 15 minutos. A seguir 70  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra foi transferido para novo tubo *eppendorf* e foram adicionados 70  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 15 minutos, para a precipitação do DNA. Decorrido o tempo, foram acrescentados 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado a cada *eppendorf*. As amostras foram homogeneizadas por inversão dos tubos e centrifugadas a 14.500 xg por 10 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi descartado por inversão e os tubos foram colocados para secar *overnight*. O precipitado foi eluído em 50  $\mu\text{L}$  tampão Tris- EDTA 0,1 M (TE) pH 8 e incubado em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente uma hora. A seguir o DNA obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (*NanoDrop Technologies*) e diluído para atingir a concentração aproximada de 200 ng/  $\mu\text{l}$  e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



#### 4.4.2 PCR *FINGERPRINTING* COM INICIADOR (GTG)<sub>5</sub>

Para a confirmação do agrupamento fisiológico das leveduras ascomicetas e basidiomicetas, os isolados foram agrupados molecularmente de acordo com os perfis de bandejamento obtidos após amplificação por PCR com iniciador (GTG)<sub>5</sub> (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'). Cada ensaio foi realizado em 25 µL de uma mistura contendo: 1 µL de DNA, 1,5 µL do iniciador a 10 µmol-1 (MWG Biotech), 4 µL de tampão de PCR 5X (Sinapse Inc), 1,0 µL de DNTP 10 mM, 0,3 µL de Taq DNA polimerase 5U (Sinapse Inc) e o volume final completado com água deionizada estéril. As reações de PCR foram realizadas sob as condições de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 95°C, 1 minuto de anelamento do iniciador a 50 °C e 1 minuto de extensão a 72°C, e uma extensão final por 6 minutos a 72 °C.

Os produtos de PCR obtidos nos ensaios foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1.5%, em tampão TBE 0,5 X (Tris-Borato-EDTA – 89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA), eluídos durante aproximadamente 2 horas a 80 V. Os géis foram corados com o uso de GelRed , (Biotium, USA) visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, France). As leveduras que apresentarem perfis de bandas iguais foram consideradas como pertencentes à mesma espécie.

#### 4.4.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO D1/D2 DA SUBUNIDADE MAIOR DO GENE DO RNA RIBOSSOMAL UTILIZANDO OS INICIADORES NL1 E NL4

Dentre as leveduras que apresentarem perfis moleculares iguais, Dois ou mais isolados foram selecionados para o sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do RNAr utilizando os iniciadores NL-1 (5'- GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'- GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), como descrito por Lachance *et al.* (LACHANCE *et al.*, 1999). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo: 2,0 µL de DNA, 1,0 µL de cada iniciador NL1 e NL4 10 µmol-1 (MWG Biotech), 5,0 µL de tampão de PCR 5X (Sinapse Inc), 2,0 µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 2,0 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de Taq DNA polimerase 5U (Sinapse Inc) e o volume final completado com água destilada estéril. As reações de PCR foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 54 °C por 25 segundos e extensão a 72 °C por 20 segundos, seguida por extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) 1%, em tampão TBE 0,5X, eluídos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. Os géis

foram corados com GelRed (Biotium, USA), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em um sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

#### 4.4.4 AMPLIFICAÇÃO UTILIZANDO OS INICIADORES ITS1 E ITS4

Os isolados de leveduras que apresentarem mais que três substituições na sequência gênica dos domínios D1/D2 e que representam possíveis espécies novas, ou ainda os que a identificação não foi possível com o sequenciamento dos domínios D1/D2 do gene do RNA ribossomal, foram submetidos ao sequenciamento da região dos espaçadores transcritos internos (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do RNAr utilizando os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) conforme descrito por White *et al.* (1990). A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi realizada em um volume final de 50  $\mu\text{L}$  contendo de 1,0 a 5,0  $\mu\text{L}$  de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500ng/ $\mu\text{L}$ , sendo o ideal em torno de 250ng), 1,0  $\mu\text{L}$  de cada iniciador ITS1 e ITS4 10  $\mu\text{mol}^{-1}$  (MWG Biotech), 5,0  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR 5X (Sinapse Inc), 2,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25mM, 2,0  $\mu\text{L}$  de dNTP 10 mM, 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase 5U (Sinapse Inc) e o volume final completado com água miliQ estéril. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador PCR Express (Valpo.protect - Eppendorf). As reações de PCR foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguida por extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) 1%, em tampão TBE 0,5X, eluídos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. Os géis foram corados com GelRed (Biotium, USA), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em um sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, France).

#### 4.4.5 AMPLIFICAÇÃO UTILIZANDO OS INICIADORES EF1-983F E EF1-2218R

Para os isolados identificados como pertencentes ao gênero *Lipomyces* foi feita a amplificação de parte da região que codifica o gene do fator de alongação EF-1 $\alpha$  conforme KURTZMAN; ALBERTYN; BASEHOAR-POWERS, (2007). A PCR foi realizada em um volume final de 50  $\mu\text{L}$  contendo de 1,0 a 5,0  $\mu\text{L}$  de DNA a uma concentração entre 50-500ng/ $\mu\text{L}$ , 1,0  $\mu\text{L}$  de cada iniciador EF1-983F (5' GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT) e EF1-2218R (5' ATGACACCRACRGCRCRGTYTG) a 10  $\mu\text{mol}^{-1}$  (MWG Biotech), 5,0  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR 5X (Sinapse Inc), 3,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25mM, 2,0  $\mu\text{L}$  de dNTP 10 mM, 0,2  $\mu\text{L}$

de Taq DNA polimerase 5U (Sinapse Inc) e o volume final completado com água miliQ. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador PCR Express (Valpo.protect - Eppendorf). As reações de PCR foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida por 10 ciclos de: desnaturação a 94 °C por 2 minutos, anelamento a 66 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. A temperatura de anelamento foi diminuída em um grau a cada ciclo até atingir 57 °C. Na sequência foram realizados 36 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguidos por extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) 1%, em tampão TBE 0,5X, eluídos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. Os géis foram corados com GelRed (Biotium, USA), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em um sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

#### 4.4.6 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Os *amplicons* gerados pela reação de PCR foram purificados por adição de 11,75 µL de EDTA 125 mmolar e 141 µL de etanol absoluto e deixados à temperatura ambiente por 15 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 14.500 xg por 15 minutos e o sobrenadante retirado e descartado por inversão. A seguir, foram adicionados 120 µL de etanol 70% gelado e os tubos foram novamente centrifugados a 13.500 xg por 10 minutos e o etanol retirado por inversão. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente para evaporação de todo o excesso de etanol, sendo deixados para secar overnight. Foram então adicionados 10 µl de água ultrapura estéril em todos os tubos e eles foram incubados por 30 minutos a 37°C. O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) e diluído para atingir concentração entre 5 e 20 ng/ µl e estocado a -20°C.

#### 4.4.7 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Para as reações de sequenciamento foram utilizados 5-20ng do DNA purificado. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 6 µL de água ultrapura, 1 µL do BigDye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) 1 µL do tampão de sequenciamento do kit, 1 µL do iniciador (5 pmol) e 1 microlitro da amostra. O programa consistiu em uma desnaturação inicial a 96 °C por um minuto, seguido por 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50 °C por cinco segundos e extensão a 60 °C por quatro minutos.

Para precipitação das reações de sequenciamento, 1,0 µL de acetato de amônio 7,5 M e 1 µL de EDTA 125mmol e 50 µL de etanol absoluto (Merck) foram adicionados em cada poço da placa de 96 poços. A placa foi submetida à agitação em *vortex* e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Após período de incubação, a placa foi centrifugada por 45 minutos a 2.272 xg. O sobrenadante foi descartado virando a placa sobre um papel absorvente. Em seguida, foram adicionados 150 µL de etanol 70% (Merck). A placa foi novamente centrifugada por 15 minutos a 360 a 2.272 xg e o sobrenadante então descartado. Para remoção do excesso de etanol, a placa foi invertida sobre um papel absorvente, e submetida a um pulso em centrífuga a 115 xg durante um segundo. Em seguida, a placa foi mantida em repouso durante 20-40 minutos, protegida da luz, para evaporação do etanol residual. O DNA das amostras precipitado em cada poço foi ressuspensionado em 10 µL de formamida. A placa foi então submetida à agitação em *vortex* por dois minutos, centrifugada por um segundo a 900 rpm e armazenada a 4°C, protegida da luz, até injeção das amostras. As amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3730, utilizando-se polímero POP7 e no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou.

#### 4.4.8 ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS SEQUÊNCIAS

As sequências de DNA foram submetidas à análise de qualidade utilizando o *Phred quality scores*, disponível no site da Embrapa (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Bases contíguas, com valor de *phred* maior que 20, foram selecionadas e comparadas com as sequências de linhagens tipo ou de linhagens de referência depositadas no GenBank utilizando-se o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) desenvolvido pelo National Center For Biotechnology (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

#### 4.5 Análises de diversidade

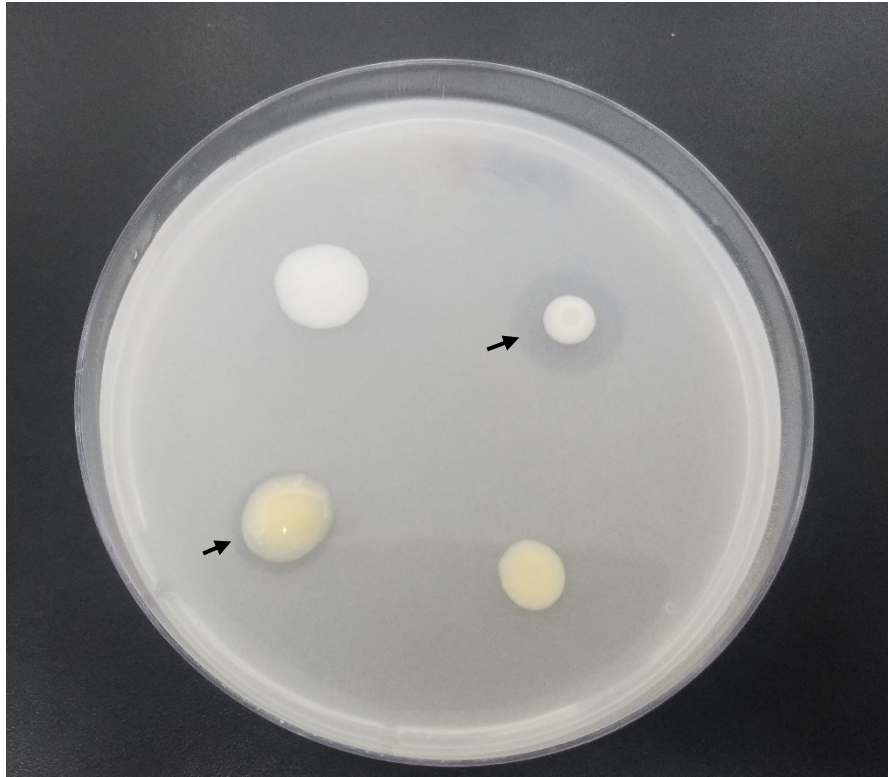
A riqueza, diversidade de Shannon e diversidade de Simpson foram calculadas com o pacote iNEXT (CHAO *et al.*, 2014; HSIEH; MA; CHAO, 2016). Curvas integradas de rarefação/ extrapolação nos números de Hill: q=0 (riqueza de espécies); q=1 (índice de Shannon) e q=2 (diversidade de Simpson) e os intervalos de 95% de confiança (método de *bootstrap*) correspondentes também foram construídas com o pacote iNEXT. Neste caso, quando não há sobreposição dos intervalos de 95% de confiança para os números de Hill entre as partições em cada população pode-se afirmar que os valores são significativamente diferentes (com valor de p <0,05). Na ordem de diversidade q=0 (riqueza), as espécies raras possuem o

mesmo peso que as espécies abundantes, uma vez que a riqueza é insensível à frequência das espécies. A diversidade de Shannon ( $q=1$ ) dá mais peso às espécies raras e a diversidade de Simpson ( $q=2$ ) às espécies mais frequentes e abundantes (JOST, 2006). A rarefação estima o número de espécies de cada comunidade após igualar o esforço amostral, o que reduz as chances de sub ou superestimativas de resultados gerados por desigualdade de amostras, variações na coleta ou insuficiência amostral. Diagramas de Venn foram construídos para mostrar a similaridade das comunidades em relação aos sítios de coleta, temperaturas de isolamento e coletas realizadas. Análise da composição e partição da diversidade foi realizada com os pacotes *vegan*, *betapart* (abordagem Baselga) e *entropart*. A dissimilaridade da diversidade beta foi dividida em dois componentes: dissimilaridade devido à substituição de espécies (*turnover*) e dissimilaridade devido ao aninhamento (*nestedness*). A singularidade ecológica foi calculada pelos índices LCBD e SCBD através da função *beta.div* (LEGENDRE; DE CÁCERES, 2013). Todas as análises de diversidade foram realizadas no software RStudio Team (2020).

#### **4.6 Testes enzimáticos e teste de solubilização de fosfato**

Os isolados foram qualitativamente testados quanto à produção extracelular das enzimas amilase, celulase, esterase, lipase, pectinase, protease, tanase e xilanase conforme (BUZZINI; MARTINI, 2002; KUMAR *et al.*, 2010; SANYAL *et al.*, 2020). A produção dessas enzimas foi avaliada pela medição do diâmetro do halo de degradação formado em torno das colônias crescidas em meio com o substrato alvo do teste. Para todos os testes as leveduras foram cultivadas em estufa, primeiramente em meio YM por 2 dias a 25 °C. Após o crescimento, com auxílio de uma alça microbiológica esterilizada, uma porção da colônia foi suspendida em 2 ml de água destilada autoclavada, até a obtenção de turbidez correspondente à escala de *MacFarland* nº 2. Cinco microlitros desta suspensão celular foram inoculados, com auxílio de pipeta, em meios específicos para cada enzima. Foi realizada a inoculação de quatro isolados por placa, conforme ilustrado pela figura 9. As placas foram incubadas em estufa por 7 dias a 25 °C. Após o período de incubação foi medido o tamanho dos halos formados e das colônias.

Figura 9 - Inoculação de leveduras para os testes de solubilização de fosfato. A imagem corresponde ao teste de solubilização de fosfato após 7 dias de incubação. O teste é considerado positivo quando há a presença de um halo mais claro ao redor da colônia (setas).



O teste de produção de amilase foi realizado em meio de cultura composto por amido como única fonte de carbono [2% amido solúvel (Sigma, origem: batata), 0,67% de YNB e 2% de ágar, pH 6]. Para a verificação da produção de amilase, após 7 dias de incubação, as placas foram coradas com solução de lugol (0,1% I<sub>2</sub> e 1% KI) por 5 minutos e em seguida, lavadas com água deionizada. Posteriormente foi avaliada a presença de um halo amarelado. A presença do halo evidenciou atividade amilolítica positiva.

A produção de celulase foi avaliada em meio com carboximetilcelulase (1% CMC, 0,67% YNB, 0,05% celobiose, 1,5% ágar). Após sete dias de incubação as placas foram coradas com solução de vermelho congo (1g/L) por 15 minutos. Após esse período as placas foram lavadas com água deionizada, sendo então adicionado NaCl (1M). A observação de halo indica atividade celulósica positiva.

Para avaliar a produção de esterase foi utilizado meio com Tween 80 (peptona 1%, NaCl 0,5%, CaCl<sub>2</sub> 0,01%, Tween 80 1%, ágar 2%, pH 6,8). A atividade da esterase foi avaliada pelo aparecimento de um halo opaco (precipitado) ao redor da colônia, após 7 dias de incubação.

A produção de lipase foi avaliada em meio com butirina como fonte de carbono (peptona 0,5%, extrato de levedura 0,3% tributyrin 1% ágar 1,5%, pH 6,0). A atividade lipolítica foi avaliada pelo aparecimento de um halo claro ao redor da colônia, após 7 dias de incubação.

O teste de produção de pectinase foi realizado em meio de cultura composto por pectina cítrica como única fonte de carbono (pectina 1%, YNB 0,67% e ágar 2%, pH 7). Para verificar a atividade pectinolítica, após o crescimento das colônias (7 dias de incubação), as placas foram coradas com solução de vermelho de rutênio (*ruthenium red*, 0,1%) por 1 hora. Após este período a placa foi lavada com água deionizada. A formação de halo arroxeadado ao redor das colônias indica atividade positiva.

A produção de proteases foi avaliada em meio com caseína como substrato (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%, caseína 2%, ágar 2%, pH 6,5). Um teste positivo é evidenciado pelo aparecimento de um halo claro ao redor da colônia, após 7 dias de incubação.

O teste de produção de tanase foi realizado em placas contendo ácido tânico 5%,  $\text{NaN}_3$ , 0,3%;  $\text{KH}_2\text{P}_4$  0,1%,  $\text{MgSO}_4$  0,1%. 0,5; KCl 0,05%;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,001%; ágar 3%, pH 5. O teste positivo é evidenciado pela presença de um halo claro ao redor da colônia.

Para o teste de produção de xilanase, a xilana foi utilizada como única fonte de carbono (xilana 1%, YNB 0,67% e ágar 2%). Após sete dias de incubação as placas foram coradas com solução de lugol (0,1%  $\text{I}_2$  e 1% KI) por 15 minutos, e lavadas com água deionizada. Em seguida, foi avaliada a presença de um halo claro ao redor da colônia, cuja detecção evidencia atividade xilanolítica positiva.

A solubilização de fosfato foi testada com base em uma formação de halo claro no meio de ágar de Pikovskaya (extrato de levedura 0,05%; glicose 1,0%; fosfato de cálcio 0,5%; sulfato de amônio 0,05%; cloreto de potássio 0,02%; sulfato de magnésio 0,01%; sulfato de manganês 0,00001%; sulfato ferroso 0,00001%; ágar 1,5%). (PIKOVSKAYA, 1948; XIAO *et al.*, 2013) após 7 dias de incubação a 25°C.

## **4.7 Caracterização morfológica e fisiológica das espécies novas**

### **4.7.1 TESTES DE ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO EM MEIO SÓLIDO**

A capacidade dos isolados de leveduras de crescer aerobiamente utilizando determinado composto como única fonte de carbono foi avaliada em meio sólido pela metodologia de réplica conforme (KURTZMAN *et al.*, 2011). Uma série de placas, cada uma contendo 0,5% da fonte de carbono testada (glicose, galactose, l-sorbose, maltose, sacarose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, melizitose, inulina, amido solúvel, d-xilose, l-arabinose, d-arabinose, d-ribose, l-

raminose, glicerol, eritritol, adonitol, sorbitol, d-manitol, sorbitol, salicina, dl-lactato, succinato, citrato de sódio, m-inositol, metanol, hexadecano, glucosamina, xilitol, gluconato, n-acetilglucosamina, etanol, acetona, acetato de etila e isopropanol; e 1% para rafinose) em um meio basal (YNB 0,67%, ágar 2%) foi inoculada utilizando-se um inoculador multiponto. Para os testes de assimilação de nitrogênio foi utilizado um meio basal (YCB 1,17%, ágar 2%) acrescido de nitrito (nitrito de sódio 0,026%), nitrato (nitrato de potássio 0,078%) ou lisina (0,056%). A capacidade de crescimento em alta pressão osmótica foi avaliada em meio contendo glicose (glicose 50%, extrato de levedura 0,1%, ágar 2%) e cloreto de sódio (NaCl 10%, glicose 5%, YNB 0,67%). A capacidade de produção de ácido foi testada a partir da solubilização do carbonato de cálcio em meio sólido (glicose 5%, CaCO<sub>3</sub> 0,5%, extrato de levedura 0,5%, ágar 2%), evidenciada pela formação de halo claro ao redor do crescimento celular. A resistência à cicloheximida foi testada em meio sólido (YNB 0,67%, glicose 0,5%, ágar 2%) acrescido de 0,01% de cicloheximida. A tolerância ao ácido acético foi testada em meio sólido (glicose 10%, peptona 1%, extrato de levedura 1%, ágar 2%) contendo 1% de ácido acético. A termotolerância dos isolados foi testada em placas de meio ágar Sabouraud dextrose (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, ágar 2%) incubadas a 37 e 40 °C. Para todos os testes, foi realizada inoculação de suspensão (escala de MacFarland nº 2) de células jovens de levedura (24 horas de crescimento) em água destilada esterilizada, utilizando-se um inoculador multipontos. Os resultados foram lidos após 7, 14 e 21 dias de incubação e comparados com resultados de placas controle formadas por placas com o meio basal sem as fontes de carbono ou nitrogênio.

#### 4.7.2 TESTES DE ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO EM MEIO LÍQUIDO

Quando necessário, os testes de assimilação de carbono e nitrogênio e os testes de resistência e termotolerância foram realizados em microplacas de 96 poços, em meio líquido. As formulações dos meios foram as mesmas dos testes em meio sólido, com exceção da adição de ágar. Cada poço da microplaca foi preenchido com 100 ul de meio teste. O inóculo consistiu de 50 ul de uma suspensão celular (padrão MacFarland nº 2), inoculada na microplaca com auxílio de pipeta multicanal. As microplacas foram incubadas a 25 °C por 10 dias e lidas após 1, 3, 5, 7 e 10 dias de incubação em leitor de microplacas a 405 nm. Para os testes de termotolerância, as microplacas foram incubadas a 37 e 40°C.



#### 4.7.3 MEDIÇÃO DAS CÉLULAS E FORMAÇÃO DE PSEUDOHIFAS

Após crescimento em meio YM incubado a 25°C por três dias, as células de leveduras foram fotografadas e mediadas com o auxílio de microscópio Leica DM750 e *software Leica Application Suite*. A formação de hifas e/ou pseudohifas foi avaliada pelo crescimento das células em meio *cornmeal* (infusão filtrada de fubá a 4,5%, ágar 1,5%) ou 5% de malte (extrato de malte 5%, ágar 2%) e visualização em microscópio.

#### 4.7.4 TESTES DE REPRODUÇÃO SEXUADA

Para as possíveis espécies novas de levedura, a indução da reprodução sexuada foi realizada em meios de cultura descritos em (KURTZMAN *et al.*, 2011).

### 4.8 Teste de predação de linhagem de *Saccharomyopsis*

A capacidade de predação de linhagens de *Saccharomyopsis* sp. foi testada frente a isolados de *S. cerevisiae* de origem ambiental e de tanques de fermentação de cachaça. As linhagens UFMG-CM-Y7149 (origem ambiental), CAY1007 e CAY1006 (tanque de fermentação) foram utilizadas como alvo de predação. Um meio sem adição de aminoácidos (YNB w/o aa 0,67%, glicose 2% ágar 2%) foi utilizado como substrato para o teste de predação (JUNKER *et al.*, 2018). As linhagens UFMG-CM-Y6632 e UFMG-CM-Y6898 da possível espécie nova de *Saccharomyopsis* e as linhagens alvo foram crescidas em meio YM por 24 horas a 25 °C. Uma alçada de cada cultura (possível predador e alvo) com quantidade equivalente de células foi misturada no meio teste e essas placas foram incubadas a 25°C. As misturas foram examinadas periodicamente em microscópio para formação de *pegs* de penetração das células alvo. Fotografias foram registradas com o microscópio Leica DM750 e *software Leica Application Suite*.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 RPPN Santuário do Caraça

Na RPPN Santuário do Caraça foram realizadas seis coletas no período entre junho de 2017 e agosto de 2018. Um total de 370 isolados de leveduras foi obtido, distribuído em 111 espécies distintas. Dessas, 72 espécies pertencem ao Filo Ascomycota, 28 ao Filo Basidiomycota e 11 são considerados *yeast-like* (fungos filamentosos com aparência de colônias de leveduras). A comunidade de leveduras recuperada apresenta predomínio de singletos, com 62 espécies representadas por apenas 1 isolado (56% de toda a comunidade). Dentre as leveduras ascomicéticas, as mais frequentes foram a possível nova espécie *Candida* sp.1 (clado *C. thaimueangensis*), com 27 isolados e abundância relativa de 7,3% e *Schwammniomyces polymorphus*, com 24 isolados e abundância relativa de 6,6% (tabela 1). As espécies *Papiliotrema flavescens*, *P. laurentii*, *Rhodotorula nothofagi* e *Apiotrichum xylopinii* foram as leveduras basidiomicéticas mais frequentemente isoladas. Juntas representam 56% de todas as leveduras basidiomicéticas encontradas. Dentre essas três espécies basidiomicéticas, *P. flavescens* foi a única que apresentou uma abundância relativa maior que 5% (5,41%). Espécies de fungos leveduriformes ou *yeast-like* também foram isoladas, e o gênero mais frequente foi *Coniochaeta* (57% de todos os *yeast-like*). Juntas, todas as espécies de *yeast-like* representam 3,8% da comunidade de leveduras amostrada. Trinta e cinco espécies possivelmente novas foram isoladas e representam 21% do total de isolados e 32% do total de espécies. Seguindo a distribuição geral das espécies, a maioria das espécies novas pertence ao Filo Ascomycota (64 isolados e 24 espécies), seguida de Basidiomycota (nove isolados, sete espécies) e *yeast-like* (quatro isolados e quatro espécies).

Tabela 1 - Leveduras isoladas de amostras de solo coletadas na RPPN Santuário do Caraça por metodologia de enriquecimento em meio líquido Yeast Nitrogen Base com 8% de glicose.

| Espécie  | Sítio de coleta |              |             | Total de isolados | Frequência relativa (%) |
|--|-----------------|--------------|-------------|-------------------|-------------------------|
|  | Alagado (n=30)  | Campo (n=30) | Mata (n=30) |                   |                         |
| <b>Ascomycota</b>  |                 |              |             |                   |                         |
| <i>Barnettozyma californica</i>                              | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida albicans</i>                                      | 4               | 2            | 1           | 7                 | 1,89                    |
| <i>Candida argentea</i>                                      | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida blattae</i>                                       | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida boidinii</i>                                      | 1               | 0            | 2           | 3                 | 0,81                    |
| <i>Candida carpophila</i>                                    | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida glabrata</i>                                      | 1               | 0            | 1           | 2                 | 0,54                    |
| <i>Candida intermedia</i>                                    | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida maltosa</i>                                       | 0               | 2            | 0           | 2                 | 0,54                    |
| <i>Candida margitis</i>                                      | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida melibiosica</i>                                   | 0               | 6            | 4           | 10                | 2,70                    |
| <i>Candida middelhoveniana</i>                               | 0               | 1            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida oleophila</i>                                     | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida orthopsilosis</i>                                 | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida palmioleophila /Candida fluviatilis</i>           | 0               | 0            | 2           | 2                 | 0,54                    |
| <i>Candida parapsilosis</i>                                  | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida pseudointermedia</i>                              | 1               | 1            | 0           | 2                 | 0,54                    |
| <i>Candida pseudolambica</i>                                 | 2               | 0            | 0           | 2                 | 0,54                    |
| <i>Candida quercitrusa</i>                                   | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida railenensis</i>                                   | 3               | 8            | 3           | 14                | 3,78                    |
| <i>Candida solani</i>  | 7               | 1            | 2           | 10                | 2,70                    |
| <i>Candida</i> sp. 1 (próxima a <i>C. thaimueangensis</i> )  | 4               | 14           | 9           | 27                | 7,30                    |
| <i>Candida</i> sp. 2 (basal em Saccharomycetales)            | 2               | 0            | 3           | 5                 | 1,35                    |
| <i>Candida</i> sp. 3 (próxima a <i>C. californica</i> )      | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida</i> sp. 4 (próxima a <i>C. ubatubensis</i> )      | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida</i> sp. 5 (próxima a <i>C. pseudointermedia</i> ) | 0               | 1            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida</i> sp. 6 (próxima a <i>P. scutulata</i> )        | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida</i> sp. 7 (próxima a <i>C. quercuum</i> )         | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida</i> sp. 8 (próxima a <i>C. picinguabensis</i> )   | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida</i> sp. 9 (próxima a <i>C. bentonensis</i> )      | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida</i> sp. 10 (próxima a <i>C. inulinophila</i> )    | 0               | 1            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Candida vartiovaarae</i>                                  | 0               | 1            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Clavispora</i> sp. (próxima a <i>C. asparagi</i> )        | 0               | 1            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i>                                | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Cyberlindnera subsufficiens</i>                           | 9               | 5            | 0           | 14                | 3,78                    |
| <i>Galactomyces</i> sp. (próxima a <i>G. europaeum</i> )     | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Geotrichum candidum</i>                                   | 0               | 2            | 0           | 2                 | 0,54                    |
| <i>Geotrichum</i> sp. 1 ( <i>G. vulgare</i> )                | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i>                                  | 1               | 2            | 1           | 4                 | 1,08                    |
| <i>Hanseniaspora uvarum /clermontiae</i>                     | 3               | 0            | 1           | 4                 | 1,08                    |

| Espécie  | Sítio de coleta |              |             | Total de isolados | Frequência relativa (%) |
|--|-----------------|--------------|-------------|-------------------|-------------------------|
|  | Alagado (n=30)  | Campo (n=30) | Mata (n=30) |                   |                         |
| <i>Hanseniaspora valbyensis</i>                                  | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Kazachstania barnettii</i>                                    | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Kazachstania exigua</i>                                       | 1               | 0            | 1           | 2                 | 0,54                    |
| <i>Kazachstania rupicola</i>                                     | 1               | 1            | 0           | 2                 | 0,54                    |
| <i>Kazachstania saulgeensis</i>                                  | 5               | 0            | 2           | 7                 | 1,89                    |
| <i>Kazachstania</i> sp. 1 (próxima a <i>K. exigua</i> )          | 1               | 3            | 0           | 4                 | 1,08                    |
| <i>Kazachstania</i> sp. 2 (próxima a <i>K. solicola</i> )        | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Kazachstania turicensis</i>                                   | 2               | 0            | 0           | 2                 | 0,54                    |
| <i>Kodamaea ohmeri</i>   | 4               | 0            | 1           | 5                 | 1,35                    |
| <i>Kurtzmaniella</i> sp. 1 (próxima a <i>C. palmioleophila</i> ) | 0               | 0            | 3           | 3                 | 0,81                    |
| <i>Limtongozyma cylindracea</i>                                  | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Metschnikowia</i> sp. 1 (próxima a <i>C. bromeliacearum</i> ) | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Metschnikowia</i> sp. 2 (próxima a <i>C. tolerans</i> )       | 0               | 1            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Meyerozyma guilliermondii</i>                                 | 0               | 1            | 1           | 2                 | 0,54                    |
| <i>Nakaseomyces</i> sp. (próxima a <i>C. uthaitanina</i> )       | 1               | 0            | 4           | 5                 | 1,35                    |
| <i>Nakazawaea ishiwadae</i>                                      | 2               | 0            | 0           | 2                 | 0,54                    |
| <i>Nakazawaea</i> sp. (próxima a <i>N. holstii</i> )             | 0               | 1            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Pichia kluyveri</i>   | 0               | 0            | 3           | 3                 | 0,81                    |
| <i>Pichia</i> sp. (próxima a <i>P. fermentans</i> )              | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Saccharomycopsis vini</i>                                     | 0               | 1            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Saturnispora serradocipensis</i>                              | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Saturnispora silvae</i>                                       | 1               | 1            | 0           | 2                 | 0,54                    |
| <i>Scheffersomyces shehatae</i>                                  | 1               | 1            | 0           | 2                 | 0,54                    |
| <i>Scheffersomyces queiroziae</i>                                | 0               | 1            | 1           | 2                 | 0,54                    |
| <i>Schwanniomyces polymorphus</i>                                | 4               | 1            | 19          | 24                | 6,49                    |
| <i>Schwanniomyces vanrijiae</i>                                  | 0               | 3            | 4           | 7                 | 1,89                    |
| <i>Sugiyamaella smithiae</i>                                     | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Wickerhamomyces arborarius</i>                                | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Wickerhamomyces</i> sp. (próxima a <i>W. strasburgensis</i> ) | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Williopsis</i> sp.  | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Yamadazyma</i> sp. (próxima a <i>C. vrieseae</i> )            | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Zygorulasporea florentina</i>                                 | 0               | 0            | 2           | 2                 | 0,54                    |
| <b>Basidiomycota</b>   |                 |              |             |                   |                         |
| <i>Apiotrichum laibachii</i>                                     | 0               | 1            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Apiotrichum porosum</i>                                       | 1               | 3            | 5           | 9                 | 2,43                    |
| <i>Apiotrichum wieringae</i>                                     | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Apiotrichum xylopinii</i>                                     | 9               | 2            | 6           | 17                | 4,59                    |
| <i>Curvibasidium cygneicollum</i>                                | 0               | 1            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Cystofilobasidium capitatum</i>                               | 2               | 0            | 0           | 2                 | 0,54                    |
| <i>Cystofilobasidium macerans</i>                                | 0               | 1            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Hannaella pagnoccae</i>                                       | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |

| Espécie   | Sítio de coleta |              |             | Total de isolados | Frequência relativa (%) |
|---|-----------------|--------------|-------------|-------------------|-------------------------|
|   | Alagado (n=30)  | Campo (n=30) | Mata (n=30) |                   |                         |
| <i>Leucosporidium scottii</i>                                   | 0               | 0            | 2           | 2                 | 0,54                    |
| <i>Papiliotrema flavescens</i>                                  | 5               | 10           | 5           | 20                | 5,41                    |
| <i>Papiliotrema laurentii</i>                                   | 13              | 5            | 0           | 18                | 4,86                    |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 1 (próxima a <i>P. fuscus</i> )         | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 2 (próxima a <i>P. leoncinii</i> )      | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 3 (próxima a <i>P. laurentii</i> )      | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Phaffia brasiliiana</i> sp. nov.                             | 1               | 1            | 1           | 3                 | 0,81                    |
| <i>Pseudohyphozyma bogoriensis</i>                              | 0               | 0            | 2           | 2                 | 0,54                    |
| <i>Rhodotorula nothofagi</i>                                    | 2               | 6            | 10          | 18                | 4,86                    |
| <i>Rhodotorula glutinis</i>                                     | 5               | 0            | 0           | 5                 | 1,35                    |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>                                 | 4               | 2            | 1           | 7                 | 1,89                    |
| <i>Rhodotorula pacifica</i>                                     | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Rhodotorula</i> sp. (próxima a <i>Rh. mucilaginosa</i> )     | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Rhodotorula taiwanensis</i>                                  | 3               | 0            | 0           | 3                 | 0,81                    |
| <i>Rhodotorula toruloides</i>                                   | 5               | 0            | 0           | 5                 | 1,35                    |
| <i>Saitozyma podzolica</i>                                      | 4               | 2            | 0           | 6                 | 1,62                    |
| <i>Sporobolomyces japonicus</i>                                 | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Sporobolomyces</i> sp. (próxima a <i>S. japonicus</i> )      | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Udeniomyces pyricola</i>                                     | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Vishniacozyma</i> sp. (próxima a <i>V. peneaus</i> )         | 0               | 1            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <b>Yeast-like</b>   |                 |              |             |                   |                         |
| <i>Aureobasidium leucospermi</i>                                | 0               | 1            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Coniochaeta angustispora</i>                                 | 1               | 0            | 2           | 3                 | 0,81                    |
| <i>Coniochaeta dendrobiicola</i>                                | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Coniochaeta</i> sp. 1 (próxima a <i>C. fasciculata</i> )     | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Coniochaeta</i> sp. 2 (próxima a <i>C. canina</i> )          | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Coniochaeta</i> sp. 3 (próxima a <i>C. cymbiformispora</i> ) | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Coniochaeta</i> sp. 4 (próxima a <i>C. rhopalochaeta</i> )   | 1               | 0            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Mucor circinelloides f. lusitanicus</i>                      | 0               | 1            | 0           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Mucor inaequisporus</i>                                      | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |
| <i>Pleurostomophora richardsiae</i>                             | 0               | 1            | 1           | 2                 | 0,54                    |
| <i>Xenoacremonium recifei</i>                                   | 0               | 0            | 1           | 1                 | 0,27                    |

Na última coleta realizada, as amostras também foram processadas por metodologia de isolamento direto em meio YM. Nesse processo foram obtidos 12 isolados de leveduras, representando oito espécies diferentes (tabela 2). Por meio dessa metodologia, leveduras foram isoladas apenas dos sítios “alagado” e “campo”. A partir do sítio “mata” o crescimento vigoroso de fungos filamentosos não permitiu o isolamento de colônias leveduriformes. A espécie mais frequente foi *S. podzolica* (33% de frequência relativa), seguida de *P. laurentii* (17%). Nessa

metodologia de isolamento direto foi possível determinar a contagem de leveduras totais por grama de solo, cuja variação foi de  $1,2 \times 10^3$  a  $1,7 \times 10^4$  UFC/g para o sítio “alagado” e  $5,0 \times 10^3$  a  $7,4 \times 10^3$  UFC/g para o sítio “campo”. A maior parte dos isolados obtidos pertence ao Filo Basidiomycota (83%) e o maior número de isolados (75%) foi obtido do sítio “alagado”. Duas possíveis espécies novas foram isoladas a partir dessa metodologia, sendo um isolado de *Candida* sp. 1 (clado *C. thaimueangensis*) e *Rhodotorula* sp (Clado de *R. mucilaginosa*), também com um isolado.

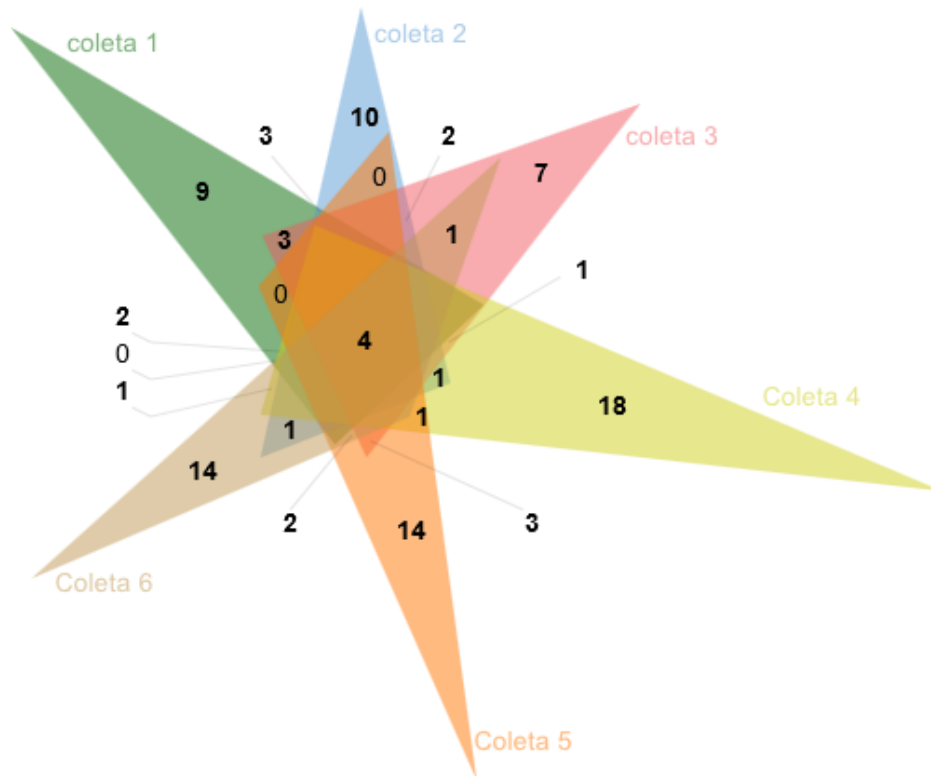
Tabela 2 - Espécies de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas na RPPN Santuário do Caraça por metodologia de isolamento direto em meio YM.

| Espécie   | Sítio de coleta |               | Total de isolados |
|---|-----------------|---------------|-------------------|
|   | Campo (n=5)     | Alagado (n=5) |                   |
| <i>Candida</i> sp. 1 (próxima a <i>C. thaimueangensis</i> ) |                 | 1             | 1                 |
| <i>Cyberlindnera subsufficiens</i>                          |                 | 1             | 1                 |
| <i>Hannaella pagnoccae</i>                                  |                 | 1             | 1                 |
| <i>Papiliotrema laurentii</i>                               | 1               | 1             | 2                 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>                             | 1               |               | 1                 |
| <i>Rhodotorula</i> sp. (próxima a <i>Rh. mucilaginosa</i> ) |                 | 1             | 1                 |
| <i>Rhodotorula toruloides</i>                               |                 | 1             | 1                 |
| <i>Saitozyma podzolica</i>                                  | 1               | 3             | 4                 |

#### 5.1.1 DIVERSIDADE DA COMUNIDADE DE LEVEDURAS ISOLADA DE SOLO NA RPPN SANTUÁRIO DO CARAÇA ENTRE AS DIFERENTES COLETAS REALIZADAS

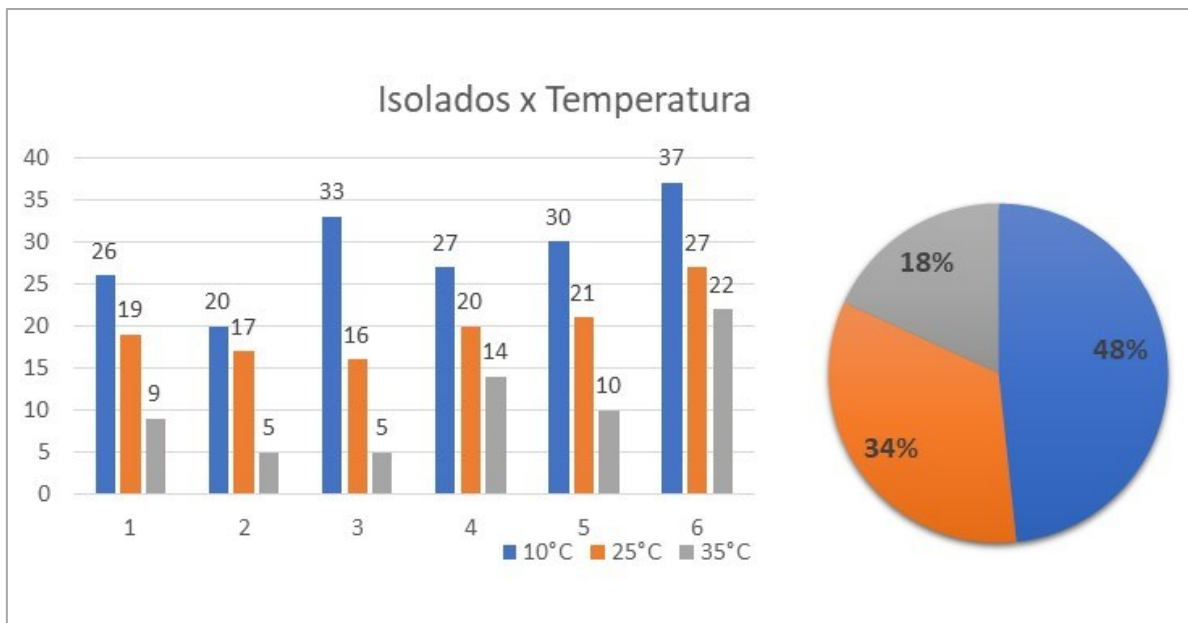
Comparando-se as diferentes coletas, um maior número de isolados e espécies foi observado na sexta coleta (agosto 2018) (figura 10). Em média foram obtidas 33 espécies diferentes e 60 isolados por coleta. Pouco compartilhamento de espécies foi observado e apenas quatro espécies foram isoladas em todas as seis coletas (*Sch. polymorphus*, *Api. xylopinii*, *Candida* sp. 1 e *C. railenensis*). Dezoito espécies foram isoladas somente na coleta c4, 14 espécies nas coletas c5 e c6, 10 na coleta c2, nove na coleta c1 e sete espécies na coleta c3.

Figura 10 – Compartilhamento de espécies de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas na RPPN Santuário do Caraça, em relação às seis diferentes coletas realizadas.



A distribuição dos isolados obtidos em cada coleta, considerando-se a temperatura de isolamento pode ser observada na figura 11. Em média, em cada coleta, foram recuperados 29 isolados a 10°C, 20 isolados a 25°C e 11 isolados a 35°C. A temperatura de 10°C foi a que possibilitou a obtenção do maior número de isolados, representando quase metade de todos os isolados obtidos (48%). O menor número de isolados foi obtido a partir da temperatura de isolamento de 35°C, com 65 isolados, que representam 18% do total.

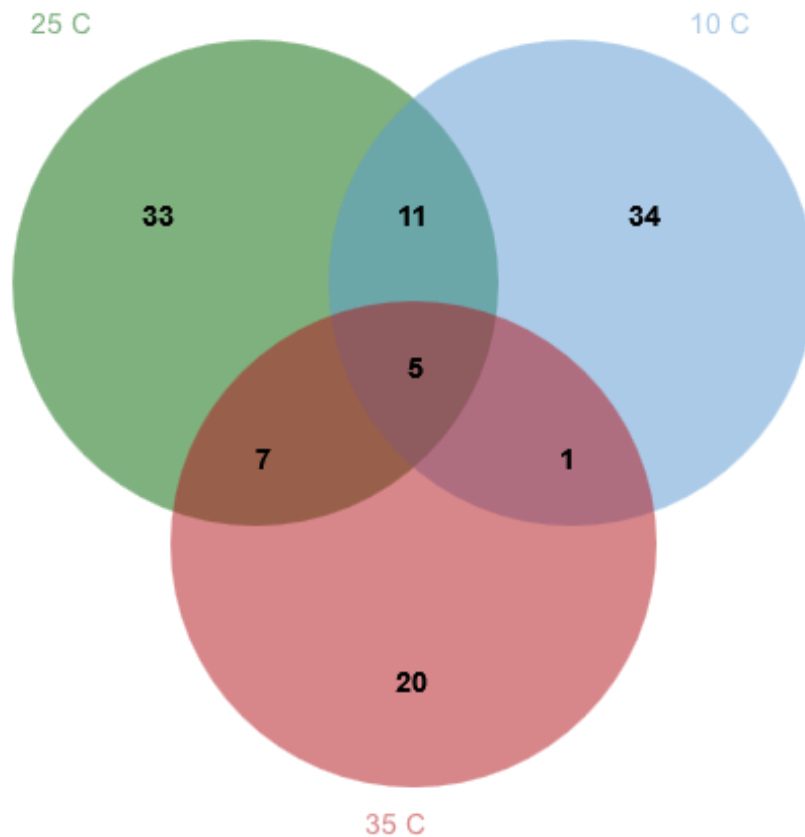
Figura 11 - Distribuição dos isolados obtidos em cada coleta realizada na RPPN Santuário do Caraça, considerando-se a temperatura de isolamento. No eixo x estão representadas as coletas realizadas, numeradas de 1 a 6.



Pouco compartilhamento de espécies foi observado entre as três temperaturas de isolamento testadas, e apenas cinco espécies foram isoladas em todas as três temperaturas (*C. melibiosica*, *Pa. laurentii*, *Rh. mucilaginoso*, *Sch. polymorphus* e *Sch. vanrijiae*) (figura 12). A temperatura de 10°C foi a que apresentou o maior número de espécies isoladas somente nesta temperatura (34 espécies), seguida da 25°C (33 espécies). A temperatura de 35°C apresentou 20 espécies isoladas exclusivamente nessa temperatura, e dentre essas espécies há algumas potencialmente patogênicas (*Candida albicans*, *Pleurostomophora richardsiae* e *Xenoacremonium recifei*). Interessante destacar o isolamento da espécie *Phaffia brasiliensis* sp. nov. com três isolados obtidos apenas a 10°C, nos três diferentes sítios de coleta (SANTOS *et al.*, 2021). Espécies desse gênero são conhecidas apenas de ambientes neárticos e temperados, e em geral não são capazes de crescer em temperaturas superiores a 28°C. O artigo com a descrição dessa espécie está no Apêndice A.



Figura 12 - Compartilhamento de espécies de leveduras isoladas em três diferentes temperaturas a partir de amostras de solo coletadas na RPPN Santuário do Caraça por metodologia de enriquecimento, em relação às seis diferentes coletas realizadas



#### 5.1.2 DIVERSIDADE DA COMUNIDADE DE LEVEDURAS ISOLADA DE SOLO NA RPPN SANTUÁRIO DO CARAÇA ENTRE OS DIFERENTES SÍTIOS DE COLETA

Considerando-se os três sítios de coleta, a maior parte dos isolados de leveduras (38%) foi obtido do sítio “alagado” seguida do sítio mata (35%) e “campo” (27%) (figura 13). Com relação às espécies, 61 foram isoladas do sítio “alagado”, 55 do sítio “mata” e 41 do sítio “campo”. Um baixo compartilhamento de espécies foi observado entre os sítios (figura 14), com apenas 34 espécies compartilhadas por dois ou três dos sítios de coleta. Desse total, apenas 12 espécies foram compartilhadas entre os três sítios de coleta (*Api. porosum*, *Api. xylopinii*, *C. albicans*, *C. railenensis*, *C. solani*, *Candida* sp. 1, *H. uvarum*, *Pa. flavescens*, *Ph. brasiliana* sp. nov., *Rh. nothofagi*, *Rh. mucilaginoso* e *Sch. polymorphus*). Um maior compartilhamento de espécies foi observado entre os sítios “alagado” e “mata”, com 21 espécies compartilhadas.

Figura 13 - Distribuição dos isolados de leveduras obtidos em cada coleta realizada na RPPN Santuário do Caraça, considerando-se o sítio de coleta.

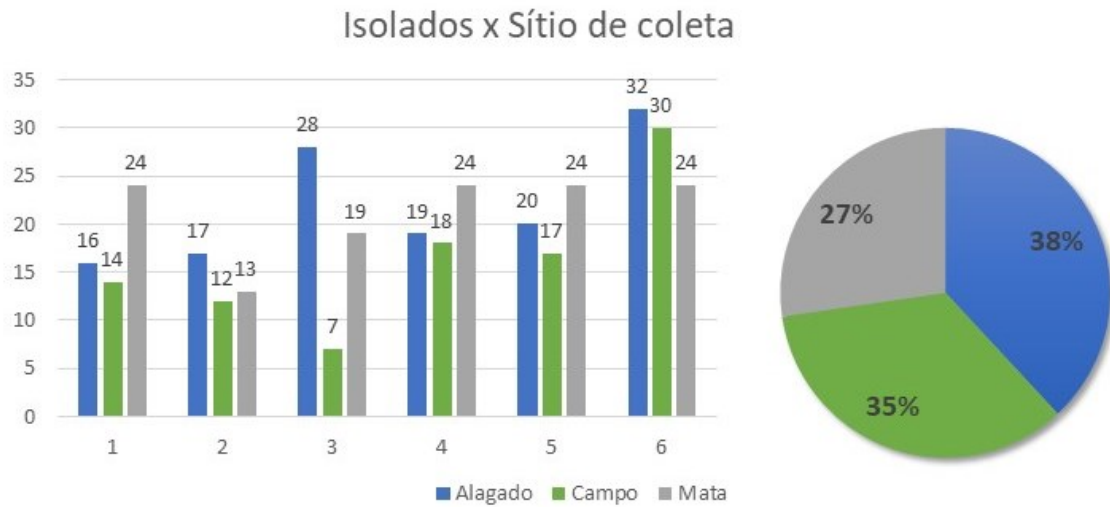
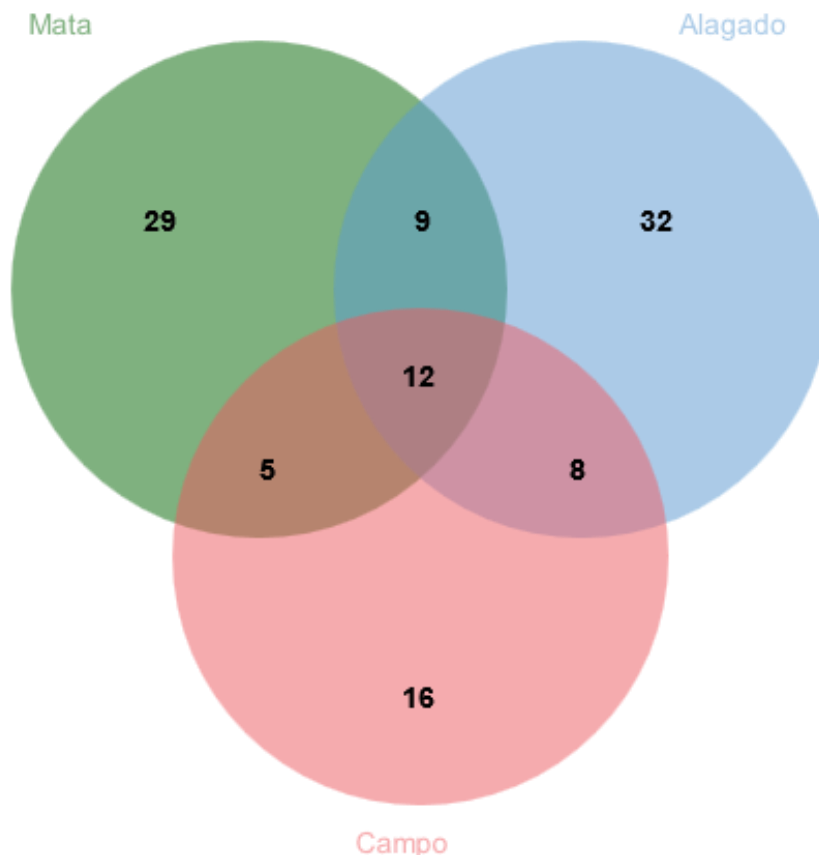


Figura 14 - Compartilhamento de espécies de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas na RPPN Santuário do Caraça por metodologia de enriquecimento, em relação aos sítios de coleta.



### 5.1.3 ANÁLISES DE DIVERSIDADE DA COMUNIDADE DE LEVEDURAS ISOLADA DE SOLO DA RPPN SANTUÁRIO DO CARAÇA

#### 5.1.3.1 Diversidade da comunidade de leveduras de solo da RPPN Santuário do Caraça em relação aos sítios de coleta

Entre os sítios de coleta, o maior valor de diversidade de Shannon foi estimado para a comunidade isolada do sítio “alagado” e o menor valor para a comunidade isolada do sítio “campo” (tabela 7). Dentre os valores obtidos, “alagado” foi o sítio com maior diversidade calculada pelo índice de Shannon, seguido do sítio “mata” e “campo”. Para nenhum dos sítios os valores potenciais de riqueza e diversidade foram atingidos. Devido à sobreposição dos intervalos de confiança de 95% no gráfico gerado pela análise iNEXT, não é possível afirmar que os valores de riqueza, diversidade de Shannon e diversidade de Simpson são estatisticamente diferentes (figura 15). Com relação ao esforço amostral, a maior cobertura foi observada para a comunidade isolada do sítio “campo” (73%) (tabela 8). As coberturas amostrais da comunidade dos sítios “alagado” e “mata” foram iguais. Em nenhum dos sítios a curva de cobertura amostral atingiu a estabilidade (figura 16), o que indica que mais coletas seriam necessárias para se atingir a diversidade total estimada.

Tabela 3 - Valores de riqueza de espécie, diversidade de Shannon e diversidade de Simpson observados e estimados para os diferentes sítios de coleta da RPPN Santuário do Caraça (s.e. = erro padrão; ICMi= intervalo de confiança mínimo; ICMA= intervalo de confiança máximo).

| Sítio            | Diversidade            | Observada | Estimada | s.e. | ICMi | ICMa |
|------------------|------------------------|-----------|----------|------|------|------|
| <b>"alagado"</b> | Riqueza de espécies    | 61        | 211      | 84   | 115  | 477  |
|                  | Diversidade de Shannon | 42        | 79       | 14   | 52   | 106  |
|                  | Diversidade de Simpson | 30        | 38       | 6    | 30   | 49   |
| <b>"campo"</b>   | Riqueza de espécies    | 41        | 102      | 35   | 63   | 214  |
|                  | Diversidade de Shannon | 27        | 45       | 7    | 31   | 58   |
|                  | Diversidade de Simpson | 18        | 21       | 4    | 18   | 29   |
| <b>"mata"</b>    | Riqueza de espécies    | 55        | 142      | 42   | 91   | 269  |
|                  | Diversidade de Shannon | 36        | 61       | 9    | 43   | 79   |
|                  | Diversidade de Simpson | 21        | 25       | 5    | 21   | 34   |

Tabela 4 – Valores de cobertura amostral para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas nos sítios “alagado”, “campo” e “mata” na RPPN Santuário do Caraça.

| Sítio          | Isolados | Riqueza | Cobertura |
|----------------|----------|---------|-----------|
| <b>alagado</b> | 132      | 61      | 0,71      |
| <b>campo</b>   | 98       | 41      | 0,73      |
| <b>mata</b>    | 128      | 55      | 0,71      |

Figura 15 - Riqueza de espécie ( $q=0$ , primeiro quadrante), diversidade de Shannon ( $q=1$ , segundo quadrante) e diversidade de Simpson ( $q=2$ , terceiro quadrante) para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas nos sítios “alagado”, “campo” e “mata” (representado como “*guides*” na figura) na RPPN Santuário do Caraça. As linhas contínua e pontilhada representam valores observados (interpolação) e estimados (extrapolação), respectivamente. A área sombreada corresponde ao intervalo de confiança de 95%. No eixo “x” estão representados os valores de abundância e no eixo “y” os valores de diversidade.

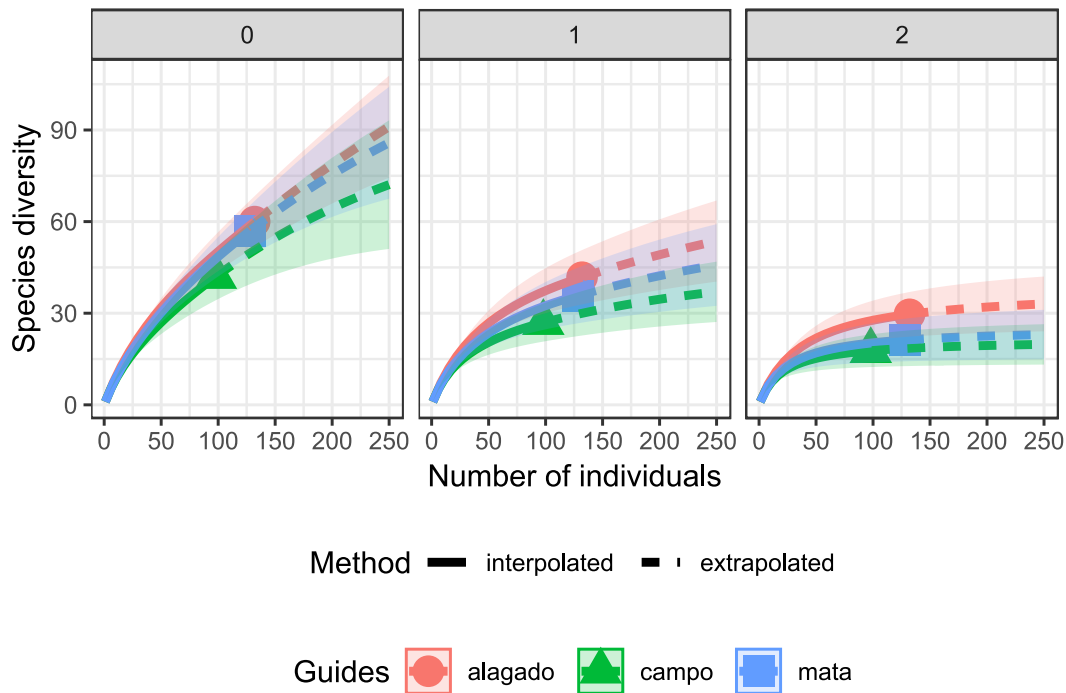
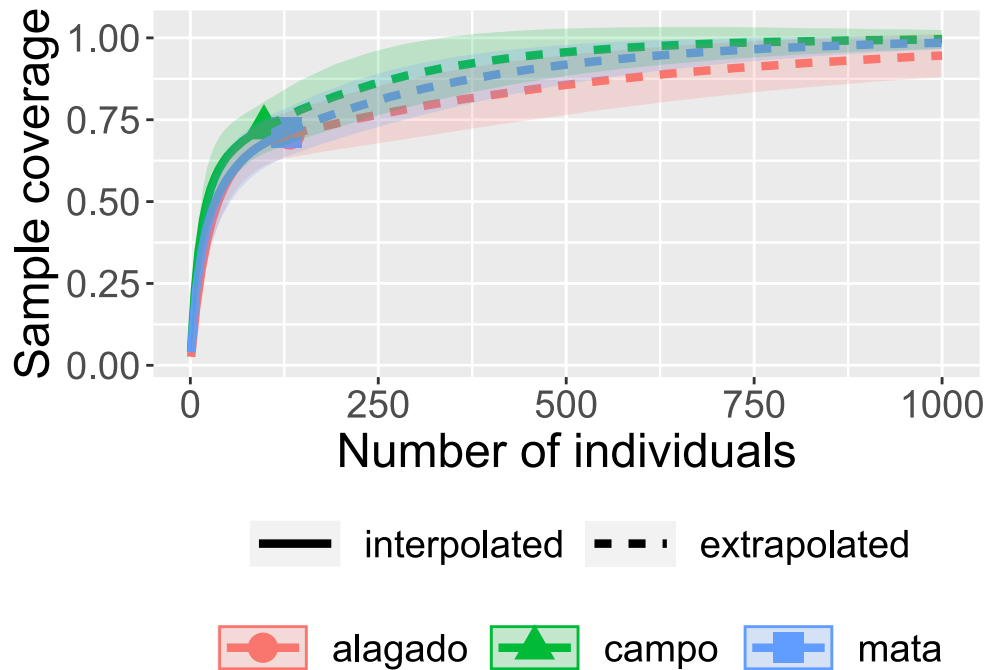


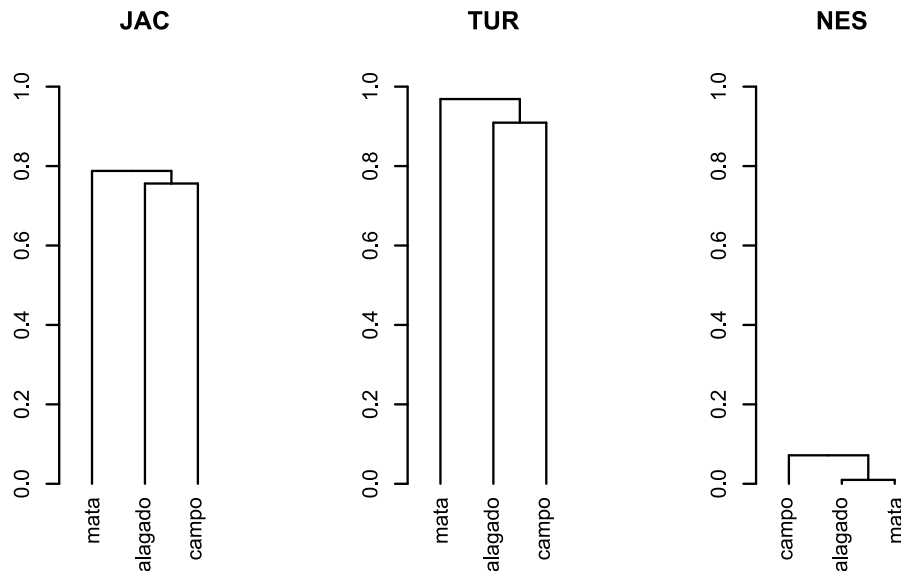
Figura 16 - Curva de acumulação de espécies e suficiência amostral para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas nos sítios “alagado”, “campo” e “mata” na RPPN Santuário do Caraça. As linhas contínua e pontilhada representam valores observados (interpolação) e estimados (extrapolação), respectivamente. A área sombreada corresponde ao intervalo de confiança de 95%. No eixo “x” estão representados os valores de abundância e no eixo “y” os valores de cobertura amostral.



#### 5.1.4 DIVERSIDADE BETA E PARTIÇÃO DA DIVERSIDADE DA COMUNIDADE DE LEVEDURAS ISOLADA DE SOLO NA RPPN SANTUÁRIO DO CARAÇA.

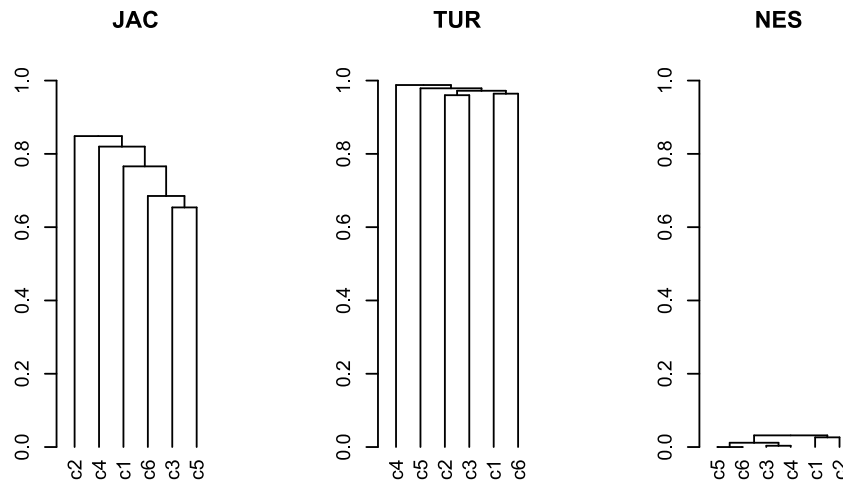
Pela função “beta.multi” é possível ver a proporção da dissimilaridade de cada comunidade que é relativa ao aninhamento (compartilhamento de espécies) e/ ou substituição de espécies (*turnover*). Foi utilizado o índice de Jaccard, que dá mais peso às espécies raras (uma vez que a maior parte das espécies encontrada foi de singletos). Foi encontrada uma dissimilaridade de 81% na comunidade. Desse valor de dissimilaridade, 78,3% são devidos a eventos de substituição de espécies (ou *turnover*) e 3% a eventos de aninhamento (compartilhamento de espécies). Valores par-a-par de substituição e aninhamento estão no apêndice B. Para todas as comunidades ocorreu grande substituição de espécies (mais de 90%) e a maior substituição de espécies foi observada entre as comunidades dos sítios “mata” e “alagado”. O maior valor de aninhamento de espécies foi observado entre as comunidades dos sítios “alagado” e “campo” (7%). A maior dissimilaridade é observada entre as comunidades dos sítios “campo” e “mata”. A figura 17 apresenta graficamente esses eventos de dissimilaridade.

Figura 17 - Dissimilaridade na comunidade de leveduras do solo da RPPN Santuário do Caraça. Dissimilaridade de Jaccard (JAC), substituição de espécies ou turnover (TUR) e aninhamento (NES) entre os sítios de coleta.



A análise da partição da diversidade também foi realizada para as seis diferentes coletas realizadas (figura 18, apêndice C). Uma maior proporção de *turnover* foi observada entre as coletas c2 e c4 e um maior aninhamento entre as coletas c3 e c2. Pelos valores de dissimilaridade de Jaccard, as coletas c3 e c5 são as mais similares. Ainda assim, todas as comunidades apresentaram altos valores de dissimilaridade de Jaccard na comparação par-a-par, e consequentemente altos valores de *turnover*.

Figura 18 - Dissimilaridade na comunidade de leveduras do solo da RPPN Santuário do Caraça. Dissimilaridade de Jaccard (JAC), substituição de espécies ou turnover (TUR) e aninhamento (NES) entre as seis diferentes coletas realizadas.



#### 5.1.5 SINGULARIDADE ECOLÓGICA DA COMUNIDADE DE LEVEDURAS ISOLADA DE SOLO NA RPPN SANTUÁRIO DO CARAÇA.

Com a utilização da função `beta.div` foram calculados os índices de singularidade ecológica LCBD (*Local Contribution to Beta diversity*, em tradução livre: Contribuição dos Locais para a Diversidade Beta) e SCBD (*Species Contribution to Beta Diversity*; em tradução livre: Contribuição das Espécies para a Diversidade Beta). A LCBD representa o quão singular é a composição de uma unidade amostral de uma comunidade em relação às demais. Já a SCBD apresenta a contribuição de cada espécie da unidade amostral para a diversidade beta (LEGENBRE; DE CÁCERES, 2013). Valores elevados de LCBD podem indicar locais com altos valores riqueza de espécies ou composição pouco usual da estrutura da comunidade, o que por sua vez indica interesse para conservação. Baixos valores de LCBD podem indicar locais degradados, com baixa riqueza de espécies, que precisam de ações de recuperação ambiental (LEGENBRE, 2014; LEGENBRE; DE CÁCERES, 2013). Os valores de SCBD calculados variaram entre 0,0035 e 0,04053, e a média foi de 0,0088. Quanto maior for esse valor, mais a espécie contribui para a diversidade beta da comunidade. As espécies que apresentaram valores acima da média estão listadas no apêndice D, juntamente com os valores de SCBD. Considerando esses valores, as 10 espécies que mais contribuíram para a diversidade beta total foram *C. solani*, *K. saulgeensis*, *Pa. flavescens*, *C. melibiosica*, *Api. posorum*, *Cyber. subsufficiens*, *Rh. mucilaginosa*, *Pa. laurentii*, *C. albicans* e *Rh. nothofagi*.

Valores de LCBD foram calculados com base na matriz sítio por espécie e também na matriz coleta por espécie. Esses valores indicam a contribuição de cada sítio de coleta para a diversidade beta total da comunidade. Os resultados de LCBD para os três sítios estão listados na tabela 9, juntamente com o valor de  $p$  do teste estatístico. Nenhum dos sítios de coleta apresentou resultado estatisticamente significativo, ou seja, a composição de espécies de cada sítio contribui igualmente para a diversidade beta da comunidade.

Tabela 5 - Valores de LCBD (Contribuição do Local para a Diversidade Beta) para os sítios de coleta da RPPN Santuário do Caraça.

| Sítio   | LCBD | p-valor |
|---------|------|---------|
| Alagado | 0,35 | 0,35    |
| Campo   | 0,31 | 0,78    |
| Mata    | 0,35 | 0,33    |

A tabela 10 apresenta os valores de LCBD para a matriz coleta por espécies. Estão também listados os valores de  $p$  correspondentes. Os valores de LCBD para as coletas c2 e c4 apresentaram valores significativamente diferentes dos demais e, com base nos valores de LCBD calculados é possível afirmar que essas coletas contribuíram menos que as outras para a diversidade beta total da comunidade. Já as coletas c1, c3, c5 e c6 contribuíram igualmente para a diversidade beta total.

Tabela 6 - Valores de LCBD (Contribuição do Local para a Diversidade Beta) para as diferentes coletas realizadas na RPPN Santuário do Caraça.

| Coleta | LCBD | p-value |
|--------|------|---------|
| c1     | 0,15 | 0,78    |
| c2     | 0,23 | 0,01*   |
| c3     | 0,15 | 0,81    |
| c4     | 0,21 | 0,03*   |
| c5     | 0,14 | 0,91    |
| c6     | 0,12 | 0,98    |

Com o objetivo de verificar a contribuição de cada temperatura de isolamento para a diversidade beta da comunidade, valores de LCBD também foram calculados para a matriz temperatura por espécies. Os valores obtidos, juntamente com os valores de  $p$  correspondentes, estão listados na tabela 11. A comunidade isolada a 35° C apresentou valor estatisticamente diferente dos demais e, com base no valor de LCBD, é possível afirmar que a parcela de



leveduras isoladas nessa temperatura contribuiu mais para a diversidade beta total da comunidade.

Tabela 7 - Valores de LCBD (Contribuição do Local para a Diversidade Beta) para as diferentes temperaturas utilizadas para o isolamento de leveduras do solo da RPPN Santuário do Caraça. Valores marcados com asterisco (\*) representam resultados estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ )

| Temperatura de isolamento | LCBD | p-valor |
|---------------------------|------|---------|
| 10° C                     | 0,35 | 0,33    |
| 25° C                     | 0,28 | 0,99    |
| 35° C                     | 0,38 | 0,05*   |

#### 5.1.6 ESPÉCIES NOVAS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE SOLOS COLETADOS NA RPPN SANTUÁRIO DO CARAÇA

Algumas espécies de leveduras identificadas não apresentaram 100% de identidade no alinhamento das sequências dos domínios D1/D2 do gene do RNA ribossomal em comparação às sequências de espécies conhecidas depositadas no GenBank, sendo consideradas possíveis novas espécies ou mesmo novos gêneros. A partir dos solos coletados na RPPN Santuário do Caraça foram isoladas 30 possíveis espécies novas (24 Ascomycota e 6 Basidiomycota), além da espécie *Phaffia brasiliiana*, descrita a partir de isolados obtidos nesse trabalho. A maior parte das espécies novas é composta por singletos, isto é, espécies representadas por um único isolado. A tabela 12 apresenta os valores de identidade obtidos na comparação entre as sequências das espécies novas com sequências de linhagens tipo depositadas no GenBank. Os códigos de acesso dos depósitos das sequências genéticas dessas espécies possivelmente novas também estão discriminados na mesma tabela.

Algumas das possíveis espécies novas possuem dois ou mais isolados, como a espécie *Candida* sp.1, representada por 28 isolados obtidos por metodologia de isolamento direto (1) e enriquecimento (27). A espécie descrita mais próxima é *Candida thaimueangensis* e há 75 diferenças na comparação das sequências de nucleotídeos dos domínios D1/D2 das duas espécies. *Candida* sp. 2 é representada por 3 isolados e há 50 bases nucleotídicas diferentes na comparação com a sequência da espécie descrita mais próxima, *Candida entomophila*. Duas possíveis novas espécies de *Kazachstania* foram obtidas e *Kazachstania* sp. 1, filogeneticamente próxima a *K. exigua*, possui 4 isolados. Há 6 diferenças na comparação das sequências nucleotídicas dos domínios D1/D2 entre a linhagem tipo de *K. exigua* e *Kazachstania* sp.1. Já entre *Kazachstania* sp. 2 e a espécie descrita mais próxima (*K. solicola*)

há 7 diferenças na comparação das sequências da mesma região. Três isolados de *Kurtzmaniella* sp.1 foram obtidos e a espécie descrita mais próxima é *Candida oleophila*. Na comparação entre as sequências concatenadas dos espaçadores transcritos internos ITS1-5.8S- ITS2 e domínios D1/D2 do gene do RNA ribossomal, entre A linhagem tipo de *C. oleophila* e *Kurtzmaniella* sp.1 há 24 bases nucleotídicas diferentes e 3 gaps. *Nakaseomyces* sp. possui 5 isolados e é filogeneticamente mais próxima a *C. uthaithanina* (14 bases diferentes na comparação de sequências dos domínios D1/D2 do gene do RNA ribossomal). Há várias sequências nucleotídicas idênticas a *Nakaseomyces* sp. depositadas no Genbank, de várias regiões do Brasil e de outros países como Tailândia e Taiwan, indicando que essa espécie possa ter distribuição cosmopolita.

#### 5.1.6.1 *Phaffia brasiliiana* sp. nov.

A espécie *Phaffia brasiliiana* foi descrita com base em três isolados obtidos de amostras de solo coletadas na RPPN Santuário do Caraça. Este é o primeiro relato de ocorrência de espécie do gênero *Phaffia* em região tropical. A capacidade de crescer a 30-32 °C sugere que *P. brasiliiana* é ecologicamente adaptada ao ecossistema de onde foi isolada, uma vez que nenhuma das outras espécies descritas de *Phaffia* é capaz de crescer em temperaturas superiores a 30°C. Além disso, a região de onde *P. brasiliiana* foi isolada apresenta temperatura média anual moderada, de cerca de 20 °C (5 e 15 ° C durante o inverno), e essa temperatura moderada também pode contribuir para a presença da espécie nesse ecossistema. O artigo com a descrição de *Phaffia brasiliiana* está no Apêndice A.

Tabela 8 - Espécies novas isoladas de amostras de solo coletadas na RPPN Santuário do Caraça: espécies descritas mais próximas e valores de identidade na comparação das sequências dos domínios D1/D2 do gene do RNA ribossomal.

| <b>Espécie</b>          | <b>Isolado</b> | <b>Depósito<br/>GenBank</b> | <b>Região</b>  | <b>Espécie mais próxima</b>     | <b>Linhagem</b> | <b>Acesso<br/>GenBank</b> | <b>Identidade</b> | <b>Gaps</b> |
|-------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|---------------------------------|-----------------|---------------------------|-------------------|-------------|
| <b>Ascomycota</b>       |                |                             |                |                                 |                 |                           |                   |             |
| <i>Candida</i> sp. 1    | UFMG-CM-Y6920  | OM321695                    | D1/D2          | <i>Pichia cecembensis</i>       | NRRLY-27985     | AM159112.3                | 477/551(87%)      | 20/551(3%)  |
| <i>Candida</i> sp. 2    | UFMG-CM-Y6910  | OM480737                    | D1/D2          | <i>Candida entomophila</i>      | CBS:6160        | KY106431                  | 270/320(84%)      | 21/320(6%)  |
| <i>Candida</i> sp. 3    | UFMG-CM-Y6900  | OM480681                    | D1/D2 &<br>ITS | <i>Candida californica</i>      | CBS 989         | NG_055093                 | 520/527(99%)      | 0/527(0%)   |
| <i>Candida</i> sp. 4    | UFMG-CM-Y6390  | MH348136                    | D1/D2          | <i>Candida ubatubensis</i>      | CBS:10003       | KY106855                  | 405/464(87%)      | 10/464(2%)  |
| <i>Candida</i> sp. 5    | UFMG-CM-Y7150  |                             | _NL1           | <i>Candida pseudointermedia</i> | CBS:6918        | KY106703                  | 358/418(86%)      | 13/418(3%)  |
| <i>Candida</i> sp. 6    | UFMG-CM-Y6906  | OM480736                    | D1/D2          | <i>Saturnispora bothae</i>      | CBS 13484       | NG_064347                 | 269/326(83%)      | 32/326(9%)  |
| <i>Candida</i> sp. 7    | UFMG-CM-Y6903  | OM480684                    | D1/D2 &<br>ITS | <i>Candida quercuum</i>         | CBS 6422        | MK394135                  | 833/957(87%)      | 36/957(3%)  |
| <i>Candida</i> sp. 8    | UFMG-CM-Y6912  | OM321687                    | D1/D2          | <i>Candida picinguabensis</i>   | CBS:9999        | KY106692                  | 411/473(87%)      | 23/473(4%)  |
| <i>Candida</i> sp. 9    | UFMG-CM-Y6917  | OM321692                    | D1/D2          | <i>Candida bentonensis</i>      | NRRL YB-2364    | AY789653                  | 314/335(94%)      | 3/335(0%)   |
| <i>Candida</i> sp. 10   | UFMG-CM-Y6919  | OM321694                    | D1/D2          | <i>Candida inulinophila</i>     | NBRC 106735     | AB550104                  | 448/512(88%)      | 22/512(4%)  |
| <i>Clavispora</i> sp.   | UFMG-CM-Y7096  | OM321696                    | D1/D2          | <i>Candida asparagi</i>         | CBS:9770        | KY106306                  | 507/521(97%)      | 2/521(0%)   |
| <i>Galactomyces</i> sp. | UFMG-CM-Y7151  |                             | _NL1           | <i>Geotrichum europaeum</i>     | CBS 866.68      | HE663400                  | 513/524(98%)      | 0/524(0%)   |
| <i>Geotrichum</i> sp.   | UFMG-CM-Y6902  | OM480683                    | D1/D2 &<br>ITS | <i>Geotrichum europaeum</i>     | CBS 866.68      | HE663400                  | 541/552(98%)      | 0/552(0%)   |

| Espécie                    | Isolado       | Depósito |             | Espécie mais próxima                  | Linhagem        | Acesso    |                |            |
|----------------------------|---------------|----------|-------------|---------------------------------------|-----------------|-----------|----------------|------------|
|                            |               | GenBank  | Região      |                                       |                 | GenBank   | Identidade     | Gaps       |
| <i>Kazachstania</i> sp. 1  | UFMG-CM-Y7152 |          | _NL1        | <i>Kazachstania exigua</i>            | LZB1            | MH005060  | 488/494(99%)   | 0/494(0%)  |
| <i>Kazachstania</i> sp. 2  | UFMG-CM-Y6916 | OM321691 | D1/D2       | <i>Kazachstania solicola</i>          | CBS:6904        | KY107950  | 418/425(98%)   | 0/425(0%)  |
| <i>Kurtzmaniella</i> sp.   | UFMG-CM-Y6907 | OM480687 | D1/D2 & ITS | <i>Candida palmioleophila</i>         | CBS 7418        | MK394112  | 1131/1155(98%) | 3/1155(0%) |
| <i>Metschnikowia</i> sp. 1 | UFMG-CM-Y6918 | OM321693 | D1/D2       | <i>Candida bromeliacearum</i>         | CBS:10002       | KY106373  | 270/307(88%)   | 10/307(3%) |
| <i>Metschnikowia</i> sp. 2 | UFMG-CM-Y7153 |          | _NL1        | <i>Candida cf. tolerans</i>           | UWO(PS)99-704.2 | AF313364  | 177/184(96%)   | 1/184(0%)  |
| <i>Nakaseomyces</i> sp.    | UFMG-CM-Y7154 |          | _NL1        | <i>Candida uthaithanina</i>           | CBS 10932       | NG_060832 | 499/513(97%)   | 0/513(0%)  |
| <i>Nakazawaea</i> sp.      | UFMG-CM-Y6909 | OM480689 | D1/D2 & ITS | <i>Nakazawaea holstii</i>             | CBS:4140        | KY108638  | 540/547(99%)   | 0/547(0%)  |
| <i>Pichia</i> sp.          | UFMG-CM-Y7155 |          | _NL1        | <i>Pichia bruneiensis</i>             | CBS 12611       | NG_075177 | 468/473(99%)   | 2/473(0%)  |
| <i>Wickerhamomyces</i> sp. | UFMG-CM-Y6913 | OM321688 | D1/D2       | <i>Wickerhamomyces strasburgensis</i> | NRRL Y-2383     | NG_057167 | 524/538(97%)   | 0/538(0%)  |
| <i>Williopsis</i> sp.      | UFMG-CM-Y6905 | OM480686 | D1/D2 & ITS | <i>Cyberlindnera saturnus</i>         | PYCC 2437       | OK342268  | 847/862(98%)   | 5/862(0%)  |
| <i>Yamadazyma</i> sp.      | UFMG-CM-Y6904 | OM480685 | D1/D2 & ITS | <i>Candida vrieseae</i>               | CBS:10829       | KY102517  | 610/632(97%)   | 5/632(0%)  |
| <b>Basidiomycota</b>       |               |          |             |                                       |                 |           |                |            |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 1  | UFMG-CM-Y7156 |          | _NL1        | <i>Papiliotrema miconiae</i>          | CBS 8358        | AF444698  | 553/562(98%)   | 0/562(0%)  |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 2  | UFMG-CM-Y6915 | OM321690 | D1/D2       | <i>Papiliotrema leoncinii</i>         | UFMG-CM-Y374    | KJ608554  | 570/576(99%)   | 1/576(0%)  |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 3  | UFMG-CM-Y7157 |          | _NL1        | <i>Papiliotrema laurentii</i>         | CBS:139         | KY108739  | 450/456(99%)   | 1/456(0%)  |
| <i>Rhodotorula</i> sp.     | UFMG-CM-Y7158 |          | _NL1        | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>       | CBS:316         | KY109056  | 406/411(99%)   | 0/411(0%)  |
| <i>Sporobolomyces</i> sp.  | UFMG-CM-Y6901 | OM480682 | D1/D2 & ITS | <i>Sporobolomyces japonicus</i>       | PYCC 5533       | AY158640  | 544/553(98%)   | 5/553(0%)  |

| <b>Espécie</b>           | <b>Isolado</b>    | <b>Depósito<br/>GenBank</b> | <b>Região</b> | <b>Espécie mais próxima</b>  | <b>Linhagem</b> | <b>Acesso<br/>GenBank</b> | <b>Identidade</b> | <b>Gaps</b> |
|--------------------------|-------------------|-----------------------------|---------------|------------------------------|-----------------|---------------------------|-------------------|-------------|
| <i>Vishniacozyma</i> sp. | UFMG-CM-<br>Y7159 |                             | NL1           | <i>Vishniacozyma peneaus</i> | CBS 2409        | NG_058433                 | 508/513(99%)      | 0/513(0%)   |

## 5.2 Itacoatiara – Amazonas

Em Itacoatiara, estado do Amazonas, foi realizada uma coleta de amostras de solo em quatro sítios diferentes no mês de fevereiro de 2019. Vinte amostras foram coletadas em cada sítio de coleta, totalizando 80 amostras de solo. Os sítios foram denominados “TPI”, de onde foram obtidas amostras de solo de “terra preta indígena”; “UFAM” e “Piquiá”, com amostras de solo de regiões de fitofisionomia típica da floresta amazônica; e “Carú”, com amostras de solo de região de igapó. Duas metodologias de isolamento foram utilizadas, isolamento direto e enriquecimento. Para o isolamento direto foi utilizado um meio rico (YM) e um meio seletivo para leveduras do gênero *Lipomyces* (YNB + cicloheximida). Na metodologia de enriquecimento foi utilizado um meio rico em glicose (YNB + 8% glicose) para as 80 amostras coletadas.

### 5.2.1 COMUNIDADE DE LEVEDURAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE SOLO COLETADAS EM ITACOATIARA – AM POR METODOLOGIA DE ISOLAMENTO POR ENRIQUECIMENTO

Com a metodologia de enriquecimento, em meio YNB + 8% de glicose, um total de 401 isolados de leveduras foi obtido, distribuído em 81 espécies distintas. Dessas, 56 espécies pertencem ao Filo Ascomycota (69%), 21 ao Filo Basidiomycota (26%) e quatro são *yeast-like* (fungos filamentosos com aparência de colônias de leveduras). A comunidade de leveduras obtida apresenta grande prevalência de singletos, com 35 espécies representadas por apenas 1 isolado (43% de toda a comunidade). Dentre as leveduras ascomicéticas, as mais frequentes foram *Sch. polymorphus*, com 37 isolados e abundância relativa de 9,2% e a possível espécie nova *Nakaseomyces* sp., com 34 isolados e abundância relativa de 8,5% (tabela 13). As demais leveduras Ascomycota tiveram abundância relativa menor que 5%. *Papiliotrema laurentii* (60 isolados, abundância relativa de 15%) e *Sa. podzolica* (23 isolados, abundância relativa 5,7%) foram as espécies Basidiomycota mais frequentemente isoladas. Juntas representam 51% de todas as leveduras basidiomicetas encontradas. As demais espécies de Basidiomycota apresentaram uma abundância relativa menor que 5%. Oito isolados de *yeast-like* foram recuperados, e o pertencem aos gêneros *Aureobasidium* (cinco isolados), *Coniochaeta*, *Myriangium* e *Xenoacremonium* (um isolado cada). Juntas, todas as espécies de *yeast-like* representam apenas 2% de abundância na comunidade amostrada. Trinta espécies possivelmente novas foram isoladas e representam 30% do total de isolados e 37% do total de espécies. A maioria das espécies novas pertence ao Filo Ascomycota (24 espécies), seguida de Basidiomycota (cinco espécies) e *yeast-like* (uma espécie).

Tabela 9 - Espécies de leveduras isoladas do solo de diferentes sítios de coleta de Itacoatiara – AM, isoladas por metodologia de enriquecimento em meio líquido (YNB com 8% de glicose).

| Espécie   | Sítio de coleta |        |     |      | Total de isolados | Frequência relativa (%) |
|---|-----------------|--------|-----|------|-------------------|-------------------------|
|   | caru            | piquia | TPI | UFAM |                   |                         |
| <b>Ascomycota</b>   |                 |        |     |      |                   |                         |
| <i>Candida albicans</i>   | 0               | 0      | 0   | 2    | 2                 | 0,5                     |
| <i>Candida blattae</i> ( <i>Clavispora</i> )                    | 0               | 1      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Candida cylindracea</i>                                      | 0               | 0      | 0   | 1    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Candida ghanaensis</i>                                       | 0               | 3      | 0   | 1    | 4                 | 1,0                     |
| <i>Candida intermedia</i> ( <i>Clavispora</i> )                 | 1               | 1      | 0   | 0    | 2                 | 0,5                     |
| <i>Candida leandrae</i> ( <i>Koadamaea</i> )                    | 0               | 0      | 2   | 0    | 2                 | 0,5                     |
| <i>Candida maltosa</i> (clado <i>C. albicans</i> )              | 0               | 2      | 0   | 0    | 2                 | 0,5                     |
| <i>Candida melibiosica</i>                                      | 2               | 0      | 0   | 1    | 3                 | 0,7                     |
| <i>Candida natalensis</i>                                       | 0               | 0      | 0   | 1    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Candida nivariensis</i> ( <i>Nakaseomyces</i> )              | 0               | 0      | 0   | 1    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Candida pseudointermedia</i> ( <i>Clavispora</i> )           | 0               | 2      | 5   | 0    | 7                 | 1,7                     |
| <i>Candida railenensis</i> ( <i>Kurtzmaniella</i> )             | 4               | 1      | 0   | 1    | 6                 | 1,5                     |
| <i>Candida</i> sp. 1 (próxima a <i>C. berkhoutiae</i> )         | 0               | 1      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Candida</i> sp. 2 (próxima a <i>C. inulinophila</i> )        | 1               | 1      | 0   | 0    | 2                 | 0,5                     |
| <i>Candida</i> sp. 3 (próxima a <i>C. haemulonis</i> )          | 1               | 1      | 0   | 1    | 3                 | 0,7                     |
| <i>Candida</i> sp. 4 (próxima a <i>C. californica</i> )         | 0               | 1      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Candida</i> sp. 5 (próxima a <i>C. thaimueangensis</i> )     | 0               | 9      | 0   | 1    | 10                | 2,5                     |
| <i>Candida tropicalis</i>                                       | 0               | 0      | 10  | 0    | 10                | 2,5                     |
| <i>Clavispora</i> sp. 1 (próxima <i>C. pruni</i> )              | 0               | 1      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Clavispora</i> sp. 2 (próxima <i>C. pseudointermedia</i> )   | 0               | 1      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Cyberlindnera subsufficiens</i>                              | 0               | 2      | 0   | 3    | 5                 | 1,2                     |
| <i>Galactomyces citri-aurantii</i>                              | 0               | 0      | 1   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Geotrichum</i> sp. 1 (próxima a <i>G. geotrichum</i> )       | 0               | 7      | 1   | 1    | 9                 | 2,2                     |
| <i>Geotrichum</i> sp. 2 (próximo a <i>G. europaeum</i> )        | 0               | 3      | 4   | 3    | 10                | 2,5                     |
| <i>Geotrichum</i> sp. 3 (próximo a <i>G. pseudocandidum</i> )   | 0               | 0      | 0   | 1    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Groenewaldozyma</i> sp. (próximo a <i>G. auringiensis</i> )  | 0               | 1      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Kazachstania saulgeensis</i>                                 | 0               | 5      | 0   | 0    | 5                 | 1,2                     |
| <i>Kazachstania</i> sp. (próxima a <i>K. servazii</i> )         | 0               | 0      | 0   | 1    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Kazachstania unispora</i>                                    | 0               | 0      | 3   | 0    | 3                 | 0,7                     |
| <i>Martiniozyma asiatica</i>                                    | 0               | 2      | 0   | 0    | 2                 | 0,5                     |
| <i>Metahyphopichia laotica</i>                                  | 0               | 1      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Metschnikowia koreensis</i>                                  | 0               | 2      | 0   | 1    | 3                 | 0,7                     |
| <i>Metschnikowia</i> sp. 1                                      | 0               | 0      | 0   | 1    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Meyerozyma caribbica</i>                                     | 10              | 0      | 9   | 1    | 20                | 5,0                     |
| <i>Nakaseomyces</i> sp. (próxima a <i>C. uthaithanina</i> )     | 8               | 10     | 0   | 16   | 34                | 8,5                     |
| <i>Pichia manshurica</i>  | 0               | 1      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Pichia</i> sp. (próxima a <i>C. californica</i> )            | 0               | 1      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Pichia sporocuriosa</i>                                      | 0               | 0      | 0   | 1    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Pichia terricola</i>   | 0               | 0      | 0   | 2    | 2                 | 0,5                     |
| <i>Saccharomycopsis</i> sp. (próxima a <i>S. crataegensis</i> ) | 0               | 2      | 0   | 0    | 2                 | 0,5                     |
| <i>Saturnispora diversa</i>                                     | 0               | 0      | 0   | 1    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Scheffersomyces amazonensis</i>                              | 0               | 0      | 0   | 3    | 3                 | 0,7                     |
| <i>Schwanniomyces polymorphus</i>                               | 8               | 20     | 1   | 8    | 37                | 9,2                     |
| <i>Schwanniomyces</i> sp. (próxima a <i>S. yamadae</i> )        | 0               | 0      | 0   | 1    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Schwanniomyces vanrijiae</i>                                 | 0               | 2      | 0   | 1    | 3                 | 0,7                     |
| <i>Sugiyamaella smithiae</i>                                    | 0               | 0      | 0   | 2    | 2                 | 0,5                     |

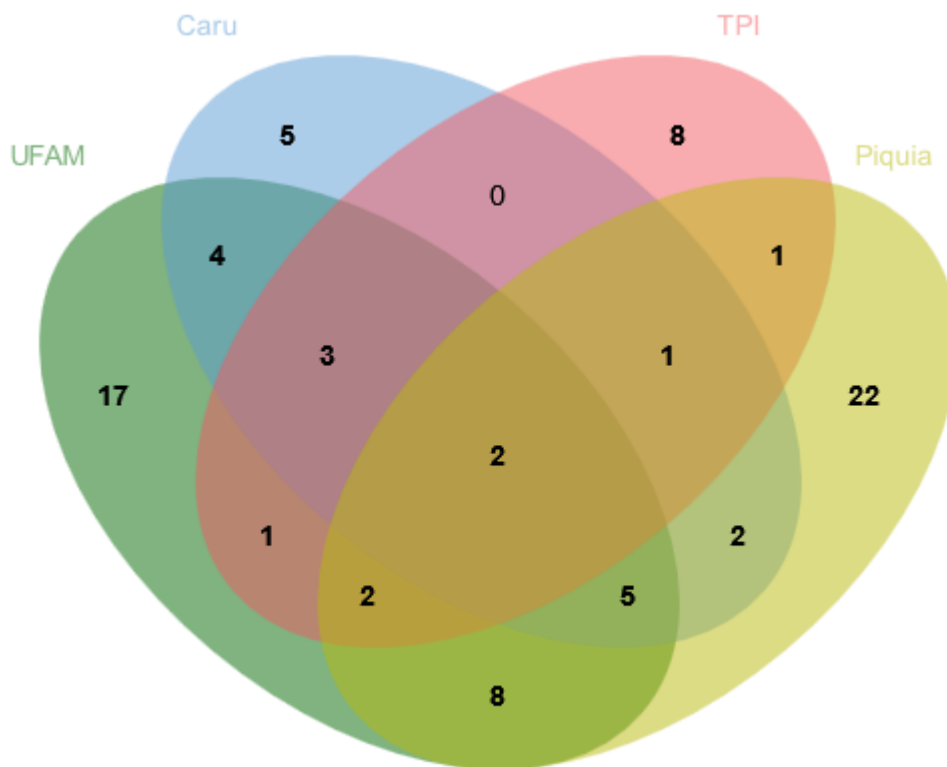
| Espécie   | Sítio de coleta |        |     |      | Total de isolados | Frequência relativa (%) |
|---|-----------------|--------|-----|------|-------------------|-------------------------|
|   | caru            | piquia | TPI | UFAM |                   |                         |
| <i>Sugiyamaella</i> sp. (próxima a <i>S. bonitensis</i> )       | 0               | 1      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Torulaspora indica</i>                                       | 0               | 1      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Torulaspora</i> sp. (próxima a <i>T. quercuum</i> )          | 0               | 1      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Wickerhamiella</i> sp. (próxima a <i>W. musiphila</i> )      | 0               | 1      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Wickerhamomyces lynferdii</i>                                | 2               | 0      | 0   | 0    | 2                 | 0,5                     |
| <i>Wickerhamomyces</i> sp. (próximo a <i>W. pijperi</i> )       | 0               | 1      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Wickerhamomyces sydowiorum</i>                               | 2               | 0      | 0   | 0    | 2                 | 0,5                     |
| <i>Yamadazyma</i> sp. 1 (próxima a <i>C. vrieseae</i> )         | 0               | 9      | 0   | 0    | 9                 | 2,2                     |
| <i>Yamadazyma</i> sp. 2 (próxima a <i>C. songklaensis</i> )     | 0               | 1      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Yamadazyma</i> sp. 3 (próxima a <i>Y. phyllophila</i> )      | 0               | 1      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <b>Basidiomycota</b>  |                 |        |     |      |                   |                         |
| <i>Apiotrichum gamsii</i>                                       | 0               | 3      | 0   | 1    | 4                 | 1,0                     |
| <i>Apiotrichum laibachii</i>                                    | 0               | 1      | 0   | 1    | 2                 | 0,5                     |
| <i>Apiotrichum mycotoxinivorans</i>                             | 1               | 0      | 0   | 1    | 2                 | 0,5                     |
| <i>Apiotrichum coprophilum</i>                                  | 2               | 4      | 0   | 10   | 16                | 4,0                     |
| <i>Apiotrichum sporotrichoides</i>                              | 0               | 0      | 0   | 5    | 5                 | 1,2                     |
| <i>Haglerozyma chiarellii</i>                                   | 0               | 0      | 0   | 1    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Hannaella</i> sp. (próxima a <i>H. zeae</i> )                | 0               | 0      | 1   | 1    | 2                 | 0,5                     |
| <i>Hannaella zeae</i>   | 0               | 0      | 1   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Kwoniella mangrovensis</i>                                   | 6               | 0      | 0   | 1    | 7                 | 1,7                     |
| <i>Papiliotrema flavescens</i>                                  | 0               | 2      | 0   | 2    | 4                 | 1,0                     |
| <i>Papiliotrema laurentii</i>                                   | 12              | 5      | 42  | 1    | 60                | 15,0                    |
| <i>Papiliotrema ruineniae</i>                                   | 0               | 1      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 1 (próxima a <i>P. siamense</i> )       | 0               | 0      | 0   | 1    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 2 (próxima a <i>P. fuscus</i> )         | 0               | 0      | 0   | 2    | 2                 | 0,5                     |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 3 (próxima a <i>P. laurentii</i> )      | 0               | 0      | 1   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 4 (próxima a <i>P. rajasthanensis</i> ) | 0               | 0      | 2   | 0    | 2                 | 0,5                     |
| <i>Rh. mucilaginoso</i>   | 7               | 0      | 9   | 2    | 18                | 4,5                     |
| <i>Rhodosporeidiobolus ruineniae</i>                            | 2               | 0      | 2   | 1    | 5                 | 1,2                     |
| <i>Saitozyma flava</i>  | 0               | 0      | 1   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Saitozyma podzolica</i>                                      | 3               | 4      | 0   | 16   | 23                | 5,7                     |
| <i>Vanrija humicola</i>   | 2               | 1      | 1   | 0    | 4                 | 1,0                     |
| <b>Yeast-like</b>   |                 |        |     |      |                   |                         |
| <i>Aureobasidium</i>  | 3               | 0      | 0   | 2    | 5                 | 1,2                     |
| <i>Coniochaeta luteorubra</i>                                   | 1               | 0      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Elsinoe</i> sp. (próxima a <i>E. banksiigena</i> )           | 1               | 0      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |
| <i>Xenoacremonium falcatus</i>                                  | 1               | 0      | 0   | 0    | 1                 | 0,2                     |



### 5.2.1.1 Comunidade de leveduras isolada de solo coletado em Itacoatiara – AM em relação aos diferentes sítios de coleta

Dentre os quatro sítios de coleta, “piquiá” apresentou o maior número de isolados (120) e 43 espécies. Do sítio “UFAM” foram obtidos 105 isolados e 42 espécies. “TPI” apresentou a terceira maior abundância de isolados (96) e a menor riqueza (18 espécies). No sítio “caru” foram obtidos 80 isolados e identificadas 22 espécies diferentes. Apenas duas espécies foram compartilhadas entre os quatro sítios de coleta (*Pa. laurentii* e *Sch. polymorphus*). Um baixo compartilhamento de espécies foi observado entre os locais de coleta, com apenas 27 espécies (33%) compartilhada por dois ou mais locais de coleta (figura 19).

Figura 19 - Compartilhamento de espécies da comunidade de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas nos pontos de coleta "caru", "UFAM", "piquiá" e "TPI" em Itacoatiara – AM.

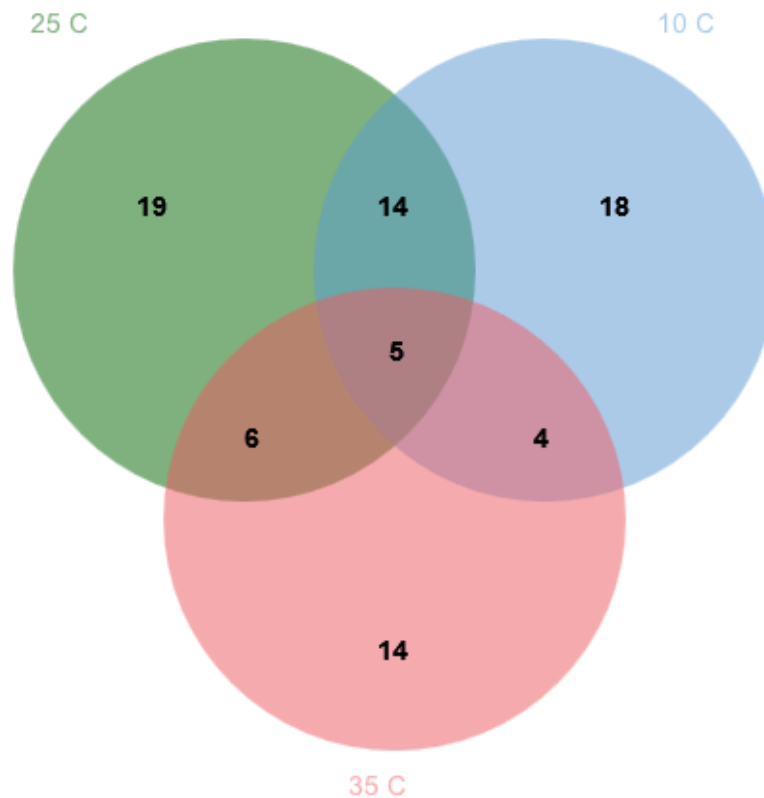


### 5.2.1.2 Comunidade de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas em Itacoatiara – AM em relação às diferentes temperaturas utilizadas para o isolamento

A maior parte da comunidade (67%) foi composta por espécies exclusivamente isoladas em uma das temperaturas testadas (figura 20), com 19 espécies isoladas exclusivamente a 25°C, 18 apenas a 10°C e 14 espécies apenas a 35°C. Um baixo compartilhamento de espécies foi observado, com apenas 5 espécies isoladas nas três temperaturas (*C. pseudointermedia*, *Me.*

*caribbica*, *Pa. laurentii*, *Rh. mucilaginosa* e *Sch. polymorphus*). A maior parte das espécies identificadas foi isolada a 25°C (44 espécies), e a menor parte a 35°C (29 espécies). Quarenta e uma espécies foram isoladas a 10°C.

Figura 20 - Compartilhamento de espécies entre as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas em Itacoatiara – AM, por metodologia de enriquecimento em temperaturas de incubação de 10, 25 e 35 °C.



### 5.2.1.3 Análises de diversidade da comunidade de leveduras isolada de amostras de solo coletadas em Itacoatiara – AM.

A partir da abordagem iNEXT foram calculados e estimados os valores de riqueza de espécies, e os índices de diversidade de Shannon e de Simpson para os quatro sítios de coleta. Esses valores podem ser observados na tabela 14, juntamente com os valores de desvio e os intervalos de confiança mínimo e máximo. Para os sítios “caru” e “TPI”, os valores de diversidade de Shannon obtidos foram os que mais se aproximaram das estimativas calculadas. Estes também foram os sítios com os menores valores de riqueza de diversidade. O sítio com maior valor de diversidade foi “piquia” (diversidade de Shannon = 30). Para este sítio foi estimada uma diversidade de 44. A riqueza estimada para esse sítio foi de 84 espécies, e, no entanto, foram encontradas apenas 48. Para “UFAM”, o valor de diversidade de Shannon

esperado foi de 37 e o obtido foi de 24. Para riqueza de espécies, eram esperadas 94 e foram isoladas 42. Como não ocorreu sobreposição dos intervalos de 95% de confiança entre os sítios “piquia” e “UFAM” em comparação aos sítios “caru” e “TPI”, é possível afirmar que há diferença significativa entre os índices de riqueza e diversidade de Shannon para esses locais (figura 21), ou seja, a riqueza de espécies e diversidade de Shannon nas comunidades de leveduras isoladas em “piquia” e “UFAM” são estatisticamente maiores que a riqueza e diversidade de Shannon das comunidades isoladas em “caru” e “TPI”.

Tabela 10 - Valores de riqueza de espécie, diversidade de Shannon e diversidade de Simpson para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas nos diferentes sítios de coleta de Itacoatiara - AM.

| Sítio           | Diversidade            | Observada | Estimada | s.e. | ICMi | ICMa |
|-----------------|------------------------|-----------|----------|------|------|------|
| <b>"caru"</b>   | Riqueza de espécies    | 22        | 26       | 4    | 23   | 42   |
|                 | Diversidade de Shannon | 16        | 19       | 2    | 16   | 22   |
|                 | Diversidade de Simpson | 12        | 14       | 2    | 12   | 17   |
| <b>"piquia"</b> | Riqueza de espécies    | 43        | 84       | 19   | 62   | 143  |
|                 | Diversidade de Shannon | 30        | 44       | 6    | 32   | 55   |
|                 | Diversidade de Simpson | 18        | 21       | 4    | 18   | 28   |
| <b>"TPI"</b>    | Riqueza de espécies    | 18        | 32       | 12   | 22   | 81   |
|                 | Diversidade de Shannon | 8         | 10       | 2    | 8    | 13   |
|                 | Diversidade de Simpson | 4         | 5        | 1    | 4    | 6    |
| <b>"UFAM"</b>   | Riqueza de espécies    | 42        | 94       | 29   | 61   | 185  |
|                 | Diversidade de Shannon | 24        | 37       | 6    | 25   | 49   |
|                 | Diversidade de Simpson | 14        | 16       | 3    | 14   | 22   |

Dados da cobertura amostral estão na tabela 15. A maior cobertura de amostragem foi observada para os sítios “caru” e “TPI” (91% de cobertura). “Piquiá” e “UFAM” apresentaram cobertura amostral de 78% e 74%, respectivamente. Em nenhuma das coletas a curva da cobertura amostral atingiu a estabilidade (figura 22)

Tabela 11 - Valores de cobertura amostral para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas nos pontos de coleta “caru”, “piquia”, “TPI” e “UFAM” em Itacoatiara - AM.

| Sítio         | Isolados | Riqueza | Cobertura |
|---------------|----------|---------|-----------|
| <b>caru</b>   | 80       | 22      | 0,91      |
| <b>piquia</b> | 120      | 43      | 0,78      |
| <b>TPI</b>    | 96       | 18      | 0,91      |
| <b>UFAM</b>   | 105      | 42      | 0,74      |

Figura 21 - Riqueza de espécie ( $q=0$ ), diversidade de Shannon ( $q=1$ ) e diversidade de Simpson ( $q=2$ ) para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas nos sítios “caru”, “piquia”, “TPI” e “UFAM” em Itacoatiara - AM. As linhas contínuas e pontilhadas representam valores observados (interpolação) e estimados (extrapolação), respectivamente. A área sombreada corresponde ao intervalo de confiança de 95%. No eixo “x” estão representados os valores de abundância e no eixo “y” os valores de diversidade.

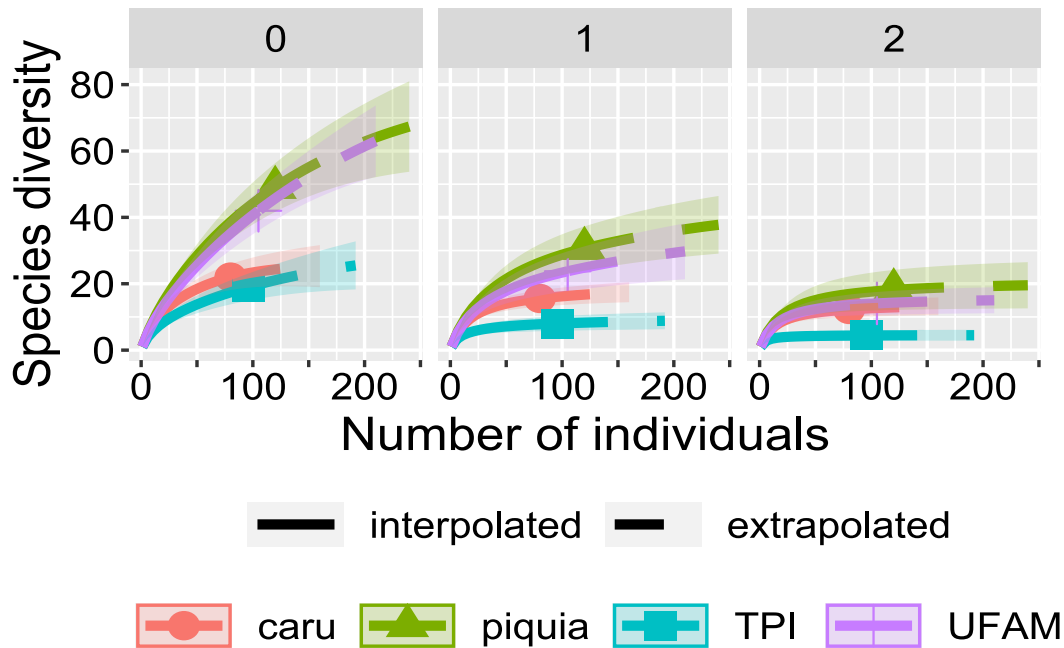
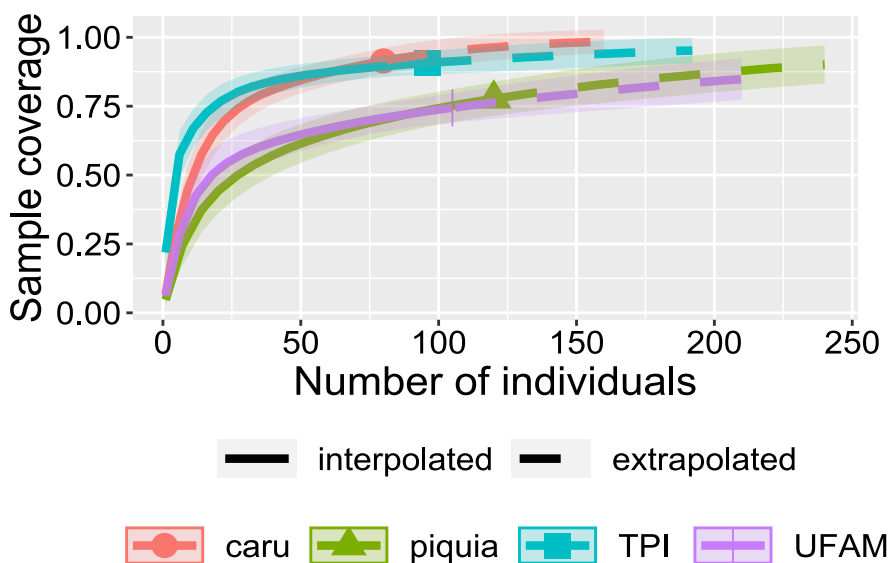


Figura 22 - Curva de acumulação de espécies e cobertura de amostragem para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas nos pontos de coleta “caru”, “piquia”, “TPI” e “UFAM” em Itacoatiara - AM. As linhas contínuas e pontilhadas representam valores observados (interpolação) e estimados (extrapolação), respectivamente. A área sombreada corresponde ao intervalo de confiança de 95%. No eixo “x” estão representados os valores de abundância e no eixo “y” os valores de cobertura amostral.



5.2.1.4 *Diversidade da comunidade de leveduras de amostras de solo coletadas em itacoatiara – AM em relação às temperaturas de isolamento.*

Considerando as diferentes temperaturas de isolamento, o maior valor de diversidade de Shannon foi obtido na comunidade de levedura isolada nos meios de cultura incubados a 25°C. A comunidade isolada a 35°C obteve os menores valores de riqueza de espécies, diversidade de Shannon e diversidade de Simpson. Considerando as estimativas de diversidade calculadas, a maior riqueza era esperada para a comunidade isolada a 10°C e a maior diversidade de Shannon para a comunidade isolada a 25°C. Os valores de diversidade de Simpson (que considera as espécies dominantes) foram menores para as comunidades de leveduras recuperadas a 10 e 35°C, indicando menor proporção de espécies dominantes nessas comunidades (tabela 16, figura 23). Com relação ao esforço amostral, as comunidades obtidas a 10° C e 35° C tiveram o maior valor de cobertura amostral (85%) (tabela 17). Em nenhuma das temperaturas de incubação testada o esforço amostral foi suficiente para inventariar toda a diversidade de leveduras estimada (figura 24).

Tabela 12 - Valores de riqueza de espécie, diversidade de Shannon e diversidade de Simpson observados e estimados para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas em Itacoatiara - AM e incubadas a 10 °C, 25 °C e 35 °C (s.e. = erro padrão; ICMi= intervalo de confiança mínimo; ICMA= intervalo de confiança máximo).

| <b>Temperatur<br/>a</b> | <b>Diversidade</b>     | <b>Observad<br/>a</b> | <b>Estimad<br/>a</b> | <b>s.e.</b> | <b>ICMi</b> | <b>ICMa</b> |
|-------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>10° C</b>            | Riqueza de espécies    | 41                    | 112                  | 41          | 67          | 246         |
|                         | Diversidade de Shannon | 21                    | 28                   | 4           | 21          | 36          |
|                         | Diversidade de Simpson | 11                    | 12                   | 2           | 11          | 15          |
| <b>25° C</b>            | Riqueza de espécies    | 44                    | 108                  | 35          | 69          | 220         |
|                         | Diversidade de Shannon | 31                    | 47                   | 7           | 34          | 61          |
|                         | Diversidade de Simpson | 21                    | 25                   | 4           | 21          | 32          |
| <b>35° C</b>            | Riqueza de espécies    | 29                    | 72                   | 33          | 41          | 193         |
|                         | Diversidade de Shannon | 16                    | 22                   | 4           | 16          | 29          |
|                         | Diversidade de Simpson | 10                    | 11                   | 2           | 10          | 14          |

Tabela 13 – Valores de cobertura amostral baseados na abundância de espécies para as três temperaturas utilizadas no isolamento de leveduras de amostras de solo de Itacoatiara - AM.

| <b>Temperatura</b> | <b>Isolados</b> | <b>Riqueza</b> | <b>Cobertura</b> |
|--------------------|-----------------|----------------|------------------|
| <b>10C</b>         | 169             | 41             | 0,85             |
| <b>25C</b>         | 126             | 44             | 0,79             |
| <b>35C</b>         | 106             | 29             | 0,85             |

Figura 23 - Riqueza de espécie ( $q=0$ ), diversidade de Shannon ( $q=1$ ) e diversidade de Simpson ( $q=2$ ) para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas em Itacoatiara - AM e incubadas a 10 °C, 25 °C e 35 °C. As linhas contínua e pontilhada representam valores observados (interpolação) e estimados (extrapolação), respectivamente. A área sombreada corresponde ao intervalo de confiança de 95%. No eixo “x” estão representados os valores de abundância e no eixo “y” os valores de diversidade.

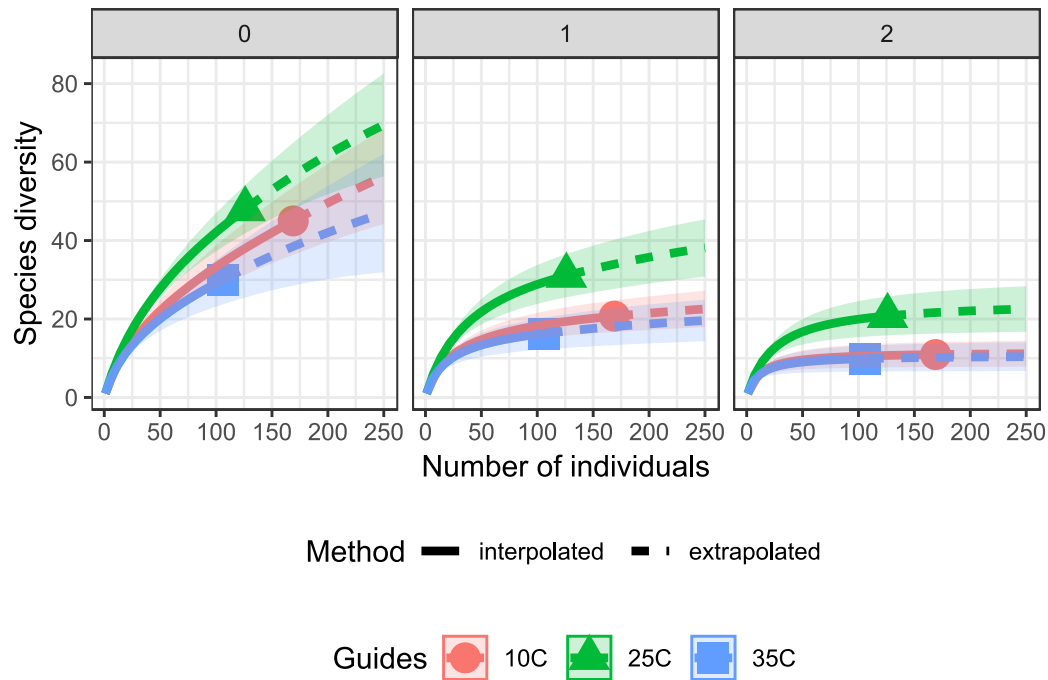
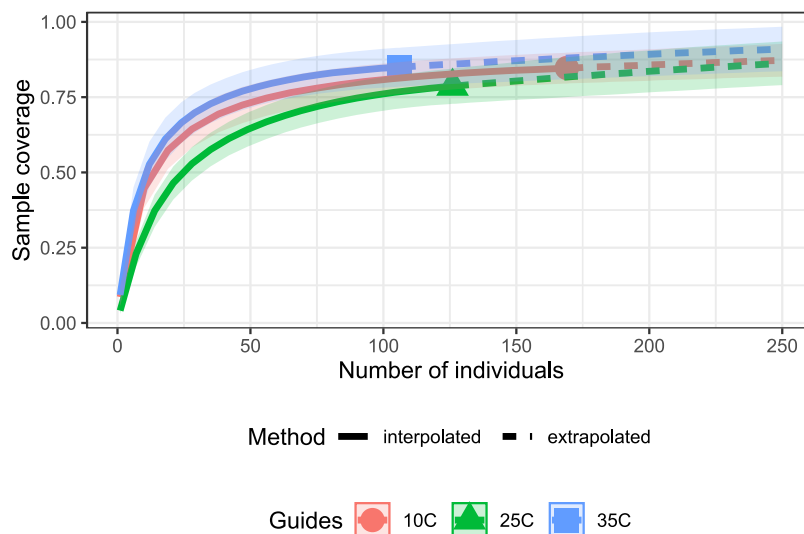


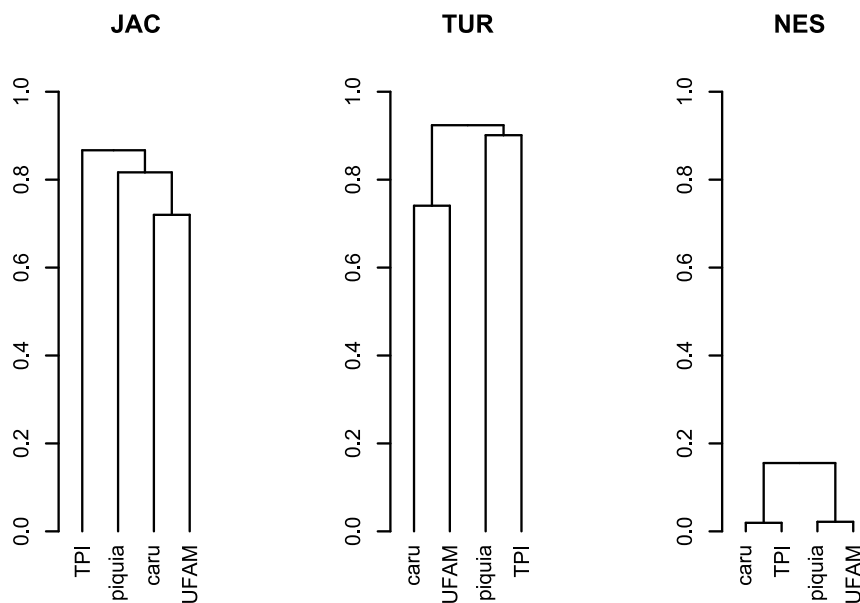
Figura 24 - Curva de acumulação de espécies e suficiência amostral para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas em Itacoatiara - AM e incubadas a 10 °C, 25 °C e 35 °C. As linhas contínua e pontilhada representam valores observados (interpolação) e estimados (extrapolação), respectivamente. A área sombreada corresponde ao intervalo de confiança de 95%. No eixo “x” estão representados os valores de abundância e no eixo “y” os valores de cobertura amostral.



### 5.2.1.5 Diversidade beta e partição da diversidade da comunidade de leveduras isolada de amostras de solo coletadas em Itacoatiara – AM.

A diversidade beta pode ser particionada em dois componentes: dissimilaridade em razão à substituição de espécies e dissimilaridade em virtude do compartilhamento de espécies (BASELGA, 2012). Através da análise de partição da diversidade beta é possível ver a proporção da dissimilaridade de cada comunidade que é relativa ao aninhamento (compartilhamento de espécies) e substituição de espécies (*turnover*). Foi utilizado o índice de Jaccard, que dá mais peso às espécies raras (uma vez que a maior parte das espécies encontrada foi de singletos). Foi encontrada uma dissimilaridade de 87% na comunidade. Desse valor de dissimilaridade, 80% são devidos a eventos de substituição (ou *turnover*) e 6,6% a eventos de aninhamento (compartilhamento de espécies). Valores par-a-par de substituição e aninhamento estão no apêndice E. Para todas as comunidades ocorreu grande substituição de espécies (mais de 92%). A maior substituição de espécies foi observada entre as comunidades dos sítios “TPI” e “caru”. O maior valor de aninhamento de espécies foi observado entre as comunidades dos sítios “UFAM” e “caru” (18,67%). A maior dissimilaridade foi observada entre as comunidades dos sítios “piquia” e “TPI” (figura 25).

Figura 25 – Valores de dissimilaridade encontrados para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo de Itacoatiara – AM. Dissimilaridade de Jaccard (JAC), substituição de espécies ou *turnover* (TUR) e aninhamento (NES) entre os sítios de coleta.



### 5.2.1.6 Singularidade ecológica da comunidade de leveduras isolada de solo coletado em Itacoatiara – AM.

Índices de singularidade ecológica LCBD e SCBD foram calculados para a comunidade de leveduras isolada de amostra se solo coletadas em Itacoatiara - AM. Valores de LCBD indicam a contribuição de cada sítio de coleta para a diversidade beta total da comunidade. Os resultados de LCBD para os três sítios estão listados na tabela 18, juntamente com o valor de  $p$  do teste estatístico associado à análise. O sítio de coleta “TPI” apresentou valor de LCBD estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ). Ao se analisar o valor de LCBD correspondente, o resultado mostra que esse sítio foi o que mais contribuiu para a diversidade beta da comunidade. Esse resultado indica que a comunidade de leveduras desse sítio de coleta possui uma composição de espécies que se diferencia da composição das demais comunidades estudadas, ou que este é um sítio com grande diversidade de espécies.

Tabela 14 - Valores de LCBD (Contribuição do Local para a Diversidade Beta) para as comunidades de leveduras isoladas nos sítios de coleta de Itacoatiara - AM. Valores de  $p$  marcados com asterisco (\*) representam resultados estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

|               | LCBD | p-valor |
|---------------|------|---------|
| <b>caru</b>   | 0,17 | 0,99    |
| <b>piquia</b> | 0,26 | 0,38    |
| <b>TPI</b>    | 0,33 | 0,04*   |
| <b>UFAM</b>   | 0,24 | 0,56    |

Em relação às diferentes temperaturas utilizadas para o isolamento, os valores de LCBD mostraram que a comunidade isolada a 35° C apresentou valor estatisticamente diferente dos demais e, com base no valor de LCBD, é possível afirmar que a parcela de leveduras isoladas nessa temperatura contribuiu mais para a diversidade beta total da comunidade. Esse resultado indica que a comunidade de leveduras recuperada a partir dessa temperatura de incubação possui uma composição de espécies que se diferencia significativamente da composição das comunidades obtidas a partir da incubação a 10 °C e 25 °C. Os valores de LCBD obtidos, juntamente com os valores de  $p$  correspondentes, estão listados na tabela 19.



Tabela 15 - Valores de LCBD (Contribuição do Local para a Diversidade Beta) para as diferentes temperaturas utilizadas no isolamento de leveduras do solo de Itacoatiara - AM. Valores de  $p$  marcados com asterisco (\*) representam resultados estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

|            | LCBD | p-valor |
|------------|------|---------|
| <b>10C</b> | 0,33 | 0,47    |
| <b>25C</b> | 0,24 | 0,99    |
| <b>35C</b> | 0,42 | 0,02*   |

Os índices de SCBD foram calculados para indicar quais espécies mais contribuíram para a diversidade beta da comunidade. Os valores de SCBD variaram entre 0,003589266 e 0,1049567 e a média foi de 0,01123596. Os dados do apêndice F mostram as espécies com valores de SCBD acima da média. As cinco espécies que mais contribuíram para a diversidade beta foram *Pa. laurentii*, *Nakazeomyces* sp., *Mey. caribbica*, *C. tropicalis* e *Sa. podzolica*.

#### 5.2.2 COMUNIDADE DE LEVEDURAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE SOLO COLETADAS EM ITACOATIARA – AM POR METODOLOGIA DE ISOLAMENTO DIRETO

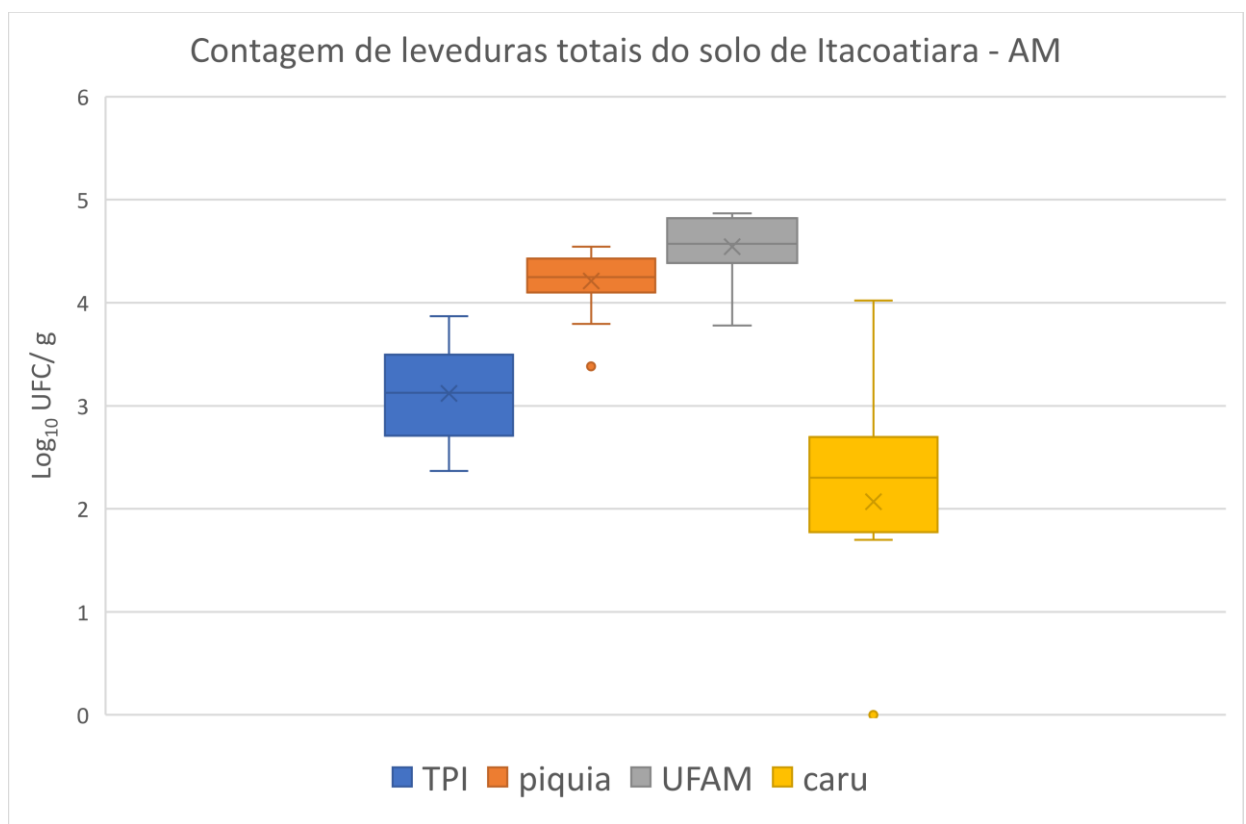
Por meio da metodologia de isolamento direto foram obtidos 150 isolados de leveduras, distribuídos em 40 diferentes espécies. Cento e dois isolados foram do Filo Basidiomycota, distribuídos em 20 espécies diferentes (tabela 20). Dessas, *Pa. laurentii* e *Sa. podzolica* foram as mais frequentes (22% e 19,3% de abundância relativa, respectivamente). As outras espécies de Basidiomycota não atingiram 5% de abundância relativa. Em relação ao Filo Ascomycota foram obtidos 48 isolados, distribuídos em 20 espécies distintas. *Sch. polymorphus* foi a espécie mais abundante, com 7,3% de abundância relativa. Nenhuma das demais espécies do filo atingiu abundância maior que 5%. Com relação aos sítios de coleta, “UFAM” apresentou o maior número de isolados (54), seguido por “piquiá” (41), TPI (31) e “caru” (24). O sítio de onde foi isolado o maior número de espécies foi “UFAM” (22 espécies) seguido por “piquia” (18), “caru” (13) e TPI (4). Nessa metodologia de isolamento direto foi possível determinar a contagem de leveduras totais por grama de solo, cujos valores médios em UFC/g de solo foram  $1,1 \times 10^3$  para “caru”,  $2,1 \times 10^3$  para o sítio “TPI”,  $1,9 \times 10^4$  para “piquia” e  $4,2 \times 10^4$  para “UFAM” (figura 26).

Tabela 16 - Espécies de leveduras isoladas por metodologia de isolamento direto - Itacoatiara - AM.

| Espécie   | Sítio de coleta |             |          |           | Total de isolados | Frequência relativa (%) |
|---|-----------------|-------------|----------|-----------|-------------------|-------------------------|
|   | Caru n=20       | Piquia n=20 | TPI n=20 | UFAM n=20 |                   |                         |
| <b>Ascomycota</b>   |                 |             |          |           |                   |                         |
| <i>Candida albicans</i>   | 0               | 0           | 0        | 1         | 1                 | 0,7                     |
| <i>Candida flosculorum/ pseudoflosculorum</i>                   | 0               | 1           | 0        | 0         | 1                 | 0,7                     |
| <i>Candida melibiosica</i>                                      | 0               | 1           | 0        | 0         | 1                 | 0,7                     |
| <i>Candida natalensis</i>                                       | 0               | 1           | 0        | 2         | 3                 | 2,0                     |
| <i>Candida</i> sp. 6 (próxima a <i>C. entomophila</i> )         | 0               | 0           | 0        | 1         | 1                 | 0,7                     |
| <i>Candida</i> sp. 7 (próxima a <i>C. berkhoutiae</i> )         | 0               | 1           | 0        | 0         | 1                 | 0,7                     |
| <i>Cyberlindnera subsufficiens</i>                              | 0               | 0           | 0        | 2         | 2                 | 1,3                     |
| <i>Diutina</i> sp. 1 (próxima a <i>C. scorzettiae</i> )         | 0               | 1           | 0        | 0         | 1                 | 0,7                     |
| <i>Diutina</i> sp. 2 (próxima a <i>D. siamensis</i> )           | 0               | 1           | 0        | 0         | 1                 | 0,7                     |
| <i>Galactomyces</i> sp. 1 (próxima a <i>G. geotrichum</i> )     | 0               | 4           | 0        | 0         | 4                 | 2,7                     |
| <i>Galactomyces</i> sp. 2 (próxima a <i>G. europaeum</i> )      | 0               | 4           | 0        | 0         | 4                 | 2,7                     |
| <i>Kazachstania kunashirensis</i>                               | 0               | 1           | 0        | 0         | 1                 | 0,7                     |
| <i>Martiniozyma asiatica</i>                                    | 0               | 2           | 0        | 0         | 2                 | 1,3                     |
| <i>Metschnikowia</i> sp. 2 (próxima a <i>M. koreensis</i> )     | 0               | 0           | 0        | 1         | 1                 | 0,7                     |
| <i>Metschnikowia</i> sp. 3 (próxima a <i>C. nongkhaiensis</i> ) | 0               | 0           | 2        | 0         | 2                 | 1,3                     |
| <i>Meyerozyma caribbica</i>                                     | 2               | 0           | 0        | 1         | 3                 | 2,0                     |
| <i>Schwanniomyces polymorphus</i>                               | 1               | 8           | 0        | 2         | 11                | 7,3                     |
| <i>Schwanniomyces vanrijiae</i>                                 | 0               | 2           | 0        | 2         | 4                 | 2,7                     |
| <i>Vanderwaltozyma polyspora</i>                                | 1               | 0           | 0        | 0         | 1                 | 0,7                     |
| <i>Yamadazyma</i> sp. 1   | 0               | 3           | 0        | 0         | 3                 | 2,0                     |
| <b>Basidiomycota</b>  |                 |             |          |           |                   |                         |
| <i>Apiotrichum laibachii</i>                                    | 0               | 2           | 0        | 4         | 6                 | 4,0                     |
| <i>Apiotrichum coprophilum</i>                                  | 0               | 1           | 0        | 5         | 6                 | 4,0                     |
| <i>Apiotrichum</i> sp. 2 (próxima a <i>A. laibachii</i> )       | 1               | 0           | 0        | 0         | 1                 | 0,7                     |
| <i>Filobasidium</i> sp. (próxima a <i>F. globisporum</i> )      | 1               | 0           | 0        | 1         | 2                 | 1,3                     |
| <i>Haglerozyma chiarellii</i>                                   | 0               | 0           | 0        | 2         | 2                 | 1,3                     |
| <i>Moesziomyces antarcticus</i>                                 | 0               | 0           | 1        | 0         | 1                 | 0,7                     |
| <i>Moesziomyces aphidis</i>                                     | 1               | 0           | 0        | 0         | 1                 | 0,7                     |
| <i>Papiliotrema flavescens</i>                                  | 0               | 0           | 0        | 1         | 1                 | 0,7                     |
| <i>Papiliotrema laurentii</i>                                   | 1               | 5           | 26       | 1         | 33                | 22,0                    |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 2 (próximo a <i>P. fuscus</i> )         | 0               | 0           | 0        | 2         | 2                 | 1,3                     |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 1 (próximo a <i>P. siamense</i> )       | 0               | 0           | 0        | 1         | 1                 | 0,7                     |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 5 (próximo a <i>P. mangalensis</i> )    | 0               | 0           | 0        | 1         | 1                 | 0,7                     |
| <i>Papiliotrema terrestris</i>                                  | 0               | 1           | 0        | 3         | 4                 | 2,7                     |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>                                 | 1               | 0           | 2        | 1         | 4                 | 2,7                     |
| <i>Saitozyma podzolica</i>                                      | 10              | 2           | 0        | 17        | 29                | 19,3                    |
| <i>Tremella fuciformis</i>                                      | 1               | 0           | 0        | 0         | 1                 | 0,7                     |
| <i>Tremella</i> sp. (próximo a <i>T. globispora</i> )           | 0               | 0           | 0        | 1         | 1                 | 0,7                     |

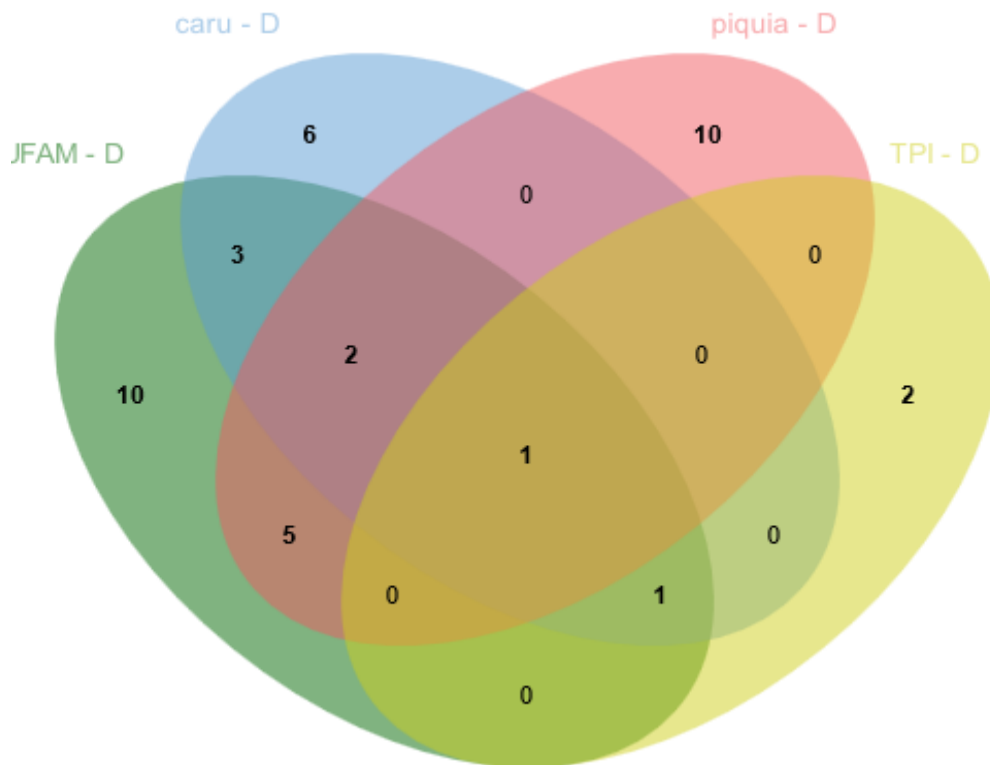
| Espécie                                | Sítio de coleta |                |             |              | Total de isolados | Frequência relativa (%) |
|--|-----------------|----------------|-------------|--------------|-------------------|-------------------------|
|  | Caru<br>n=20    | Piquia<br>n=20 | TPI<br>n=20 | UFAM<br>n=20 |                   |                         |
| <i>Trichosporon asahii</i>             | 1               | 0              | 0           | 0            | 1                 | 0,7                     |
| <i>Trichosporon insectorum/faecale</i> | 1               | 0              | 0           | 0            | 1                 | 0,7                     |
| <i>Vanrija humicola</i>                | 2               | 0              | 0           | 2            | 4                 | 2,7                     |

Figura 26 - Valores de Unidades Formadoras de colônia (UFC) de leveduras totais em amostras de solo coletadas em Itacoatiara -AM. O eixo y representa os valores de  $\text{Log}_{10}$  de UFC por grama de solo.



Apenas a espécie *Pa. laurentii* foi compartilhada entre os quatro sítios de coleta (figura 27). Dez espécies foram exclusivamente isoladas de “piquia”, 10 espécies foram exclusivamente isoladas de “UFAM”, seis de “caru” e duas de “TPI”.

*Figura 27 - Compartilhamento de espécies entre as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas nos sítios de coleta “caru”, “piquia”, TPI” e “UFAM” em Itacoatiara – AM, por metodologia de isolamento direto.*



#### *5.2.2.1 – Análise da diversidade da comunidade de leveduras obtidas de amostras de solos de Itacoatiara - AM por metodologia de isolamento direto.*

Para os índices de riqueza, diversidade de Shannon e diversidade de Simpson, os valores obtidos para as comunidades recuperadas pela metodologia de isolamento direto foram menores que os índices obtidos pela metodologia de enriquecimento (tabela 21). “TPI” foi o sítio com menores valores de riqueza, diversidade de Shannon e diversidade de Simpson. Já o sítio “piquia” foi o que apresentou os maiores valores de diversidade de Shannon e de Simpson. O sítio “UFAM” apresentou a maior riqueza de espécies. A cobertura da amostra pode ser vista na tabela 22. O sítio com maior cobertura amostral foi “TPI” (97%). A menor cobertura observada foi no sítio “caru” (59%).

Tabela 17 - Valores de riqueza de espécie, diversidade de Shannon e diversidade de Simpson observados e estimados para as comunidades de leveduras para os diferentes sítios de coleta de Itacoatiara – AM. Metodologia de isolamento direto (s.e. = erro padrão; ICMi= intervalo de confiança mínimo; ICMa= intervalo de confiança máximo).

| <b>Sítio</b>  | <b>Diversidade</b>     | <b>Observada</b> | <b>Estimada</b> | <b>s.e.</b> | <b>ICMi</b> | <b>ICMa</b> |
|---------------|------------------------|------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>caru</b>   | Riqueza de espécies    | 13,0             | 37,0            | 23,3        | 17,9        | 131,3       |
|               | Diversidade de Shannon | 8,2              | 16,8            | 8,1         | 8,2         | 32,6        |
|               | Diversidade de Simpson | 4,9              | 5,9             | 4,2         | 4,9         | 14,2        |
| <b>piquia</b> | Riqueza de espécies    | 18,0             | 27,9            | 8,8         | 20,2        | 62,3        |
|               | Diversidade de Shannon | 13,8             | 20,0            | 4,4         | 13,8        | 28,6        |
|               | Diversidade de Simpson | 10,8             | 14,4            | 3,3         | 10,8        | 20,8        |
| <b>TPI</b>    | Riqueza de espécies    | 4,0              | 4,2             | 0,7         | 4,0         | 8,6         |
|               | Diversidade de Shannon | 1,8              | 2,0             | 0,4         | 1,8         | 2,8         |
|               | Diversidade de Simpson | 1,4              | 1,4             | 0,2         | 1,4         | 1,9         |
| <b>UFAM</b>   | Riqueza de espécies    | 22,0             | 30,5            | 6,7         | 24,2        | 55,2        |
|               | Diversidade de Shannon | 13,5             | 18,6            | 3,1         | 13,5        | 24,6        |
|               | Diversidade de Simpson | 7,7              | 8,8             | 2,5         | 7,7         | 13,8        |

Tabela 18 - Valores de cobertura amostral para as comunidades de leveduras obtidas pelo isolamento direto para os diferentes sítios de coleta de Itacoatiara – AM.

| <b>Sítio de coleta</b> | <b>Isolados</b> | <b>Riqueza</b> | <b>Cobertura</b> |
|------------------------|-----------------|----------------|------------------|
| <b>caru</b>            | 24              | 13             | 0,59             |
| <b>piquia</b>          | 41              | 18             | 0,79             |
| <b>TPI</b>             | 31              | 4              | 0,97             |
| <b>UFAM</b>            | 54              | 22             | 0,80             |

### 5.2.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS DUAS METODOLOGIAS DE ISOLAMENTO DE LEVEDURAS (DIRETO E ENRIQUECIMENTO) DE AMOSTRAS DE SOLO COLETADAS EM ITACOATIARA – AM.

Quando comparadas as duas metodologias de isolamento (direto e enriquecimento) maiores valores de riqueza, diversidade de Shannon e diversidade de Simpson foram observados para as comunidades de leveduras quando foi utilizada a metodologia de enriquecimento (figura 28). Como não ocorreu sobreposição dos intervalos de confiança para os valores de diversidade de Shannon, é possível afirmar que a diversidade de Shannon e a diversidade de Simpson da comunidade de leveduras isolada por enriquecimento são maiores que as diversidades (Shannon e Simpson) da comunidade de leveduras isolada por metodologia de isolamento direto. A cobertura amostral também foi maior na metodologia de enriquecimento (figura 29). Pouco compartilhamento de espécies ocorreu entre as duas metodologias (figura 30), com compartilhamento de apenas 13 espécies (*Api. laibachii*, *C.*

*albicans*, *C. melibiosica*, *C. natalenses*, *Cy. subsufficiens*, *H. chiarellii*, *Ma. asiatica*, *Me. caribbica*, *Pa. flavescens*, *Pa. laurentii*, *Rh. mucilaginoso*, *Sa. podzolica* e *V. humicola*). A maioria das espécies (76) foi isolada de forma exclusiva pela metodologia de enriquecimento. Vinte e sete espécies foram isoladas de forma exclusiva pela metodologia de isolamento direto.

Figura 28 - Riqueza de espécie ( $q=0$ ), diversidade de Shannon ( $q=1$ ) e diversidade de Simpson ( $q=2$ ) para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas em Itacoatiara - AM e isoladas por metodologia de isolamento direto e enriquecimento. As linhas contínua e pontilhada representam valores observados (interpolação) e estimados (extrapolação), respectivamente. A área sombreada corresponde ao intervalo de confiança de 95%. No eixo “x” estão representados os valores de abundância e no eixo “y” os valores de diversidade

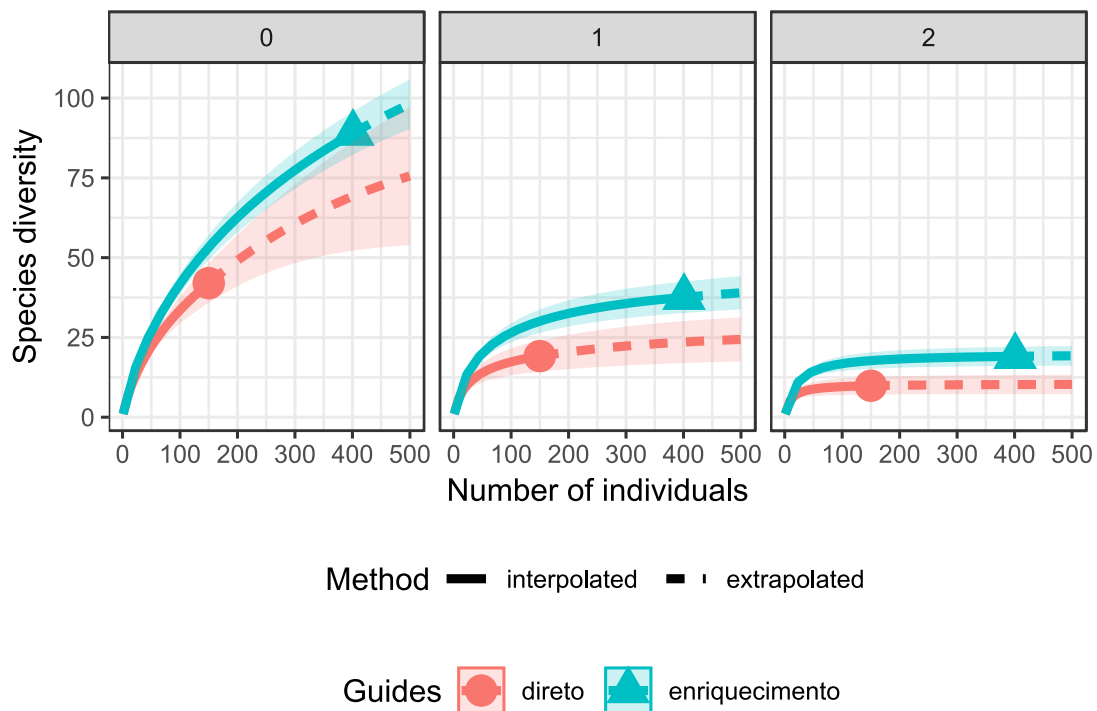


Figura 29 - Curva de acumulação de espécies e cobertura amostral para as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas em Itacoatiara - AM e isoladas por metodologia de isolamento direto e enriquecimento. As linhas contínua e pontilhada representam valores observados (interpolação) e estimados (extrapolação), respectivamente. A área sombreada corresponde ao intervalo de confiança de 95%. No eixo “x” estão representados os valores de abundância e no eixo “y” os valores de cobertura amostral.

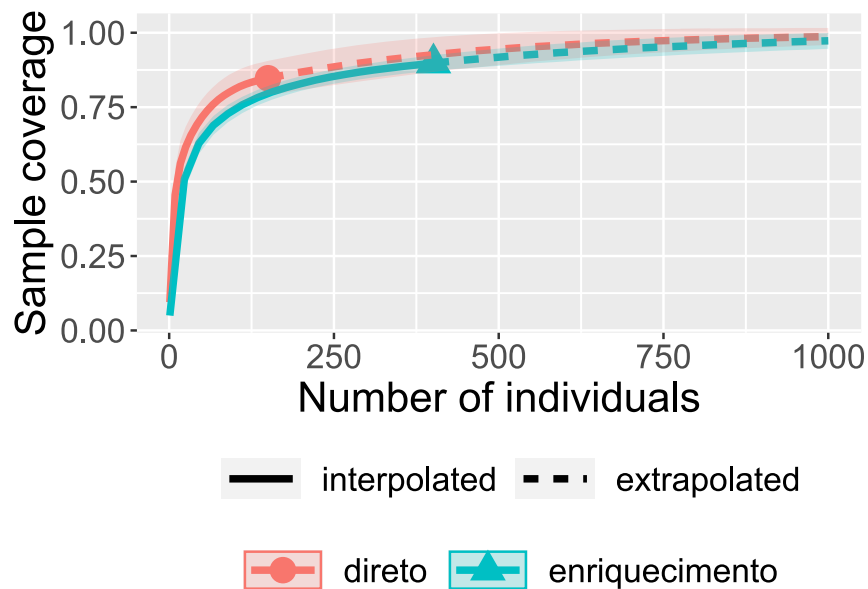
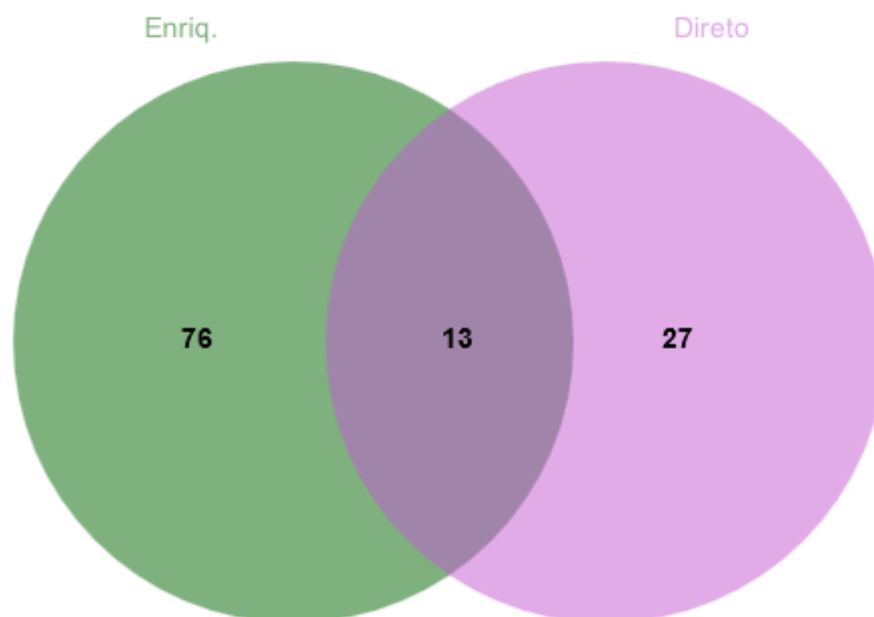


Figura 30 - Compartilhamento de espécies de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas em Itacoatiara -AM. As espécies estão organizadas em relação à metodologia utilizada para o isolamento.



#### 5.2.4 TESTES ENZIMÁTICOS E TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO

Os perfis de atividade enzimática extracelular dos isolados de levedura são mostrados na tabela 24. Os testes foram realizados para todos os singletos e para pelo menos um isolado de cada espécie obtido em cada sítio de coleta. As linhagens de *Lipomyces* não foram testadas. Duzentos e setenta e nove isolados de levedura foram testados, e 250 apresentaram atividade para pelo menos uma das enzimas testadas. Trinta e cinco isolados, pertencentes a 20 espécies, não foram capazes de produzir nenhuma enzima para degradar os substratos testados. A xilanase foi a atividade enzimática extracelular mais amplamente expressa (44,4% de todos os isolados testados), seguida pela pectinase (39,4%), esterase (36,56%), lipase (29,03%), protease (20,79%), tanase (20,79%), amilase (15,05%) e celulase (13,26%). *Papiliotrema laurentii* foi a única espécie capaz de produzir todas as enzimas testadas. A capacidade de solubilizar fosfato foi observada em 38,35% dos isolados.

#### 5.2.5 TESTE DE PREDACÃO POR LINHAGENS DE *SACCHAROMYCOPSIS*

Dois isolados de uma possível espécie nova de *Saccharomycopsis* foram testados quanto à sua capacidade de predação de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Ambos os isolados foram obtidos de amostras de solo coletadas no sítio “piquiá”. Como alvo foram utilizadas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* originárias de dornas de fermentação de cachaça (CAY1007 e CAY1031) e uma linhagem selvagem, obtida de casca de árvore (UFMG-CM-Y7149). Todas as linhagens testadas como alvo foram susceptíveis à predação. A figura 31 mostra microscopia de interações predador-presa após 48 horas de incubação a 25 °C. Para todas as linhagens predadoras foram observados “pegs” de infecção dentro das células predadas. As células das linhagens alvo apresentam aparência colapsada, com volume reduzido e contornos irregulares.



Tabela 19 - Perfis de atividade enzimática extracelular dos isolados de levedura obtidos de amostras de solos coletadas em Itacoatiara -AM.

| Espécie                             | N° de isolados testados | Atividade enzimática |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------------------|-------------------------|----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                                     |                         | AmA                  | LipA | EstA | ProA | XylA | CelA | PecA | PhoA | TanA |
| <i>Apiotrichum gamsii</i>           | 2                       | 2                    | 0    | 0    | 0    | 2    | 2    | 0    | 0    | 1    |
| <i>Apiotrichum laibachii</i>        | 5                       | 2                    | 1    | 0    | 4    | 5    | 5    | 1    | 0    | 2    |
| <i>Apiotrichum mycotoxinivorans</i> | 2                       | 0                    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    |
| <i>Apiotrichum</i> sp. 1            | 9                       | 9                    | 1    | 0    | 3    | 9    | 9    | 0    | 0    | 7    |
| <i>Apiotrichum</i> sp. 2            | 1                       | 1                    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    |
| <i>Apiotrichum sporotrichoides</i>  | 3                       | 3                    | 1    | 0    | 0    | 3    | 3    | 2    | 1    | 2    |
| <i>Aureobasidium</i>                | 4                       | 3                    | 1    | 1    | 1    | 3    | 1    | 2    | 0    | 0    |
| <i>Candida albicans</i>             | 3                       | 0                    | 2    | 3    | 0    | 0    | 0    | 1    | 3    | 0    |
| <i>Candida cylindracea</i>          | 1                       | 0                    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |
| <i>Candida floscolorum</i>          | 1                       | 0                    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |
| <i>Candida ghanaensis</i>           | 3                       | 0                    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| <i>Candida leandrae</i>             | 2                       | 0                    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |
| <i>Candida maltosa</i>              | 2                       | 0                    | 2    | 2    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| <i>Candida melibiosica</i>          | 3                       | 0                    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |
| <i>Candida natalensis</i>           | 3                       | 0                    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| <i>Candida nivariensis</i>          | 1                       | 0                    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |
| <i>Candida pseudointermedia</i>     | 5                       | 0                    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 2    | 0    |
| <i>Candida railenensis</i>          | 3                       | 0                    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 3    | 0    |
| <i>Candida</i> sp. 1                | 1                       | 0                    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    |
| <i>Candida</i> sp. 2                | 1                       | 0                    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| <i>Candida</i> sp. 3                | 1                       | 0                    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| <i>Candida</i> sp. 4                | 1                       | 0                    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |
| <i>Candida</i> sp. 5                | 7                       | 0                    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | 6    | 1    |
| <i>Candida</i> sp. 6                | 1                       | 0                    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    |



| <b>Espécie</b>                     | <b>N° de isolados testados</b> | <b>AmA</b> | <b>LipA</b> | <b>EstA</b> | <b>ProA</b> | <b>XylA</b> | <b>CelA</b> | <b>PecA</b> | <b>PhoA</b> | <b>TanA</b> |
|------------------------------------|--------------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>Metschnikowia koreensis</i>     | 2                              | 0          | 0           | 2           | 2           | 0           | 0           | 1           | 2           | 0           |
| <i>Metschnikowia</i> sp. 1         | 1                              | 0          | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           |
| <i>Metschnikowia</i> sp. 2         | 1                              | 0          | 0           | 0           | 1           | 0           | 0           | 1           | 1           | 0           |
| <i>Metschnikowia</i> sp. 3         | 2                              | 0          | 0           | 1           | 0           | 1           | 0           | 0           | 2           | 1           |
| <i>Meyerozyma caribbica</i>        | 10                             | 0          | 3           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           | 9           | 1           |
| <i>Moesziomyces antarcticus</i>    | 1                              | 1          | 0           | 1           | 0           | 1           | 0           | 1           | 0           | 1           |
| <i>Moesziomyces aphidis</i>        | 1                              | 1          | 1           | 0           | 0           | 1           | 1           | 1           | 0           | 0           |
| <i>Myriangium</i> sp.              | 1                              | 0          | 0           | 1           | 0           | 1           | 0           | 1           | 1           | 1           |
| <i>Nakaseomyces</i> sp.            | 14                             | 0          | 0           | 1           | 0           | 1           | 0           | 0           | 14          | 0           |
| <i>Papiliotrema flavescens</i>     | 5                              | 1          | 4           | 5           | 5           | 3           | 0           | 4           | 4           | 1           |
| <i>Papiliotrema laurentii</i>      | 34                             | 11         | 13          | 30          | 14          | 33          | 3           | 30          | 6           | 21          |
| <i>Papiliotrema ruineniae</i>      | 1                              | 0          | 1           | 1           | 1           | 1           | 0           | 1           | 1           | 0           |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 1          | 2                              | 0          | 0           | 2           | 2           | 2           | 2           | 2           | 0           | 1           |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 2          | 3                              | 0          | 2           | 3           | 1           | 1           | 0           | 1           | 1           | 3           |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 3          | 1                              | 0          | 0           | 0           | 1           | 1           | 0           | 0           | 1           | 0           |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 4          | 2                              | 0          | 2           | 2           | 2           | 1           | 0           | 1           | 1           | 0           |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 5          | 1                              | 0          | 0           | 1           | 1           | 1           | 0           | 1           | 1           | 1           |
| <i>Papiliotrema terrestris</i>     | 2                              | 0          | 2           | 2           | 1           | 0           | 0           | 2           | 2           | 0           |
| <i>Pichia manshurica</i>           | 1                              | 0          | 1           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           |
| <i>Pichia</i> sp.                  | 1                              | 0          | 1           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           | 1           | 0           |
| <i>Pichia sporocuriosa</i>         | 1                              | 0          | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           | 1           | 0           |
| <i>Pichia terricola</i>            | 1                              | 0          | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           | 1           | 0           |
| <i>Rhodospordiobolus ruineniae</i> | 3                              | 0          | 1           | 3           | 0           | 1           | 0           | 3           | 0           | 0           |
| <i>Rhodotorula alborubescens</i>   | 8                              | 1          | 0           | 0           | 2           | 1           | 0           | 8           | 1           | 0           |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>    | 1                              | 0          | 0           | 0           | 1           | 0           | 0           | 1           | 0           | 0           |
| <i>Saccharomycopsis</i> sp.        | 2                              | 0          | 0           | 0           | 1           | 1           | 0           | 2           | 2           | 0           |
| <i>Saitozyma flava</i>             | 1                              | 1          | 0           | 1           | 0           | 1           | 0           | 1           | 1           | 0           |

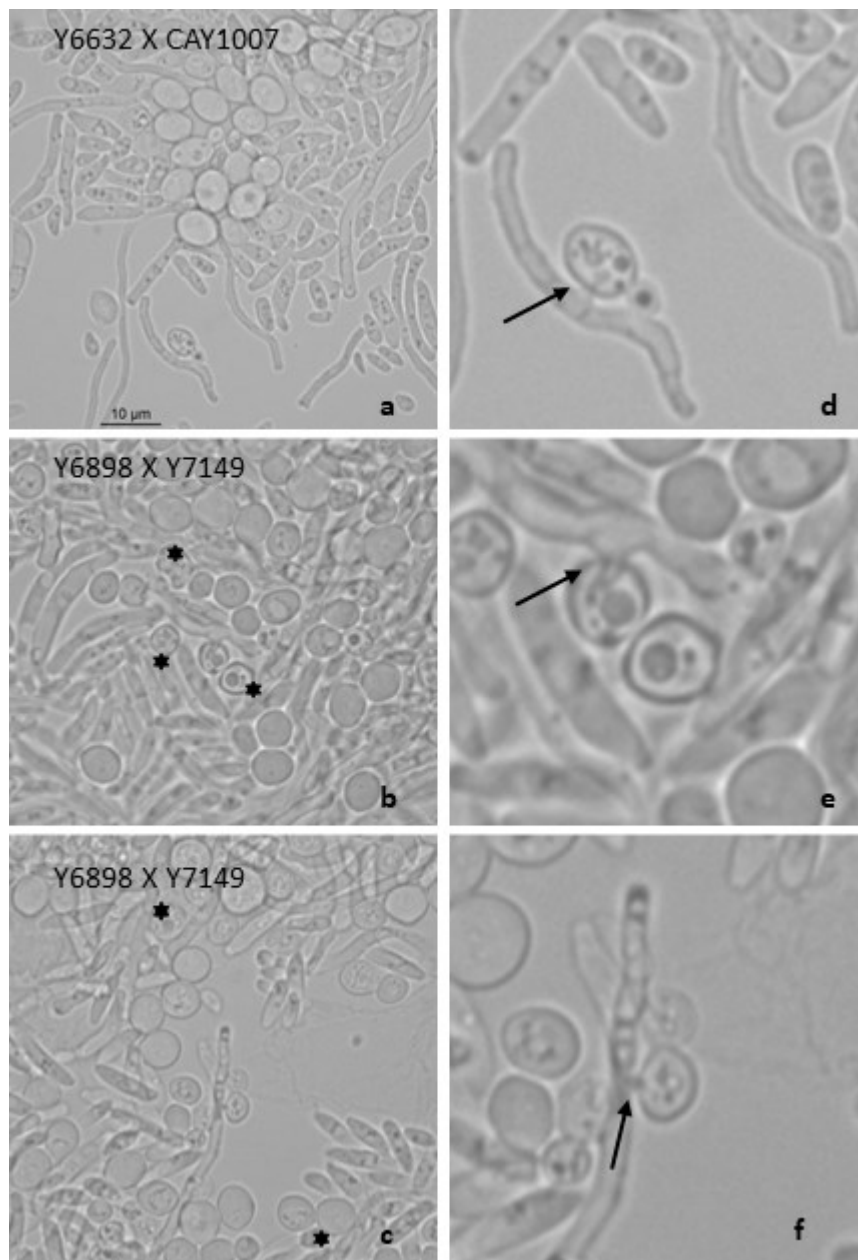
| Espécie                            | N° de isolados |     |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------------------------------------|----------------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                                    | testados       | AmA | LipA | EstA | ProA | XylA | CelA | PecA | PhoA | TanA |
| <i>Saitozyma podzolica</i>         | 13             | 1   | 6    | 12   | 0    | 13   | 0    | 11   | 0    | 4    |
| <i>Saturnispora diversa</i>        | 1              | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |
| <i>Scheffersomyces amazonensis</i> | 3              | 0   | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 2    | 0    |
| <i>Schwanniomyces polymorphus</i>  | 12             | 1   | 5    | 0    | 0    | 11   | 0    | 7    | 0    | 0    |
| <i>Schwanniomyces</i> sp.          | 1              | 0   | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    |
| <i>Schwanniomyces vanrijiae</i>    | 4              | 0   | 3    | 0    | 0    | 0    | 0    | 3    | 0    | 0    |
| <i>Sugiyamaella smithiae</i>       | 2              | 0   | 2    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| <i>Sugiyamaella</i> sp.            | 1              | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| <i>Torulaspora indica</i>          | 1              | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    |
| <i>Torulaspora</i> sp.             | 1              | 0   | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |
| <i>Tremella fuciformis</i>         | 1              | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    |
| <i>Tremella</i> sp.                | 1              | 0   | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    |
| <i>Trichosporon asahii</i>         | 1              | 0   | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    |
| <i>Trichosporon insectorum</i>     | 1              | 0   | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| <i>Vanderwaltozyma polyspora</i>   | 1              | 0   | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    |
| <i>Vanrija humicola</i>            | 4              | 0   | 3    | 4    | 3    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    |
| <i>Wickerhamiella</i> sp.          | 1              | 0   | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |
| <i>Wickerhamomyces</i> sp.         | 1              | 0   | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |
| <i>Wickerhamomyces sydowiorum</i>  | 2              | 1   | 0    | 1    | 2    | 2    | 0    | 0    | 2    | 2    |
| <i>Xenoacremonium falcatus</i>     | 1              | 1   | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    |
| <i>Yamadazyma</i> sp. 1            | 4              | 0   | 1    | 0    | 2    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    |
| <i>Yamadazyma</i> sp. 2            | 1              | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| <i>Yamadazyma</i> sp. 3            | 1              | 0   | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    |
| Total de linhagens                 | 279            |     |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Total de linhagens positivas       |                | 42  | 81   | 102  | 58   | 124  | 37   | 110  | 107  | 58   |

---

| <b>Espécie</b>                                     | <b>Nº de isolados testados</b> | <b>AmA</b> | <b>LipA</b> | <b>EstA</b> | <b>ProA</b> | <b>XylA</b> | <b>CelA</b> | <b>PecA</b> | <b>PhoA</b> | <b>TanA</b> |
|--|--------------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Porcentagem de positivos no total de linhagens (%) |                                | 15,05      | 29,03       | 36,56       | 20,79       | 44,4        | 13,26       | 39,42       | 38,35       | 20,79       |

CelA atividade de celulase (degradação de carboximetilcelulose), XylA atividade de xilanase, PrA atividade de protease, PecA atividade de pectinase, AmA atividade de amilase. PhoA Solubilização de fosfato, TanA atividade de tanase.

Figura 31 - Fotos de microscopia de campo claro de interações predador-presa entre linhagens da possível espécie nova de *Saccharomycopsis* e linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Células colapsadas de *Saccharomyces cerevisiae* estão marcadas com asteriscos (a, b, c) As setas indicam a presença de "pegs" de predação e haustórios no interior das células predadas (d, e, f).



#### 5.2.6 ESPÉCIES POSSIVELMENTE NOVAS ISOLADAS DE SOLOS COLETADOS EM ITACOATIARA – AM

Por meio da metodologia de isolamento de leveduras por enriquecimento, 32 espécies possivelmente novas de leveduras foram isoladas das amostras de solo coletadas em Itacoatiara. Desse total, 26 pertencem ao Filo Ascomycota e seis ao filo Basidiomycota. Já entre as espécies obtidas através da metodologia de isolamento direto, há 16 espécies possivelmente novas (9

Ascomycota e 7 Basidiomycota). A maior parte das possíveis espécies novas é composta por singletos, isto é, espécies representadas por um único isolado. A tabela 25 apresenta os valores de identidade obtidos na comparação entre as sequências das espécies novas com sequências de linhagens tipo depositadas no GenBank. Os códigos de acesso dos depósitos das sequências genéticas dessas espécies possivelmente novas também estão discriminados na mesma tabela.

Dentre as espécies possivelmente novas com mais de um isolado, cinco foram obtidas por meio das duas metodologias de isolamento utilizadas. *Geotrichum* sp. 1 é representada por 13 isolados. Na comparação da sequência nucleotídica dos domínios D1/D2 do gene do RNA ribossomal há 12 substituições em relação à espécie descrita mais próxima (*Galactomyces geotrichum* = *Geotrichum candidum*). *Geotrichum* sp. 2 possui 10 isolados e está filogeneticamente mais próxima a *G. europaeum*, apresentando 14 substituições na comparação das sequências dos domínios D1/D2. Duas espécies possivelmente novas de *Papiliotrema* também foram isoladas pelas duas metodologias de isolamento utilizadas. *Papiliotrema* sp.1, representada por 2 isolados, possui cinco substituições na sequência dos domínios D1/D2 em relação a *P. siamensis* e seis substituições na comparação de sequências dos espaçadores ITS1-5.8S-ITS2 em relação a *P. erniciosus*. *Papiliotrema* sp. 2 possui quatro isolados e a espécie descrita mais próxima é *P. miconiae*. Na comparação das sequências dos domínios D1/D2 e ITS1-5.8S-ITS2 há nove e 13 substituições nucleotídicas, respectivamente, na comparação das sequências das duas espécies. Doze isolados pertencem à possível espécie nova *Yamadazyma* sp.1. A espécie descrita mais próxima é *C. vrieseae* e há nove diferenças na comparação das sequências nucleotídicas dos domínios D1/D2 das duas espécies.

A possível espécie nova com maior número de isolados foi *Nakaseomyces* sp., com 34 representantes. A espécie descrita mais próxima é *Candida nivariensis* e há 10 substituições nucleotídicas na comparação das sequências dos domínios D1/D2 das duas espécies. *Candida* sp. 5 possui 10 isolados. A espécie descrita mais próxima é *C. thaimueangensis*. Há 75 diferenças na comparação das sequências nucleotídicas dos domínios D1/D2 das duas espécies. *Candida* sp. 3, com três isolados, possui 75 substituições nucleotídicas na sequência dos domínios D1/D2 em relação à sequência da linhagem tipo de *C. ruelliae*. *Candida* sp. 2, com dois isolados, tem como espécie descrita mais próxima *C. inulinophila*. Há 65 substituições na comparação das sequências dos domínios D1/D2 das duas espécies. As outras possíveis espécies novas também com dois isolados são: *Filobasium* sp., *Metschnikowia* sp., *Papiliotrema* sp. e *Saccharomycopsis* sp.

Tabela 20 - Espécies possivelmente novas isoladas de solos coletados em Itacoatiara – AM: valores de identidade obtidos na comparação entre as sequências das espécies novas com sequências de linhagens tipo depositadas no GenBank.

| Espécie                    | Código        | Região | Depósito |                                      | Linhagem      | Genbank   | Identidade   | Gaps                            |
|----------------------------|---------------|--------|----------|--------------------------------------|---------------|-----------|--------------|---------------------------------|
|                            |               |        | Genbank  | Espécie mais próxima                 |               |           |              |                                 |
| <i>Candida</i> sp. 1       | UFMG-CM-Y7109 | D1/D2  | OM321339 | <i>Candida entomophila</i>           | NRRL Y-7783   | NG 055237 | 433/512(85%) | 38/512(7%)                      |
| <i>Candida</i> sp. 2       | UFMG-CM-Y7120 | D1/D2  | OM321352 | <i>Candida inulinophila</i>          | NBRC 106735   | AB550104  | 416/481(86%) | 23/481(4%)                      |
| <i>Candida</i> sp. 3       | UFMG-CM-Y7127 | D1/D2  | OM321360 | <i>Candida ruelliae</i>              | MTCC 7739     | NG 064309 | 416/491(85%) | 22/491(4%)                      |
| <i>Candida</i> sp. 4       | UFMG-CM-Y7123 | D1/D2  | OM321356 | <i>Candida californica</i>           | CBS:989       | KY106378  | 499/525(95%) | 0/525(0%)                       |
| <i>Candida</i> sp. 5       | UFMG-CM-Y7098 | D1/D2  | OM321328 | <i>Candida thaimueangensis</i>       | NRRL Y-27416  | EF550231  | 454/529(86%) | 20/529(3%)                      |
| <i>Clavispora</i> sp. 1    | UFMG-CM-Y7160 | NL1    |          | <i>Candida pruni</i>                 | CBS 12814     | NG 064321 | 488/501(97%) | 1/501(0%)                       |
| <i>Clavispora</i> sp. 2    | UFMG-CM-Y7161 | D1/D2  |          | <i>Candida pseudointermedia</i>      | CBS 6918      | MK394147  | 522/525(99%) | 2/525(0%)                       |
|                            |               |        |          |                                      |               |           | ITS          | <i>Candida pseudointermedia</i> |
| <i>Geotrichum</i> sp. 1    | UFMG-CM-Y7113 | D1/D2  | OM321344 | <i>Galactomyces geotrichum</i>       | CBS 775.71    | JN974280  | 482/494(98%) | 1/494(0%)                       |
| <i>Geotrichum</i> sp. 2    | UFMG-CM-Y7119 | D1/D2  | OM321351 | <i>Geotrichum europaeum</i>          | CBS 866.68    | NG 055387 | 480/494(97%) | 0/494(0%)                       |
| <i>Geotrichum</i> sp. 3    | UFMG-CM-Y7125 | D1/D2  | OM321358 | <i>Galactomyces pseudocandidus</i>   | UCDFST 01-150 | MH130227  | 470/480(98%) | 0/480(0%)                       |
| <i>Groenewaldozyma</i> sp. | UFMG-CM-Y7164 | NL1    |          | <i>Groenewaldozyma tartarivorans</i> | CBS 7955      | NG 058300 | 525/556(94%) | 5/556(0%)                       |
| <i>Kazachstania</i> sp.    | UFMG-CM-Y7101 | D1/D2  | OM321331 | <i>Kazachstania yasuniensis</i>      | CLQCA 20-132  | NG 067774 | 573/574(99%) | 0/574(0%)                       |
|                            |               | ITS    | -        | <i>Kazachstania yasuniensis</i>      | CLQCA 20-132  | NR 160315 | 656/661(99%) | 0/661(0%)                       |



| Espécie                     | Código        | Região | Depósito |                                    | Linhagem     | Genbank   | Identidade    | Gaps       |
|-----------------------------|---------------|--------|----------|------------------------------------|--------------|-----------|---------------|------------|
|                             |               |        | Genbank  | Espécie mais próxima               |              |           |               |            |
| <i>Limtongozyma</i> sp.     | UFMG-CM-Y7105 | D1/D2  | OM321335 | <i>Limtongozyma cylindracea</i>    | CBS:6330     | KY106404  | 478/489(98%)  | 0/489(0%)  |
| <i>Metschnikowia</i>        | UFMG-CM-Y7124 | D1/D2  | OM321357 | <i>Candida bromeliacearum</i>      | UNESP 99-64  | AY193780  | 315/347(91%)  | 14/347(4%) |
| <i>Nakaseomyces</i> sp.     | UFMG-CM-Y7116 | D1/D2  | OM321347 | <i>Candida nivariensis</i>         | CBS 9983     | MH545923  | 560/570(98%)  | 0/570(0%)  |
| <i>Pichia</i> sp.           | UFMG-CM-Y7123 | D1/D2  | OM321356 | <i>Candida californica</i>         | CBS:989      | KY106378  | 534/560(95%)  | 0/560(0%)  |
| <i>Saccharomycopsis</i> sp. | UFMG-CM-Y6632 | D1/D2  | OM321353 | <i>Saccharomycopsis capsularis</i> | CBS:2520     | KY109483  | 492/530(93%)  | 4/530(0%)  |
| <i>Schwanniomyces</i> sp.   | UFMG-CM-Y7126 | D1/D2  | OM321359 | <i>Schwanniomyces yamadae</i>      | NRRL Y-11714 | NG 054862 | 488/538(91%)  | 6/538(1%)  |
| <i>Sugiyamaella</i> sp.     | UFMG-CM-Y7114 | D1/D2  | OM321345 | <i>Sugiyamaella bonitensis</i>     | UFMG-CM-Y608 | KT006004  | 476/504(94%)  | 3/504(0%)  |
| <i>Torulaspora</i> sp.      | UFMG-CM-Y7122 | D1/D2  | OM321355 | <i>Torulaspora franciscae</i>      | CBS 2926     | NG 055059 | 509/540(94%)  | 7/540(1%)  |
| <i>Wickerhamiella</i> sp.   | UFMG-CM-Y7121 | D1/D2  | OM321354 | <i>Wickerhamiella musiphila</i>    | CBS 10697    | NG 055366 | 457/492(93%)  | 4/492(0%)  |
| <i>Wickerhamomyces</i> sp.  | UFMG-CM-Y7099 | D1/D2  | OM321329 | <i>Pichia pijperi</i>              | NBRC 102059  | AB449695  | 538/540(99%)  | 0/540(0%)  |
| <i>Yamadazyma</i> sp. 1     | UFMG-CM-Y6633 | D1/D2  | OM321326 | <i>Candida vrieseae</i>            | CBS 10829    | NG 060833 | 540/549(98%)  | 0/549(0%)  |
| <i>Yamadazyma</i> sp. 2     | UFMG-CM-Y7115 | D1/D2  | OM321346 | <i>Candida songkhlaensis</i>       | CBS:10791    | KY106765  | 503/510(99%)  | 0/510(0%)  |
| <i>Yamadazyma</i> sp. 3     | UFMG-CM-Y7117 | D1/D2  | OM321348 | <i>Yamadazyma phyllophila</i>      | DMKU RK548   | NG 054772 | 468/475(99%)  | 0/475(0%)  |
| <i>Hannaella</i> sp.        | UFMG-CM-Y7102 | D1/D2  | OM321332 | <i>Hannaella taiwanensis</i>       | BCRC 23252   | NG 075174 | 544/544(100%) | 0/544(0%)  |
|                             | ITS...        |        |          |                                    |              |           |               |            |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 1   | UFMG-CM-Y7103 | D1/D2  | OM321333 | <i>Papiliotrema siamensis</i>      | DMKU SP85    | NG_060062 | 542/547(99%)  | 0/547(0%)  |

| Espécie                    | Código        | Região | Depósito |                                    | Linhagem      | Genbank   | Identidade    | Gaps       |
|----------------------------|---------------|--------|----------|------------------------------------|---------------|-----------|---------------|------------|
|                            |               |        | Genbank  | Espécie mais próxima               |               |           |               |            |
|                            |               | ITS    | OM480727 | <i>Papiliotrema perniciosus</i>    | VKM Y-2905    | NR 137653 | 475/481(99%)  | 1/481(0%)  |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 2  | UFMG-CM-Y7166 | D1/D2  |          | <i>Papiliotrema miconiae</i>       | CBS 8358      | AF444698  | 584/593(98%)  | 0/593(0%)  |
|                            |               | ITS    |          | <i>Papiliotrema miconiae</i>       | CBS 8358      | AF444387  | 482/495(97%)  | 3/495(0%)  |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 3  | UFMG-CM-Y7118 | D1/D2  | OM321350 | <i>Papiliotrema laurentii</i>      | CBS:139       | KY108739  | 514/520(99%)  | 0/520(0%)  |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 4  | UFMG-CM-Y6631 | D1/D2  | OM321349 | <i>Papiliotrema rajasthanensis</i> | CBS 10406     | NG 058366 | 529/535(99%)  | 0/535(0%)  |
|                            |               | ITS    |          | <i>Papiliotrema rajasthanensis</i> | CBS 10406     | NR 155678 | 465/483(96%)  | 6/483(1%)  |
| <b>Isolamento direto</b>   |               |        |          |                                    |               |           |               |            |
| <i>Candida</i> sp. 6       | UFMG-CM-Y7165 | NL1    |          | <i>Candida middelhoveniana</i>     | CBS 12306     | NG 060817 | 364/385(95%)  | 5/385(1%)  |
| <i>Diutina</i> sp. 1       | UFMG-CM-Y7106 | D1/D2  | OM321336 | <i>Diutina sipiczki</i>            | NCAIM Y.02231 | MN219653  | 400/461(87%)  | 13/461(2%) |
| <i>Diutina</i> sp. 2       | UFMG-CM-Y7108 | D1/D2  | OM321338 | <i>Diutina siamensis</i>           | DMKU-RE43     | KT336715  | 408/427(96%)  | 2/427(0%)  |
| <i>Metschnikowia</i> sp. 2 | UFMG-CM-Y7163 | NL1    |          | <i>Metschnikowia koreensis</i>     | CBS 8854      | NG 058340 | 386/474(81%)  | 14/474(2%) |
| <i>Metschnikowia</i> sp. 3 | UFMG-CM-Y7107 | D1/D2  | OM321337 | <i>Candida eppingiae</i>           | CBS:8586      | KY106433  | 301/341(88%)  | 16/341(4%) |
| <i>Apiotrichum</i> sp.     | UFMG-CM-Y7112 | D1/D2  | OM321343 | <i>Apiotrichum dehoogii</i>        | CBS 8686      | NG 066149 | 511/542(94%)  | 3/542(0%)  |
| <i>Filobasidium</i> sp.    | UFMG-CM-Y6635 | D1/D2  | OM321340 | <i>Filobasidium mali</i>           | CGMCC2.4012   | MK050346  | 574/574(100%) | 0/574(0%)  |
|                            |               | ITS:   | OM480729 | <i>Filobasidium globosum</i>       | CGMCC2.5680   | MK050344  | 593/607(98%)  | 2/607(0%)  |
|                            |               |        |          | <i>Filobasidium mali</i>           | CGMCC2.4012   | MK050346  | 581/610(95%)  | 11/610(1%) |
| <i>Papiliotrema</i> sp. 5  | UFMG-CM-Y7110 | D1/D2  | OM321341 | <i>Papiliotrema mangalensis</i>    | CBS:10870     | KY107130  | 523/533(98%)  | 0/533(0%)  |
| <i>Tremella</i> sp.        | UFMG-CM-Y7111 | D1/D2  | OM321342 | <i>Tremella globispora</i>         | CBS 6972      | AF189869  | 510/524(97%)  | 1/524(0%)  |

### 5.2.7 MEIO SELETIVO PARA LEVEDURAS DO GÊNERO *Lipomyces*

As oitenta amostras coletadas foram também inoculadas em meio seletivo contendo 0,1% de cicloheximida com o objetivo de isolar leveduras do gênero *Lipomyces*. Por meio dessa metodologia foram obtidos 47 isolados de leveduras. Dentre as 20 amostras coletadas em cada sítio, leveduras do gênero *Lipomyces* foram isoladas de quatro amostras do “caru”, de seis amostras do “UFAM”, de 12 amostras do “piquia” e de 14 amostras do “TPI”. Valores de UFC por grama de solo destas leveduras podem ser visualizados na figura 32. Os maiores valores de UFC/g foram observados nos sítios “piquia” ( $5,0 \times 10^1 - 2,4 \times 10^3$ ) e “TPI” ( $5,0 \times 10^1 - 1,1 \times 10^3$ ). Já os menores valores foram obtidos nos sítios “caru” ( $5,0 \times 10^1 - 2,0 \times 10^2$ ) e “UFAM” ( $5,0 \times 10^1 - 7,5 \times 10^2$ ). O sequenciamento dos domínios D1/D2 do gene do RNA ribossomal confirmou que todos esses isolados pertencem ao gênero *Lipomyces*. Contudo, apenas essa região não é capaz de diferenciar as espécies de *Lipomyces*, sendo necessário o sequenciamento dos espaçadores transcritos internos 1 e 2, e do gene do fator de alongação. O apêndice G apresenta os resultados dos alinhamentos das sequências dos domínios D1/D2 e dos espaçadores ITS1-5.8S-ITS2 do gene do RNA ribossomal entre as espécies isoladas no trabalho e as linhagens tipo depositadas no GenBank. A Tabela 23 mostra os valores de identidade dos alinhamentos entre as sequências parciais do gene que codifica o fator de alongação EF1- $\alpha$  dos isolados obtidos com sequências de linhagens tipo depositadas no Genbank. Para 12 dos isolados não foi possível a amplificação dessa região gênica. A figura 33 apresenta árvore filogenética das espécies de *Lipomyces*, baseada em sequências parciais do gene que codifica o fator de alongação EF1- $\alpha$ . Essa árvore foi construída para posicionar filogeneticamente as espécies isoladas nesse trabalho. Apenas as espécies descritas de *Lipomyces*, que estão filogeneticamente próximas às espécies obtidas nesse trabalho (com base nas sequências dos domínios D1/D2 e ITS) estão representadas na árvore. A partir da análise das sequências é possível distinguir 26 espécies possivelmente novas de *Lipomyces*. Para as linhagens em que as sequências do gene EF1-a não foi obtida, não foi possível a delimitação da espécie. Todas as possíveis espécies novas de *Lipomyces* estão posicionadas no clado de *Lipomyces tetrasporus*, *L. yamadae*, *L. yarowii*, *L. kononenkoe*, *L. maratuensis* e *L. spencermartinsiae*. Para as possíveis espécies novas de *Lipomyces* foi realizado teste de indução de esporulação em meio V8, por até 15 dias, a 25 °C. A figura 34 mostra os esporos sexuais produzidos por algumas linhagens nas condições testadas. Os isolados de *Lipomyces* apresentaram perfil restrito de assimilação de compostos de carbono (tabela 24). A assimilação de maltose, D-manitol, D-xilose, galactose, glicose, inulina, isopropanol, L-sorbose, melibiose, melizitose, rafinose, sacarose, salicina, sorbitol, succinato e xilitol foi positiva para mais de 50% dos isolados.

Nenhum isolado foi capaz de crescer em meio com 10% de NaCl, 50% de glicose e 1% de ácido acético; nem em meios com D-arabinose, DL-lactato, D-ribose, gluconato, glucosamina, hexadecano, L-raminose, metanol e N-acetilglucosamina como única fonte de carbono. Cinquenta e sete por cento dos isolados cresceu em meio com 0,1% de cicloheximida. Apenas dois isolados cresceram a 37°C e um deles cresceu também a 40 °C.

Figura 32 - Valores de Unidades Formadoras de colônia (UFC) de leveduras totais do gênero *Lipomyces*, presentes em amostras de solo coletadas em Itacoatiara -AM. O eixo y representa os valores de UFC por grama de solo.

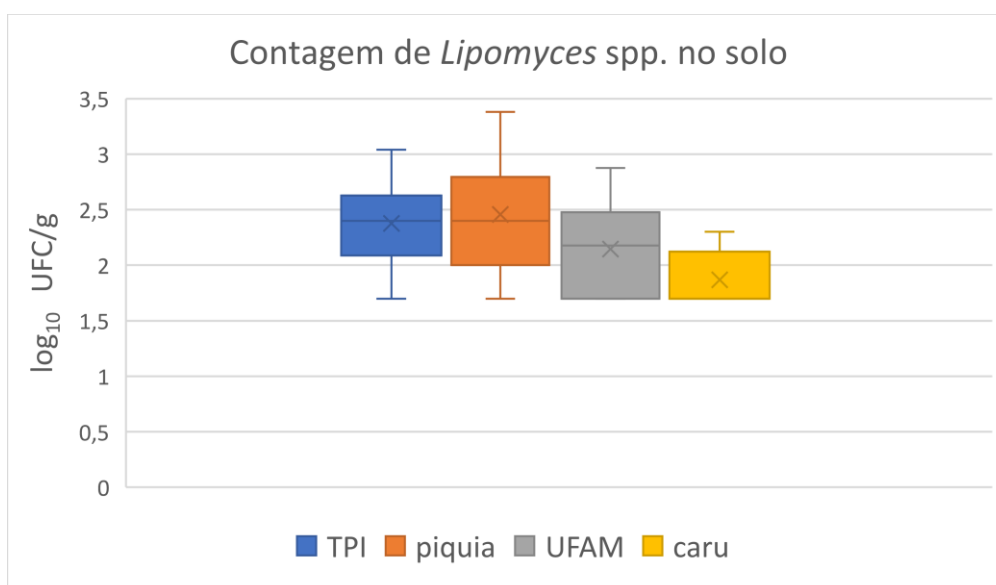


Figura 33 - Arvore filogenética construída a partir do alinhamento de sequências parciais do gene do EF1-alfa. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. Valores de bootstrap (50 replicatas) são mostrados ao lado dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas pelo método de Tamura-Nei com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 1). A análise envolveu 40 sequências nucleotídicas em um total de 896 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA11

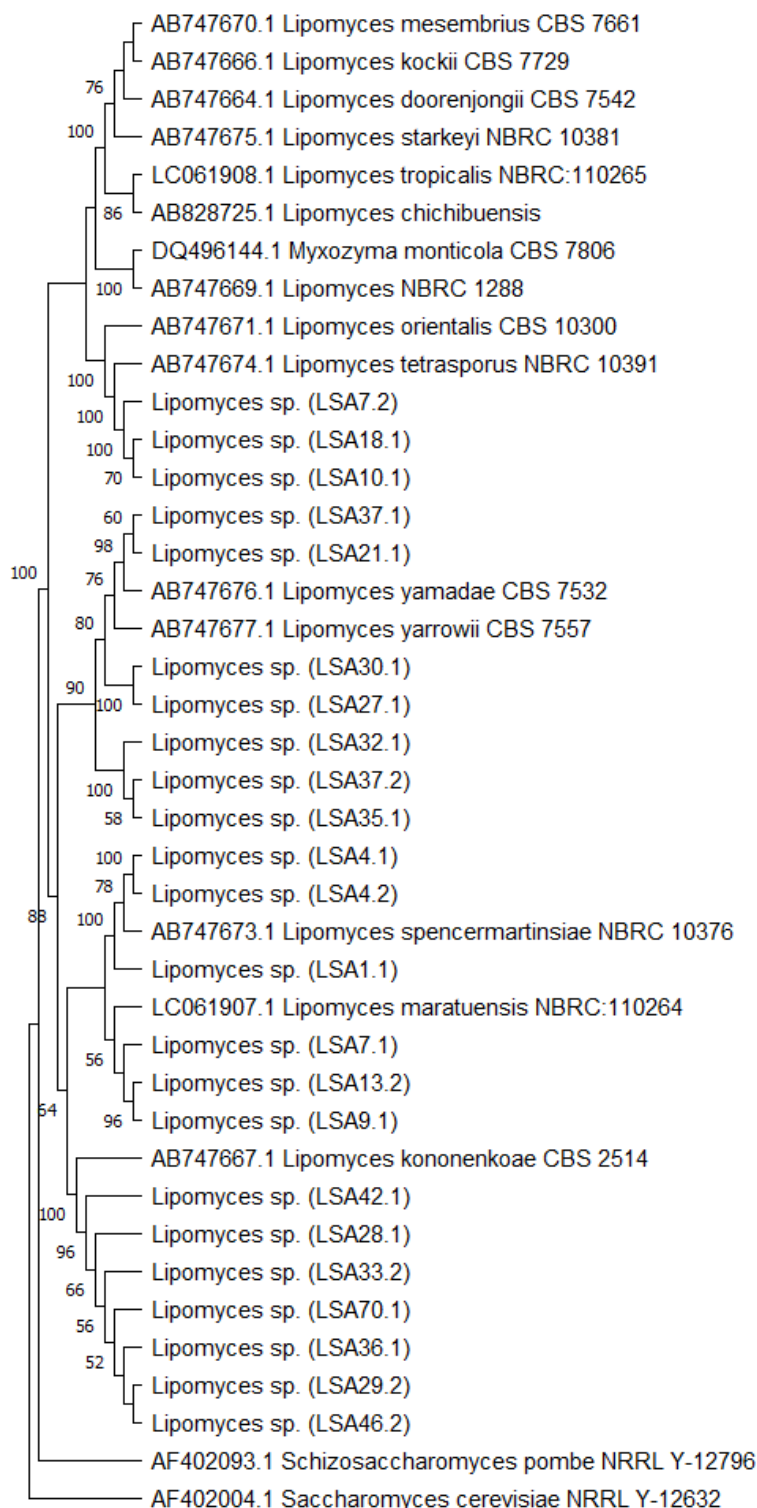


Figura 34 - Esporos sexuais produzidos por isolados de *Lipomyces*, após 7 dias de incubação, a 25 °C, em meio V8.

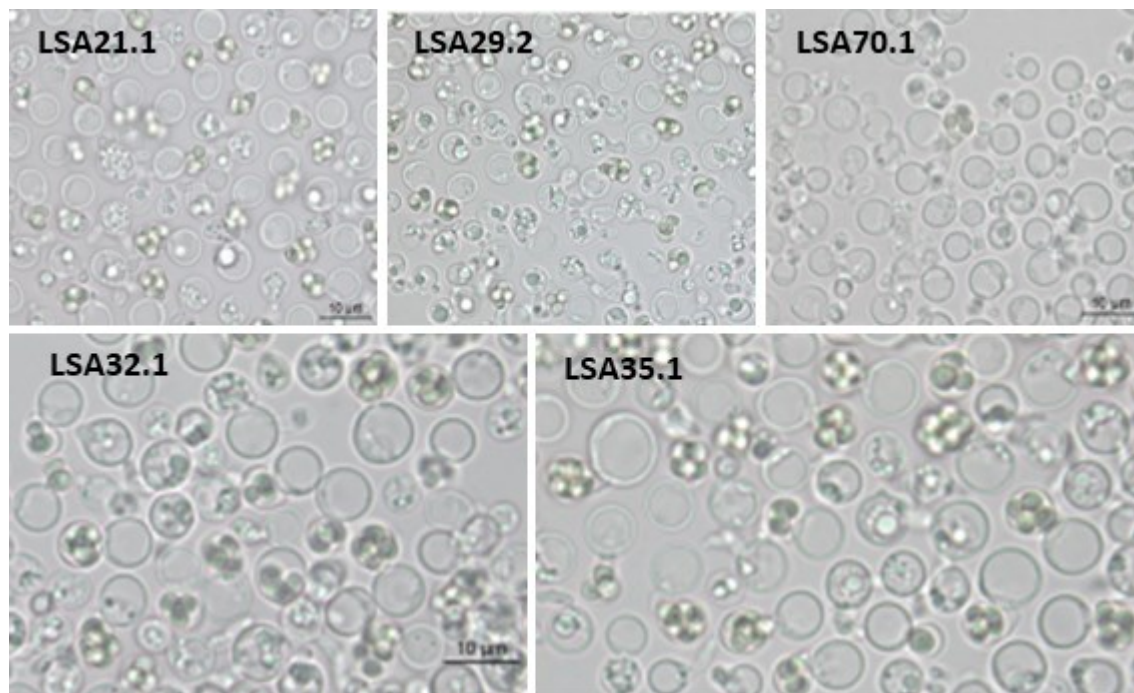


Tabela 21 -Valores de identidade dos alinhamentos entre as sequências parciais do gene que codifica o fator de alongação EF1- $\alpha$  dos isolados de *Lipomyces* obtidos com sequências de linhagens tipo depositadas no Genbank.

| <b>Código</b> | <b>Espécie descrita mais próxima</b> | <b>Linhagem</b> | <b>Acesso Genbank</b> | <b>Identidade EF1- <math>\alpha</math></b> | <b>Gaps</b> |
|---------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------------|--|-------------|
| LSA1.1        | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i>   | CBS 5608        | AB747672              | 884/898(98%)                               | 1/898(0%)   |
|               | <i>Lipomyces okinawensis</i>         | NBRC:110620     | LC202817              | 867/904(96%)                               | 1/904(0%)   |
| LSA4.1        | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i>   | CBS 5608        | AB747672              | 923/928(99%)                               | 0/928(0%)   |
|               | <i>Lipomyces okinawensis</i>         | NBRC:110620     | LC202817              | 902/929(97%)                               | 0/929(0%)   |
| LSA4.2        | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i>   | CBS 5608        | AB747672              | 864/870(99%)                               | 1/870(0%)   |
|               | <i>Lipomyces okinawensis</i>         | NBRC:110620     | LC202817              | 847/874(97%)                               | 1/874(0%)   |
| LSA7.1        | <i>Lipomyces okinawensis</i>         | NBRC:110620     | LC202817              | 903/909(99%)                               | 0/909(0%)   |
|               | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i>   | CBS 5608        | DQ496132              | 882/909(97%)                               | 0/909(0%)   |
| LSA7.2        | <i>Lipomyces tetrasporus</i>         | CBS 5910        | DQ496134              | 801/824(97%)                               | 0/824(0%)   |
|               | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i>   | CBS 5608        | DQ496132              | 800/824(97%)                               | 0/824(0%)   |
| LSA9.1        | <i>Lipomyces okinawensis</i>         | NBRC:110620     | LC202817              | 759/786(97%)                               | 3/786(0%)   |
|               | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i>   | CBS 5608        | DQ496132              | 751/786(96%)                               | 3/786(0%)   |
| LSA12.1_f     | <i>Lipomyces okinawensis</i>         | NBRC:110620     | LC202817              | 644/669(96%)                               | 3/669(0%)   |
|               | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i>   | CBS 5608        | DQ496132              | 637/669(95%)                               | 3/669(0%)   |
| LSA10.1       | <i>Lipomyces tetrasporus</i>         | CBS 5910        | DQ496134              | 826/852(97%)                               | 0/852(0%)   |
|               | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i>   | CBS 5608        | DQ496132              | 824/852(97%)                               | 0/852(0%)   |
| LSA13.2       | <i>Lipomyces okinawensis</i>         | NBRC:110620     | LC202817              | 772/807(96%)                               | 3/807(0%)   |
|               | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i>   | CBS 5608        | DQ496132              | 769/807(95%)                               | 3/807(0%)   |
| LSA18.1       | <i>Lipomyces orientalis</i>          | CBS 10300       | AB747671              | 894/938(95%)                               | 1/938(0%)   |
|               | <i>Lipomyces tetrasporus</i>         | CBS 5910        | DQ496134              | 848/873(97%)                               | 0/873(0%)   |
| LSA21.1       | <i>Lipomyces yamadae</i>             | CBS 7532        | AB747676              | 918/927(99%)                               | 1/927(0%)   |
|               | <i>Lipomyces yarrowii</i>            | CBS 7557        | AB747677              | 907/927(98%)                               | 1/927(0%)   |
| LSA25.1_f     | <i>Lipomyces yamadae</i>             | CBS 7532        | AB747676              | 693/715(97%)                               | 0/715(0%)   |

| <b>Código</b> | <b>Espécie descrita mais próxima</b> | <b>Linhagem</b> | <b>Acesso Genbank</b> | <b>Identidade EF1- <math>\alpha</math></b> | <b>Gaps</b> |
|---------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------------|--|-------------|
|               | <i>Lipomyces kononenkoae</i>         | CBS 2514        | AB747667              | 693/715(97%)                               | 0/715(0%)   |
| LSA27.1       | <i>Lipomyces yamadae</i>             | CBS 7532        | AB747676              | 894/921(97%)                               | 1/921(0%)   |
|               | <i>Lipomyces yarrowii</i>            | CBS 7557        | AB747677              | 892/921(97%)                               | 1/921(0%)   |
| LSA28.1       | <i>Lipomyces kononenkoae</i>         | CBS 2514        | AB747667              | 892/905(99%)                               | 0/905(0%)   |
|               | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i>   | CBS 5608        | DQ496132              | 866/903(96%)                               | 0/903(0%)   |
| LSA29.2       | <i>Lipomyces kononenkoae</i>         | CBS 2514        | AB747667              | 913/924(99%)                               | 0/924(0%)   |
|               | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i>   | CBS 5608        | DQ496132              | 890/924(96%)                               | 0/924(0%)   |
| LSA30.1       | <i>Lipomyces yamadae</i>             | CBS 7532        | AB747676              | 896/920(97%)                               | 0/920(0%)   |
|               | <i>Lipomyces yarrowii</i>            | CBS 7557        | AB747677              | 895/921(97%)                               | 0/921(0%)   |
| LSA32.1       | <i>Lipomyces yarrowii</i>            | CBS 7557        | AB747677              | 894/930(96%)                               | 0/930(0%)   |
|               | <i>Lipomyces yamadae</i>             | CBS 7532        | AB747676              | 890/929(96%)                               | 0/929(0%)   |
| LSA33.2       | <i>Lipomyces kononenkoae</i>         | CBS 2514        | AB747667              | 913/925(99%)                               | 0/925(0%)   |
|               | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i>   | CBS 5608        | DQ496132              | 891/926(96%)                               | 0/926(0%)   |
| LSA35.1       | <i>Lipomyces yarrowii</i>            | CBS 7557        | AB747677              | 893/930(96%)                               | 0/930(0%)   |
|               | <i>Lipomyces yamadae</i>             | CBS 7532        | AB747676              | 889/929(96%)                               | 0/929(0%)   |
| LSA36.1       | <i>Lipomyces kononenkoae</i>         | CBS 2514        | AB747667              | 919/929(99%)                               | 0/929(0%)   |
|               | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i>   | CBS 5608        | DQ496132              | 897/930(96%)                               | 0/930(0%)   |
| LSA37.1       | <i>Lipomyces yamadae</i>             | CBS 7532        | AB747676              | 919/927(99%)                               | 0/927(0%)   |
|               | <i>Lipomyces yarrowii</i>            | CBS 7557        | AB747677              | 909/928(98%)                               | 0/928(0%)   |
| LSA37.2       | <i>Lipomyces yarrowii</i>            | CBS 7557        | AB747677              | 855/896(95%)                               | 0/896(0%)   |
|               | <i>Lipomyces yamadae</i>             | CBS 7532        | AB747676              | 853/896(95%)                               | 0/896(0%)   |
| LSA42.1       | <i>Lipomyces kononenkoae</i>         | CBS 2514        | AB747667              | 915/928(99%)                               | 1/928(0%)   |
|               | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i>   | CBS 5608        | DQ496132              | 892/929(96%)                               | 1/929(0%)   |
| LSA46.2       | <i>Lipomyces kononenkoae</i>         | CBS 2514        | AB747667              | 664/674(99%)                               | 0/674(0%)   |
|               | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i>   | CBS 5608        | DQ496132              | 646/674(96%)                               | 0/674(0%)   |
| LSA66.1_r     | <i>Lipomyces kononenkoae</i>         | CBS 2514        | AB747667              | 543/556(98%)                               | 0/556(0%)   |
|               | <i>Lipomyces yamadae</i>             | CBS 7532        | AB747676              | 540/556(97%)                               | 0/556(0%)   |



---

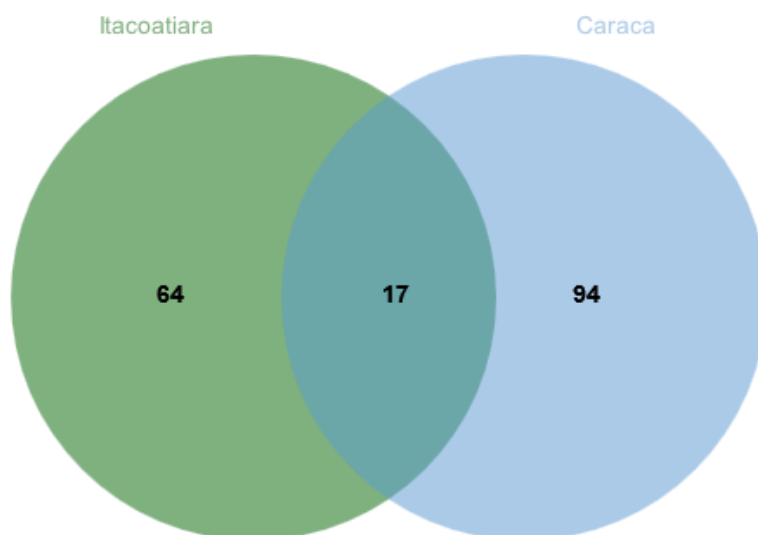
| <b>Código</b> | <b>Espécie descrita mais próxima</b> | <b>Linhagem</b> | <b>Acesso Genbank</b> | <b>Identidade EF1- <math>\alpha</math></b> | <b>Gaps</b> |
|---------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------------|--|-------------|
| LSA70.1       | <i>Lipomyces kononenkoae</i>         | CBS 2514        | AB747667              | 689/698(99%)                               | 0/698(0%)   |
|               | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i>   | CBS 5608        | DQ496132              | 672/699(96%)                               | 0/699(0%)   |

---

### 5.3 Comparação entre a comunidade de leveduras isoladas de solos coletados na RPPN Santuário do Caraça e a comunidade de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas em Itacoatiara – AM.

Em relação aos isolados de leveduras obtidos por metodologia de enriquecimento, comparando-se os diferentes locais de coleta, um maior número de espécies foi observado na comunidade de leveduras isolada na RPPN Santuário do Caraça (111 espécies.). Nesse local também foi coletado um maior número de amostras de solo (90 amostras, frente a 80 amostras coletadas em Itacoatiara). Pouco compartilhamento de espécies foi observado (figura 35) e apenas 17 espécies foram isoladas nos dois locais de coleta (*Candida albicans*, *C. melibiosica*, *Candida* sp. (próxima a *C. inulinophila*), *Candida* sp. (próxima a *C. californica*), *Candida* sp. (próxima a *C. thaimueangensis*), *Cyberlindnera subsufficiens*, *Kazachstania saulgeensis*, *Schwanniomyces polymorphus*, *Schwanniomyces vanrijiae*, *Sugiyamaella smithiae*, *Yamadazyma* sp. (próxima a *C. vrieseae*), *Apiotrichum laibachii*, *Papiliotrema flavescens*, *Papiliotrema laurentii*, *Papiliotrema* sp. (próxima a *P. fuscus*), *Papiliotrema* sp. (próxima a *P. laurentii*) e *Saitozyma podzolica*).

Figura 35 - Compartilhamento de espécies entre as comunidades de leveduras isoladas de amostras de solo coletadas na RPPN Santuário do Caraça e em Itacoatiara – AM, por metodologia de enriquecimento em meio YNB + 8% de glicose.



## 6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O grande número de espécies diferentes de leveduras recuperadas a partir das amostras de solo reforça a afirmativa de que habitats complexos (com maior diversidade de microhabitats) e pouco explorados podem abrigar grande número de espécies não descritas (YURKOV. *et al.*, 2012). Ao contrário dos resultados obtidos em estudos de diversidade de leveduras de solos de climas temperados, a riqueza de espécies encontrada na comunidade de leveduras tanto da RPPN Serra do Caraça quanto em Itacoatiara - AM foi elevada. Apesar disso, as curvas de cobertura de amostra para as duas localidades, em todos os sítios de coleta, mostram que muitas espécies poderiam ainda ser descobertas com maior esforço amostral.

Resultados sobre a dominância de leveduras Ascomycota ou Basidiomycota em amostras de solo são divergentes. Na maioria dos estudos de diversidade de leveduras de regiões de clima boreal e temperado, as leveduras basidiomicéticas são mais frequentes e abundantes (MAŠÍNOVÁ; YURKOV; BALDRIAN, 2018; YURKOV, 2017). Já para amostras de solos de regiões tropicais, nos principais estudos realizados no Brasil, há dominância de leveduras ascomicéticas (CARVALHO *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2020; MOREIRA; VALE, 2018; SALGADO VITAL *et al.*, 2002). Contudo, a maior parte desses estudos utilizam metodologias de isolamento baseadas em enriquecimento em meio líquido rico em glicose, o que pode favorecer o isolamento de algumas poucas espécies fermentadoras do Filo Ascomycota (YURKOV, 2017). Apesar disso, estudos baseados em métodos independentes de cultivo mostram dominância de ascomicetos em solos de floresta em regiões tropicais. Dunthorn *et al.* (2017) encontraram um percentual de 63,8% de *reads* (fragmentos de DNA) e 37% em OTU (*Operational Taxonomic Unit* = Unidade Taxonômica Operacional) de Saccharomycotina em amostras de solo em florestas tropicais em Costa Rica, Equador e Panamá. No presente trabalho, espécies de leveduras ascomicetas corresponderam a 66% do total de espécies na RPPN Serra do Caraça em Minas Gerais e 72% em Itacoatiara no Amazonas. Dunthorn *et al.* (2017) hipotetizaram que a grande predominância de leveduras ascomicetas em amostras de solos tropicais poderia ser explicada devido à condição de anoxia do solo em resultado às frequentes inundações causadas pelas altas taxas de precipitação típicas de regiões tropicais. Esse fenômeno causaria alterações na microbiota do solo e inclusive alteraria funções do ecossistema tais como ciclagem do carbono e nitrogênio. Essa frequente anoxia favoreceria formas unicelulares de fungos, principalmente quando açúcares simples estariam amplamente disponíveis pelo rápido *turnover* do carbono do solo. Uma outra hipótese levantada pelos autores é a de que, considerando o arranjo vertical das florestas, dos solos às copas das árvores,

a presença de outros habitats nas florestas tropicais tais como as inúmeras flores e frutos em diferentes estágios de maturação, folhas de plantas, talos de líquens e madeira em decomposição etc., representam inúmeros nichos ecológicos para o crescimento e promoção de fungos unicelulares e esses seriam transportados para o solo por meio das frequentes chuvas características dessas regiões.

Sobre a distribuição das comunidades em relação aos gêneros de leveduras, os gêneros mais frequentes em ambas as regiões estudadas (*Apiotrichum*, *Papiliotrema*, *Schwanniomyces*, *Nakaseomyces*, *Saitozyma* e espécies atribuídas a *Candida* já foram relatados em solos de floresta (CECILIA MESTRE et al., 2011; GLUSHAKOVA et al., 2017; GLUSHAKOVA; KACHALKIN; CHERNOV, 2015; SLÁVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ, 2000; YURKOV, A. M.; KEMLER; BEGEROW, 2012; YURKOV, 2018; YURKOV et al., 2016). Os maiores valores de riqueza e diversidade de leveduras foram observados na comunidade da RPPN Serra do Caraça. A realização de coletas em diferentes épocas do ano nessa localidade (frente a uma única coleta realizada em Itacoatiara) seria uma possível explicação para essa diferença. Além disso, a Serra do Caraça está localizada em uma zona de transição (ecótono) entre Cerrado e Mata Atlântica, e a influência da flora e fauna desses dois biomas pode ter impactado positivamente nos índices de riqueza e diversidade obtidos para a comunidade de leveduras isoladas.

O uso de diferentes metodologias de isolamento (direto e enriquecimento), aliado ao uso de diferentes temperaturas de isolamento também teve impacto nos valores de diversidade obtidos nas comunidades estudadas. Em todas as coletas, grande número de espécies foi exclusivamente isolada em cada uma das temperaturas testadas, e ao combinar toda a riqueza de espécies isoladas nas três temperaturas, altos valores de riqueza e diversidade foram obtidos nos locais de coleta. Em particular, a temperatura de isolamento de 35°C teve influência estatisticamente significativa na diversidade beta observada nas comunidades. Esse evento pode ser explicado pela unicidade da composição de espécies das comunidades isoladas nessa temperatura, uma vez que é bastante restritiva para o crescimento de leveduras. De maneira geral, essas comunidades apresentaram baixa riqueza e diversidade de espécies; fatores que, aliados à singularidade da composição de espécies dessas comunidades, fazem com que a comunidade isolada nessa temperatura aumente os valores de diversidade beta dos locais de coleta. O mesmo ocorreu com as diferentes metodologias de isolamento (isolamento direto *versus* enriquecimento) com a comunidade de leveduras isolada de Itacoatiara. Na análise em que foi feita a comparação dos valores de diversidade das comunidades obtidas pelas duas

metodologias, observou-se diferença significativa entre as duas metodologias. Nesse caso, uma maior diversidade foi obtida com metodologia de isolamento por enriquecimento. O uso de outros meios para o isolamento também impactou positivamente o valor de diversidade obtido. Espécies de *Lipomyces*, tidas como residentes permanentes do solo e de distribuição cosmopolita (BOTHÁ, 2011) apenas foram isoladas a partir do uso de meio seletivo (YCB + 0,1% de cicloheximida), apesar de estarem presentes em 36 das oitenta amostras coletadas.

A metodologia utilizada para o isolamento teve grande influência na identidade das linhagens de leveduras isoladas. Em Itacoatira, onde todas as amostras foram processadas nas duas metodologias, no isolamento pela técnica de espalhamento em placa de diluições de suspensões das amostras de solo (isolamento direto) ocorreu predomínio de espécies de Basidiomycota (67%). Quando utilizada a metodologia de enriquecimento, 72% das espécies recuperadas foram do filo Ascomycota. Para os diferentes sítios de coleta, os valores de riqueza e diversidade foram muito menores em comparação aos obtidos pelo isolamento por enriquecimento. O número de espécies possivelmente novas também foi bem menor na metodologia de isolamento direto (15, em comparação a 30 pelo enriquecimento). Para estudos de diversidade de leveduras de filoplano conduzidos na Tailândia, Limtong et al., (2017) observaram que o uso de metodologia de enriquecimento favorece o isolamento de um pequeno grupo de ascomicetos. A incubação em temperaturas mais elevadas ( $30 \pm 2$  °C) também favorece o isolamento de maior proporção de leveduras ascomicéticas em comparação ao maior número de basidiomicetos isolados quando o isolamento de leveduras é realizado com meios incubados a 25 °C. Em estudo de diversidade de leveduras isoladas de substratos naturais ao longo do continente estadunidense, Spurley et al., (2021) notaram forte influência da temperatura de incubação no Filo das leveduras recuperadas. Dentre as espécies isoladas a 4 °C, todas foram do Filo Basidiomycota e todas do gênero *Mrakia*. Já para a temperatura de isolamento de 10 °C, cinco OTUs - quatro dos quais Basidiomycota -, foram significativamente associados (*Cystofilobasidium capitatum*, *Mr. gelida*, *Mrakia* spp, *Cu. cygneicollum* e *C. sake*, a única espécie Ascomycota). Para a temperatura de isolamento de 30 °C, foi encontrada uma associação significativa para as espécies *Kluyveromyces marxianus*, *L. kluyveri*, *C. pseudolambica*, *Torulaspora delbrueckii* e espécies do complexo *Mets. pulcherrima*. Já para a temperatura de isolamento de 25 °C nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada. Sendo assim, de acordo com os autores, isolamento a baixas temperaturas (4 e 10 °C) favorece o isolamento de espécies Basidiomycota e temperaturas de isolamento mais elevadas (30 °C) favorece o isolamento de espécies de Saccharomycotina.

Em ambas as regiões estudadas, a maior parte das comunidades foi composta por singletos (espécies com apenas um isolado) e espécies exclusivamente isoladas em um só ponto de coleta ou em apenas uma das temperaturas de isolamento testadas. A análise de partição da diversidade mostrou altas taxas de substituição de espécies (*turnover*) e baixo compartilhamento (aninhamento), o que significa que ocorreu grande substituição de espécies entre os pontos de coleta, mas sem diminuição da diversidade. Yurkov *et al.* (2016), em estudo de diversidade de leveduras do solo conduzido no Parque Natural da Arrábida (Portugal), observaram uma distribuição irregular da riqueza de espécies de leveduras entre os locais de amostragem, e consideraram que a distribuição da riqueza de leveduras no solo é fragmentada, com baixa riqueza ao se considerar individualmente um sítio de coleta, mas altos índices de diversidade aos se considerar todos os pontos de coleta da região como um todo. Devido à heterogeneidade dos solos, é de se esperar que a abundância e a riqueza de espécies de leveduras sejam desigualmente distribuídas e apresentem uma variação temporal relativa às condições ambientais (como por exemplo manejo do solo, precipitação, variações climáticas, influência de plantas e animais etc.), que estão em constante mudança (BOTHÁ, 2006; SLÁVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ, 2000, 2003). Esse comportamento na distribuição da riqueza das espécies de leveduras também foi observado em escala temporal, ao longo das seis diferentes coletas realizadas na RPPN Santuário do Caraça, onde ocorreu baixo compartilhamento de espécies quando comparadas as seis coletas realizadas. Um número mais baixo de riqueza de espécies foi observado ao se considerar cada coleta individualmente (média de 33 espécies por coleta), em comparação ao total de 111 espécies obtidas no somatório das seis coletas. Apesar dos valores de riqueza e diversidade (Shannon e Simpson) não variarem muito entre as coletas, o grande número de espécies exclusivamente isoladas em cada coleta mostra a importância de múltiplas coletas para a determinação da biodiversidade.

O grande número de possíveis espécies novas encontradas em ambas as regiões estudadas mostra o quanto a diversidade de leveduras associadas ao solo é pouco estudada. Por exemplo o isolamento de 38 isolados da possível espécie nova *Candida* sp.1 (clado *C. thaimueangensis*) nas duas regiões de coleta (separadas por aproximadamente 2.600 Km; Caraça e Itacoatiara) em diferentes temperaturas e metodologias de isolamento é uma forte evidência de que esta espécie esteja distribuída pelo território brasileiro e ocupe um nicho ecológico semelhante nestes solos. Todos os isolados de *Lipomyces* obtidos representam possíveis espécies novas. Apesar disso, poucas espécies de leveduras do gênero *Lipomyces* já foram isoladas de amostras de solo coletadas no Brasil (MOREIRA; VALE, 2018; SALGADO

VITAL *et al.*, 2002). A metodologia de isolamento pode ser o principal fator militante para a obtenção de linhagens de *Lipomyces* a partir de amostras do solo. O uso de meios de cultura sem fontes de nitrogênio acrescido de 0,1% de cicloheximida é sugerido por NAGANUMA *et al.*, (1999) para o isolamento de *Lipomyces* e espécies relacionadas (*Mixozyma* e *Badjevia*). Este é o primeiro relato na literatura do uso de tal metodologia para o isolamento de espécies de *Lipomyces* a partir de amostras de solo coletadas no Brasil.

Neste estudo foi testada a capacidade das leveduras de produzir enzimas extracelulares, incluindo celulasas, xilanase, pectinase, amilase, protease e lipase. Duzentos e cinquenta dos 279 isolados de levedura exibiram produção de pelo menos uma enzima extracelular. JAIBOON *et al.*, (2016) mostraram que todas as 65 linhagens de levedura associadas à floresta de turfa na Tailândia produziram pelo menos uma enzima extracelular. A capacidade de produzir enzimas hidrolíticas (celulasas, xilanases e pectinases) permite que as linhagens de leveduras participem diretamente da decomposição do material vegetal (CADETE; LOPES; ROSA, 2017)

A atividade enzimática foi avaliada para leveduras de solo coletadas no ecossistema do Cerrado por CARVALHO *et al.*, (2013), onde a atividade de xilanase e celulase foi detectada em 7,8% e 5,8% do total de linhagens testadas, respectivamente, e esterase foi a atividade enzimática mais expressa. No presente trabalho, xilanase e pectinase foram as atividades enzimáticas mais expressas (44,4 e 39,4 %, respectivamente). A esterase foi produzida por 36,5% dos isolados, sendo a 4ª atividade enzimática mais expressa. *Papiliotrem laurentii* foi a única espécie capaz de produzir todas as enzimas testadas. O perfil de atividade enzimática apresentado por *P. laurentii* provavelmente confere a esta espécie uma vantagem ecológica na colonização do solo, uma vez que essa também foi a única espécie isolada de todos os locais de coleta por metodologia de isolamento direto.

Microrganismos que são capazes de solubilizar o fósforo desempenham um papel na promoção do crescimento e produtividade das plantas, aumentando sua disponibilidade no solo (FANKEM *et al.*, 2006; FU *et al.*, 2016). O fósforo é um dos nutrientes mais importantes na limitação da produção vegetal e, apesar de ser ampla e abundantemente distribuído no solo em suas formas inorgânica e orgânica, muitos solos em todo o mundo são deficientes em fósforo (XIAO *et al.*, 2013). Muitos microrganismos do solo, particularmente aqueles que colonizam a rizosfera das plantas, são capazes solubilizar fosfatos inorgânicos insolúveis através da produção de ácidos orgânicos, fosfatases ou outros agentes complexos., tornando-os disponíveis para as raízes das plantas (HAYAT *et al.*, 2010). A solubilização *in vitro* do fosfato

já foi observada em algumas espécies de leveduras, tais como *Candida railenensis*, *Clavispora lusitaniae*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Symmetrospora coposmae* (Sarabia *et al.*, 2018); *Candida tropicalis*, *Geotrichum candidum*, *G. capitatum*, *Rhodothorula minuta* e *R. rubra* (Al-Falih, 2005). No presente trabalho, a capacidade de solubilizar fosfato foi observada em 38,35% dos isolados; em destaque, 14 dos 14 isolados testados da espécie *Nakaseomyces* sp; nove dos 10 isolados de *M. caribbica* e seis dos sete isolados testado de *Candida* sp.5 foram capazes de solubilizar fosfato, o que pode indicar um possível papel ecológico desses microrganismos no solo.

As análises de diversidade beta avaliam as diferenças observadas na composição de espécies entre as comunidades estudadas. No presente trabalho foram calculadas as taxas de *turnover* (que mede a substituição de espécies entre os pontos de coleta) e as taxas de aninhamento (que mede a perda de espécies entre os locais). Em ambas as comunidades estudadas observou-se as altas taxas de *turnover* e o pouco aninhamento de espécies. Isso significa que houve grande variação na composição da comunidade entre os pontos de coleta, mas sem perda de riqueza e diversidade de espécies. Mais estudos são necessários para se determinar se essa variação na composição de espécies está relacionada à influência de fatores ambientais (precipitação, características do solo etc.) ou se essa diferença na composição de espécies de leveduras na comunidade é devida às espécies transitórias (originárias de material vegetal e de atividade de animais). Estudos para a determinação do papel ecológico dessas espécies no ambiente poderiam fornecer evidências necessárias para determinar se essas são verdadeiramente pedobiontes (adaptadas a viver no solo).



## 7 CONCLUSÕES

Os solos da RPPN Santuário do Caraça e de Itacoatira – AM abrigam comunidades de leveduras com alta diversidade e riqueza de espécies, além de serem fonte de espécies de leveduras ainda não descritas pela ciência. Apesar disso, há poucos estudos na literatura sobre a diversidade de levedura em solos brasileiros.

A diversidade de leveduras no solo pode refletir a diversidade de leveduras presentes no ambiente uma vez que elas podem ser carreadas para o solo a partir de outros substratos que compõem o ecossistema (tais como folhas de plantas, frutas, flores e madeira, animais etc.). Dessa maneira, o desmatamento e fragmentação dos habitats pode influenciar a diversidade de leveduras encontrada nos solos. Estudos futuros devem preferencialmente ser realizados em habitats naturais ou pouco manejados.

O uso de diferentes temperaturas para o isolamento de leveduras, assim como diferentes metodologias, meios de cultivo e a realização de múltiplas coletas impactaram positivamente os valores de riqueza e diversidade das comunidades de leveduras recuperadas de amostras de solo no presente estudo. Como a riqueza de espécies em amostras de solo parece estar fragmentada, é importante um bom planejamento de amostragem e de metodologia de isolamento para a avaliação da biodiversidade nesse substrato.

A espécie *Phaffia brasiliiana* sp. nov. foi descrita com base em isolados obtidos na RPPN Santuário do Caraça. Esse é o primeiro relato do isolamento de uma espécie desse gênero em ambiente tropical. A região da Serra do Caraça apresenta temperatura média anual baixa (em torno de 20 °C) e essa característica do ambiente, aliada à capacidade de *P. brasiliiana* de crescer a 30-32°C são possíveis razões para explicar a presença de tal espécie nesse ecossistema.

Há grande diversidade de espécies de *Lipomyces* nos solos brasileiros. Contudo, é necessária a utilização de meio de cultura específico para o isolamento desses microrganismos.

Leveduras isoladas a partir de amostra de solo têm potencial aplicação biotecnológica como produção de enzimas, mineralização de composto insolúveis e uso como controle biológico. Um total de 968 isolados de leveduras obtidos nesse estudo está depositado na Coleção de Microrganismos e Células da UFMG e disponível para futuros estudos, tanto ecológicos como de aplicações biotecnológicas.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABREU, A. C. L. de. **Plano de Manejo da RPPN “Santuário do Caraça” Minas Gerais.** [S. l.: s. n.], 2013.
- ALTSCHUL, S F *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254694>.
- BASELGA, A. The relationship between species replacement, dissimilarity derived from nestedness, and nestedness. **Global Ecology and Biogeography**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 1223–1232, 2012.
- BOEKHOUT, T. *et al.* The evolving species concepts used for yeasts: from phenotypes and genomes to speciation networks. **Fungal Diversity 2021 109:1**, [s. l.], v. 109, n. 1, p. 27–55, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13225-021-00475-9>. Acesso at: 3 Oct. 2022.
- BOONTHAM, W. *et al.* *Limtongozyma siamensis* gen. nov., sp. nov., a yeast species in the saccharomycetales and reassignment of *Candida cylindracea* to the genus *Limtongozyma*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 70, n. 1, p. 199–203, 2020.
- BOTHA, A. The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 1–8, 2011. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071710003718>. Acesso at: 24 Oct. 2018.
- BOTHA, A. Yeasts in Soil. *In: BIODIVERSITY AND ECOPHYSIOLOGY OF YEASTS*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. p. 221–240. *E-book*. Disponível em: [http://link.springer.com/10.1007/3-540-30985-3\\_11](http://link.springer.com/10.1007/3-540-30985-3_11). Acesso at: 18 Nov. 2018.
- BOTHA, A. Yeasts in Soil. *In: BIODIVERSITY AND ECOPHYSIOLOGY OF YEASTS*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, [s. d.]. p. 221–240. *E-book*. Disponível em: [http://link.springer.com/10.1007/3-540-30985-3\\_11](http://link.springer.com/10.1007/3-540-30985-3_11). Acesso at: 24 Oct. 2018.
- BUZZINI, P.; LACHANCE, M. A.; YURKOV, A. **Yeasts in natural ecosystems: Diversity**. Cham: Springer International Publishing, 2017-. ISSN 1664302X. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-62683-3>. Acesso at: 24 Oct. 2018.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 93, n. 6, p. 1020–1025, 2002. Disponível em: Acesso at: 28 Jun. 2021.
- CADETE, R. M.; LOPES, M. R.; ROSA, C. A. Yeasts associated with decomposing plant material and rotting wood. *In: YEASTS IN NATURAL ECOSYSTEMS: DIVERSITY*. [S. l.]: Springer, 2017. p. 265–292.
- CANELAS, M. A. S.; BERTOLUCI, J. Anurans of the Serra do Caraça, southeastern Brazil: species composition and phenological patterns of calling activity. **Iheringia. Série Zoologia**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 21–26, 2007. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0073-47212007000100004&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-47212007000100004&lng=en&tlng=en). Acesso at: 11 Nov. 2018.

- CARVALHO, F. P. *et al.* Yeasts diversity in Brazilian Cerrado soils: Study of the enzymatic activities. **African Journal of Microbiology Research**, [s. l.], v. 7, n. 32, p. 4176–4190, 2013. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/AJMR/abstracts/abstracts/abstracts2013/9Aug/Carvalho%20et%20al2.htm>. Acesso at: 24 Oct. 2018.
- CECILIA MESTRE, M. *et al.* Yeast communities associated with the bulk-soil, rhizosphere and ectomycorrhizosphere of a *Nothofagus pumilio* forest in northwestern Patagonia, Argentina. **FEMS Microbiology Ecology**, [s. l.], v. 78, n. 3, p. 531–541, 2011. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2011.01183.x>. Acesso at: 20 Nov. 2018.
- CHAO, A. *et al.* Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: A framework for sampling and estimation in species diversity studies. **Ecological Monographs**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 45–67, 2014.
- CHERNOV, I. I. [The latitude-zonal and spatial-successional trends in the distribution of yeasts]. **Zhurnal obshchei biologii**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 123–135, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15859449>. Acesso at: 14 Nov. 2018.
- COSTA, M. S. F. Diversidade de leveduras do solo do SEMI-ÁRIDO da BAHIA, BRASIL. [s. l.], 2006. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/12811>. Acesso at: 24 Oct. 2018.
- DANIEL, H. M.; LACHANCE, M. A.; KURTZMAN, C. P. On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 106, n. 1, p. 67–84, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24748333>. Acesso at: 17 Sep. 2014.
- DE VEGA, C. *et al.* Flowers as a reservoir of yeast diversity: description of *Wickerhamiella nectarea* f.a. sp. nov., and *Wickerhamiella natalensis* f.a. sp. nov. from South African flowers and pollinators, and transfer of related *Candida* species to the genus *Wickerhamiella* as. **FEMS yeast research**, [s. l.], v. 17, n. 5, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsyr/article/17/5/fox054/3966713>.
- DEAK, T. **Environmental Factors Influencing Yeasts**. [S. l.: s. n.], 2006-. ISSN 1098-6596.
- DIAZ, M. R. *et al.* Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. **Systematic and Applied Microbiology**, [s. l.], 2000.
- DIAZ, M. R.; FELL, J. W. Molecular analyses of the IGS and ITS regions of rDNA of the psychrophilic yeasts in the genus *Mrakia*. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, [s. l.], 2000.
- 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**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 1351–1371, 2000.

- FELL, J. W.; BLATT, G. M. Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA IGS and ITS sequence analysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], 1999.
- GLUSHAKOVA, A. M. *et al.* Distribution of yeast complexes in the profiles of different soil types. **Eurasian Soil Science**, [s. l.], v. 50, n. 7, p. 820–825, 2017.
- GLUSHAKOVA, A. M.; KACHALKIN, A. v.; CHERNOV, I. Yu. Soil yeast communities under the aggressive invasion of Sosnowsky's hogweed (*Heracleum sosnowskyi*). **Eurasian Soil Science**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 201–207, 2015. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1134/S1064229315020040>. Acesso at: 24 Oct. 2018.
- GROTH, G.; HANSEN, J.; PISKUR, J. A natural chimeric yeast containing genetic material from three species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [s. l.], 1999.
- HAYAT, R. *et al.* Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 4, p. 579–598, 2010.
- HOFFMAN, C. S.; WOOD, V.; FANTES, P. A. An ancient yeast for young geneticists: A primer on the *Schizosaccharomyces pombe* model system. **Genetics**, [s. l.], v. 201, n. 2, p. 403–423, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26447128>. Acesso at: 20 Nov. 2018.
- HSIEH, T. C.; MA, K. H.; CHAO, A. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). **Methods in Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 1451–1456, 2016. Disponível em: <https://chao.shinyapps.io/iNEXT/>.
- JAIBOON, K. *et al.* Yeasts from peat in a tropical peat swamp forest in Thailand and their ability to produce ethanol, indole-3-acetic acid and extracellular enzymes. **Mycological Progress**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 755–770, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11557-016-1205-9>.
- JOST, L. Entropy and diversity. **Oikos**, [s. l.], v. 113, n. 2, p. 363–375, 2006. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.2006.0030-1299.14714.x>. Acesso at: 20 Sep. 2021.
- JUNKER, K. *et al.* The mycoparasitic yeast *Saccharomycopsis schoenii* predated and kills multi-drug resistant *Candida auris*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2018.
- KHUNNAMWONG, P. *et al.* Description of *diutina* gen. nov. *diutina siamensis*, f.a. Sp. Nov. and reassignment of *Candida catenulata*, *Candida mesorugosa*, *Candida neorugosa*, *Candida pseudorugosa*, *Candida ranongensis*, *Candida rugosa* and *Candida scorzettiae* to the genus *diutina*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 65, n. 12, p. 4701–4709, 2015. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.000634>. Acesso at: 3 Oct. 2022.
- KUMAR, R. *et al.* A novel and sensitive plate assay for screening of tannase-producing bacteria. **Annals of Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 177–179, 2010.
- KURTZMAN, C. P. Description of *Groenewaldozyma* gen. nov. for placement of *Candida auringiensis*, *Candida salmanticensis* and *Candida tartarivorans*. **Antonie van Leeuwenhoek**,

[*s. l.*], v. 109, n. 7, p. 1041–1045, 2016. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27142089>. Acesso at: 18 Nov. 2018.

KURTZMAN, C. P. Description of *Martiniozyma* gen. nov. and transfer of seven *Candida* species to *Saturnispora* as new combinations. **Antonie van Leeuwenhoek**, [*s. l.*], v. 108, n. 4, p. 803–809, 2015. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-015-0536-x>. Acesso at: 18 Nov. 2018.

KURTZMAN, C. P. *et al.* Four new species of *Metschnikowia* and the transfer of seven *Candida* species to *Metschnikowia* and *Clavispora* as new combinations. **Antonie van Leeuwenhoek**, [*s. l.*], v. 111, n. 11, p. 2017–2035, 2018. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-018-1095-8>.

KURTZMAN, C. P. *et al.* Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. *In*: THE YEASTS. [*S. l.: s. n.*], 2011. v. 1.

KURTZMAN, C. P. Yeast species recognition from gene sequence analyses and other molecular methods. **Mycoscience**, [*s. l.*], v. 47, n. 2, p. 65–71, 2006. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1340354006704193>. Acesso at: 1 Oct. 2014.

KURTZMAN, C. P.; ALBERTYN, J.; BASEHOAR-POWERS, E. Multigene phylogenetic analysis of the Lipomycetaceae and the proposed transfer of *Zygozyma* species to *Lipomyces* and *Babjevia anomala* to *Dipodascopsis*. **FEMS Yeast Research**, [*s. l.*], v. 7, n. 6, p. 1027–1034, 2007.

KURTZMAN, C. P.; BOEKHOUT, T. Yeasts as Distinct Life Forms of Fungi. *In*: YEASTS IN NATURAL ECOSYSTEMS: ECOLOGY. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 1–37. *E-book*. Disponível em: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-61575-2\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-61575-2_1). Acesso at: 20 Nov. 2018.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. Definition, classification and nomenclature of the yeasts. *In*: THE YEASTS. [*S. l.: s. n.*], 2011. v. 1, p. 3–5. Disponível em: Acesso at: 24 Oct. 2018.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J.; BLACKWELL, M. Description of *teuomyces* gen. nov. for the *Candida kruisii* clade, *Suhomyces* gen. nov. for the *Candida tanzawaensis* clade and *Suhomyces kilbournensis* sp. nov. **FEMS Yeast Research**, [*s. l.*], v. 16, n. 5, p. fow041, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27188882>. Acesso at: 18 Nov. 2018.

KURTZMAN, C. P.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. **Mycoscience**, [*s. l.*], v. 51, n. 1, p. 2–14, 2010.

LACHANCE, M.-A. *et al.* *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. **Canadian Journal of Microbiology**, [*s. l.*], 1999.

LACHANCE, M.-A. Yeasts. *In*: ELS. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2011. *E-book*. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470015902.a0000380.pub2>. Acesso at: 1 Oct. 2014.

- LACHANCE, M.-A.; STARMER, W. T. Ecology and yeasts. *In*: THE YEASTS. [S. l.: s. n.], 1998.
- LACHANCE, M.-A.; WALKER, G. M. Yeasts. *In*: ELS. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2018. p. 1–13. *E-book*. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470015902.a0000380.pub3>. Acesso at: 24 Oct. 2018.
- LEGENDRE, P. Interpreting the replacement and richness difference components of beta diversity. [s. l.], 2014. Disponível em: <http://wileyonlinelibrary.com/journal/geb>.
- LEGENDRE, P.; DE CÁCERES, M. Beta diversity as the variance of community data: Dissimilarity coefficients and partitioning. **Ecology Letters**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 951–963, 2013.
- LEGUINA, A. C. del v *et al.* Copper alters the physiology of tomato rhizospheric isolates of *Papiliotrema laurentii*. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 243, p. 376–384, 2019.
- LI, A. H. *et al.* Diversity and phylogeny of basidiomycetous yeasts from plant leaves and soil: Proposal of two new orders, three new families, eight new genera and one hundred and seven new species. **Studies in Mycology**, [s. l.], v. 96, p. 17–140, 2020.
- LIBKIND, D. *et al.* Into the wild: new yeast genomes from natural environments and new tools for their analysis. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 20, n. 2, 2020a. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsyr/article/20/2/foaa008/5721244>. Acesso at: 19 Sep. 2021.
- LIBKIND, D. *et al.* Towards yeast taxogenomics: lessons from novel species descriptions based on complete genome sequences. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 20, n. 6, 2020b. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsyr/article/20/6/foaa042/5876348>. Acesso at: 19 Sep. 2021.
- LIMTONG, S.; NASANIT, R. Phylloplane yeasts in tropical climates. *In*: YEASTS IN NATURAL ECOSYSTEMS: DIVERSITY. [S. l.]: Springer, 2017. p. 199–223.
- LIU, X. Z. *et al.* Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. **Studies in Mycology**, [s. l.], v. 81, p. 85–147, 2015.
- LOPES, M. R. *et al.* *Scheffersomyces stambukii* f.a., sp. nov., a d-xylose-fermenting species isolated from rotting wood. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 68, n. 7, p. 2306–2312, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29786499>. Acesso at: 18 Nov. 2018.
- MAKSIMOVA, I. A.; CHERNOV, I. Y. Community structure of yeast fungi in forest biogeocenoses. **Microbiology**, [s. l.], 2004.
- MAŠÍNOVÁ, T. *et al.* Drivers of yeast community composition in the litter and soil of a temperate forest. **FEMS microbiology ecology**, [s. l.], v. 93, n. 2, p. 1–10, 2017.
- MESTRE, M. C.; FONTENLA, S.; ROSA, C. a. Ecology of cultivable yeasts in pristine forests in northern Patagonia (Argentina) influenced by different environmental factors. **Canadian journal of microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 371–382, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24849380>.

- MESTRE, M. C.; ROSA, C. A.; FONTENLA, S. B. *Lindnera rhizosphaerae* sp. nov., a yeast species isolated from rhizospheric soil. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, [s. l.], v. 61, n. 4, p. 985–988, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20418411>. Acesso at: 20 Nov. 2018.
- MOK, W. Y. *et al.* Ecology of pathogenic yeasts in Amazonian soil. **Applied and environmental microbiology**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 390–394, 1984. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6538774>. Acesso at: 7 Nov. 2018.
- MOREIRA, G. A. M.; DO VALE, H. M. M. Soil yeast communities in revegetated post-mining and adjacent native areas in central Brazil. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 1–18, 2020.
- MOREIRA, G. A. M.; VALE, H. M. M. do. Occurrence of Yeast Species in Soils under Native and Modified Vegetation in an Iron Mining Area. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s. l.], v. 42, n. 0, p. 1–15, 2018.
- NAGANUMA, T. *et al.* An Improved Method for Isolating Yeasts in the Genus *Lipomyces* and Related Genera from Soil. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 195–198, 1999.
- NORVELL, L. L. Fungal nomenclature. 1. Melbourne approves a new C. **Mycotaxon**, [s. l.], 2011.
- PAUL, E. A. The nature and dynamics of soil organic matter: Plant inputs, microbial transformations, and organic matter stabilization. **Soil Biology and Biochemistry**, [s. l.], v. 98, p. 109–126, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.04.001>.
- PÉTER, G.; TAKASHIMA, M.; ČADEŽ, N. Yeast Habitats: Different but Global. *In*: YEASTS IN NATURAL ECOSYSTEMS: ECOLOGY. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 39–71. *E-book*. Disponível em: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-61575-2\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-61575-2_2). Acesso at: 20 Nov. 2018.
- PIKOVSKAYA, R. I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. **Mikrobiologiya**, [s. l.], v. 17, p. 362–370, 1948.
- RIBEIRO, L. R. *et al.* Description of *Hyphopichia buzzinii* f.a., sp. nov. and *Hyphopichia homilentoma* comb. nov., the teleomorph of *Candida homilentoma*. **Antonie van Leeuwenhoek**, [s. l.], v. 110, n. 7, p. 985–994, 2017. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-017-0870-2>. Acesso at: 12 Nov. 2018.
- SALGADO VITAL, M. J. *et al.* Mycocinogenic yeasts isolated from amazon soils of the marac?? ecological station, Roraima-Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 230–235, 2002.
- SANTOS, A. R. O. *et al.* *Starmerella camargoi* f.a., sp. nov., *Starmerella ilheusensis* f.a., sp. nov., *Starmerella litoralis* f.a., sp. nov., *Starmerella opuntiae* f.a., sp. nov., *Starmerella roubikii* f.a., sp. nov. and *Starmerella vitae* f.a., sp. nov., isolated from flowers and bees, and transfer of related *Candida* species to the genus *Starmerella* as new combinations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 68, n. 4, p. 1333–1343, 2018. Disponível em:

<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.002675>. Acesso at: 12 Nov. 2018.

SANYAL, A. *et al.* Metabolic activity and bioweathering properties of yeasts isolated from different supraglacial environments of Antarctica and Himalaya. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 113, n. 12, p. 2243–2258, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01496-1>.

SATOH, K. *et al.* *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. **Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 41–44, 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1348-0421.2008.00083.x>.

SHEN, X.-X. *et al.* Tempo and Mode of Genome Evolution in the Budding Yeast Subphylum. **Cell**, [s. l.], 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867418313321>. Acesso at: 21 Nov. 2018.

SHIN, K. S. *et al.* *Candida thermophila* sp. nov., a novel thermophilic yeast isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], 2001.

SILVA, J. M. L. da. Levantamento de Reconhecimento de Alta Intensidade dos Solos do Município de Itacoatiara - Estado do Amazonas. **Embrapa Amazônia Oriental**, [s. l.], v. Documentos, p. 56, 2007. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/65319/1/Oriental-Doc172.pdf>.

SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R. The diversity of yeasts in the agricultural soil. **J. Basic Microbiol**, [s. l.], v. 43, p. 430–436, 2003.

SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R. **The occurrence of yeasts in the forest soils**. **J. Basic Microbiol**. [S. l.: s. n.], 2000.

STARMER, W. T.; LACHANCE, M.-A. Yeast Ecology. **The Yeasts**, [s. l.], p. 65–83, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444521491000069?via%3Dihub>. Acesso at: 24 Oct. 2018.

VADKERTIOVÁ, R.; DUDÁŠOVÁ, H.; BALAŠČÁKOVÁ, M. Yeasts in agricultural and managed soils. *In: YEASTS IN NATURAL ECOSYSTEMS: DIVERSITY*. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 117–144. *E-book*. Disponível em: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-62683-3\\_4](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-62683-3_4). Acesso at: 24 Oct. 2018.

WANG, Q. M. *et al.* Multigene phylogeny and taxonomic revision of yeasts and related fungi in the Ustilaginomycotina. **Studies in Mycology**, [s. l.], v. 81, p. 55–83, 2015a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.004>.

WANG, Q. M. *et al.* Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within Pucciniomycotina. **Studies in Mycology**, [s. l.], v. 81, p. 149–189, 2015b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2015.12.002>.

WEISS, M. *et al.* Tremellomycetes and Related Groups. *In: SYSTEMATICS AND EVOLUTION*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 331–355. *E-book*.



Disponível em: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-55318-9\\_12](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-55318-9_12). Acesso at: 24 Oct. 2018.

WHITE, T. J. *et al.* AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. *In: PCR PROTOCOLS*. [S. l.: s. n.], 1990.

WRENT, P. *et al.* Strain typing of *Zygosaccharomyces* yeast species using a single molecular method based on polymorphism of the intergenic spacer region (IGS). **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 142, n. 1–2, p. 89–96, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.007>.

WUCZKOWSKI, M. *et al.* Diversity of yeasts isolated from litter and soil of different natural forest sites in Austria. **Bodenkultur**, [s. l.], v. 56, n. 1–4, p. 201–208, 2005.

XIAO, C. *et al.* Rock phosphate solubilization by four yeast strains. **Annals of Microbiology**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 173–178, 2013. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s13213-012-0458-z>. Acesso at: 24 Oct. 2018.

YOUNG, I. M.; CRAWFORD, J. W. Interactions and Self-Organization in the Soil-Microbe Complex. **Science**, [s. l.], v. 304, n. 5677, p. 1634–1637, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15192219>. Acesso at: 24 Oct. 2018.

YURKOV, A. *et al.* Aboveground deadwood deposition supports development of soil yeasts. **Diversity**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 453–474, 2012.

YURKOV, A. M. *et al.* Local climatic conditions constrain soil yeast diversity patterns in Mediterranean forests, woodlands and scrub biome. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. fov103, 2016. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1093/femsyr/fov103>. Acesso at: 23 Oct. 2018.

YURKOV, A. *et al.* Nomenclatural issues concerning cultured yeasts and other fungi: why it is important to avoid unneeded name changes. **IMA Fungus**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 18, 2021. Disponível em: <https://IMAFungus.biomedcentral.com/articles/10.1186/s43008-021-00067-x>.

YURKOV, A. Yeasts in forest soils. *In: YEASTS IN NATURAL ECOSYSTEMS: DIVERSITY*. [S. l.]: Springer International Publishing, 2017. p. 87–116.

YURKOV, A. M. **Yeasts of the soil – obscure but precious**. [S. l.: s. n.], 2018.

YURKOV, A. M.; DLAUCHY, D.; PÉTER, G. *Meyerozyma amylolytica* sp. nov. from temperate deciduous trees and the transfer of five *Candida* species to the genus *Meyerozyma*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 67, n. 10, p. 3977–3981, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28895516>. Acesso at: 18 Nov. 2018.

YURKOV, A. M.; KEMLER, M.; BEGEROW, D. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. **Fungal Ecology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 24–35, 2012. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1754504811000754>. Acesso at: 24 Oct. 2018.

## 9 PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM ATIVIDADES

### 9.1 Artigos publicados

Navarro, H. M., Félix, C. R., Tavares, V. D., de Sousa, F. M., **Santos, A. R.**, Morais, P. B., ... & Landell, M. F. (2022). *Tremella ananatis* sp. nov. and *Tremella lamprococci* sp. nov., two yeast species associated with bromeliads. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(2), 005261.

Maciel, N. O., **Santos, A. R.**, Felix, C. R., Landell, M. F., Pagani, D. M., Pimenta, R. S., ... & Rosa, C. A. (2021). *Wickerhamiella martinezcruzae* fa, sp. nov., a yeast species isolated from tropical habitats. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 71(11), 005092.

**SANTOS, Ana Raquel Oliveira** et al. *Phaffia brasiliiana* sp. nov., a yeast species isolated from soil in a Cerrado–Atlantic Rain Forest ecotone site in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 71, n. 11, p. 005080, 2021

Barros, K. O., Souza, R. M., Palladino, F., Cadete, R. M., **Santos, A. R. O.**, Goes-Neto, A., ... & Rosa, C. A. (2021). *Cyberlindnera dasilvae* sp. nov., a xylitol-producing yeast species isolated from rotting wood and frass of cerambycid larva. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(9), 004986.

Marques, A. R., Resende, A. A., Gomes, F. C., **Santos, A. R. O.**, Rosa, C. A., Duarte, A. A., ... & Dos Santos, V. L. (2021). Plant growth–promoting traits of yeasts isolated from the tank bromeliad *Vriesea minarum* LB Smith and the effectiveness of *Carlosrosaea vrieseae* for promoting bromeliad growth. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-13.

Freitas, L. F., Batista, T. M., **Santos, A. R.**, Hilário, H. O., Moreira, R. G., Franco, G. R., ... & Rosa, C. A. (2020). Yeast communities associated with cacti in Brazil and the description of *Kluyveromyces starmeri* sp. nov. based on phylogenomic analyses. *Yeast*, 37(12), 625-637.

Moreira, J. D., Morais, C. G., Oliveira, F. L., **Santos, A. R. O.**, Schindwein, C., Lachance, M. A., & Rosa, C. A. (2020). *Starmera foglemanii* sp. nov. and *Starmera ilhagrandensis* sp. nov., two novel yeast species isolated from ephemeral plant substrates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(7), 4378-4383.

Lee, D. K., **de Oliveira Santos, A. R.**, Hsiang, T., Rosa, C. A., & Lachance, M. A. (2020). Catching speciation in the act—act 2: *Metschnikowia lacustris* sp. nov., a sister species to *Metschnikowia dekortorum*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(6), 753-762.

de Carvalho, C. R., Ferreira, M. C., Gonçalves, V. N., **de Oliveira Santos, A. R.**, Carvalho-Silva, M., Câmara, P. E. A. S., ... & Rosa, L. H. (2020). Cultivable fungi associated with bryosphere of bipolar mosses *Polytrichastrum alpinum* and *Polytrichum juniperinum* in King George Island, South Shetland Islands, Maritime Antarctica. *Polar Biology*, 43(5), 545-553.

Matos, T. T., Teixeira, J. F., Macías, L. G., **Santos, A. R. O.**, Suh, S. O., Barrio, E., ... & Rosa, C. A. (2020). *Kluyveromyces osmophilus* is not a synonym of *Zygosaccharomyces*

*mellis*; reinstatement as *Zygosaccharomyces osmophilus* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(5), 3374-3378.

Cardoso, V. M., Campos, F. F., **Santos, A. R. O.**, Ottoni, M. H. F., Rosa, C. A., Almeida, V. G., & Graef, C. F. F. (2020). Biotechnological applications of the medicinal plant *Pseudobrickellia brasiliensis* and its isolated endophytic bacteria. *Journal of applied microbiology*, 129(4), 926-934.

Moreira, J. D., **Santos, A. R. O.**, Oliveira, F. L., Cadete, R. M., Freire, A. L., Morais, P. B., ... & Rosa, C. A. (2020). *Zygorulasporea cariocana* sp. nov., a yeast species isolated from tree bark in Brazil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2677-2681.

Morais, C. G., Sena, L. M., Lopes, M. R., **Santos, A. R. O.**, Barros, K. O., Alves, C. R., ... & Rosa, C. A. (2020). Production of ethanol and xylanolytic enzymes by yeasts inhabiting rotting wood isolated in sugarcane bagasse hydrolysate. *Fungal Biology*, 124(7), 639-647.

**Santos, A. R. D. O.**, Lee, D. K., Ferreira, A. G., do Carmo, M. C., Rondelli, V. M., Barros, K. O., ... & Lachance, M. A. (2020). The yeast community of *Conotelus* sp. (Coleoptera: Nitidulidae) in Brazilian passionfruit flowers (*Passiflora edulis*) and description of *Metschnikowia amazonensis* sp. nov., a large-spored clade yeast. *Yeast*, 37(3), 253-260.

Lopes, M. R., **Santos, A. R. O.**, Moreira, J. D., Santa-Brígida, R., Martins, M. B., Pinto, F. O., ... & Rosa, C. A. (2019). *Kurtzmaniella hittingeri* fa, sp. nov., isolated from rotting wood and fruits, and transfer of three *Candida* species to the genus *Kurtzmaniella* as new combinations. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 69(5), 1504-1508.

## 9.2 Capítulos de livros publicados

Ferreira, M. C., de Carvalho, C. R., Bahia, M., Barreto, D. L. C., Azevedo, R. N., Cota, B. B., **Santos, A.R.O.**, ... & Rosa, L. H. (2021). Plant-associated Fungi: Methods for Taxonomy, Diversity, and Bioactive Secondary Metabolite Bioprospecting. In *The Plant Microbiome* (pp. 85-112). Humana, New York, NY.

## 9.3 Resumos expandidos

Souza, G. F. L.; Barros, K. O.; **Santos, A. R. O.**; Fonseca, C. R. V.; Abegg, M. A.; Rosa, C. A. IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DO INTESTINO DE BESOUROS EM ÁREAS DE FLORESTA AMAZÔNICA BRASILEIRA, resumo expandido e aceito pelo “VII Simpósio de Microbiologia da UFMG CONECTA SIM 2020” promovido pelo programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, realizado de 03 a 06 de novembro de 2020.

## 9.4 Orientações

Fernanda Luiza Castro de Oliveira. “Diversidade de Leveduras Associadas a Substratos Vegetais e Insetos em Fragmentos de Ipucas no Estado de Tocantins”. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais. Co-orientador: Ana Raquel de Oliveira Santos.

Arthur Novaes Sander. “Isolamento e identificação de leveduras a partir de flores da Amazônia brasileira”. 2021 Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais. Co-orientador: Ana Raquel de Oliveira Santos.

### **9.5 Participação em bancas**

**SANTOS, ANA RAQUEL O.;** MONTANDON, C. E.; SANTIAGO, I. F. Participação em banca de Leandro Lansiquot Mendes. Eficácia do uso de fungos entomopatogênicos no controle de artrópodes ectoparasitas vetores de agentes infecciosos para humanos. 2020. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais.

### **9.6 Participação em eventos**

**Workshop do Centro de Coleções Taxonômicas 7 anos**, realizado dia 26 de maio de 2022 no Instituto de Ciências biológicas da UFMG,

**Darwin Day UFMG 2020: "Genômica Aplicada à Conservação da Biodiversidade"**, realizado no dia 08 de julho de 2020.

**Darwin Day UFMG 2020: "Fake News e os Impactos na Ciência"**, realizado no dia 08 de julho de 2020.

**Darwin Day UFMG 2020: "Natureza e Epidemias"**, realizado no dia 08 de julho de 2020.

**Darwin Day UFMG 2020: "Rise and Fall of the Dinosaurs"**, realizado no dia 08 de julho de 2020.

**Aula Magna 2020 ICB: "Mudanças Globais e Futuro das Florestas Tropicais"**, de abertura do 1º semestre de 2020 da Pós-graduação do ICB, realizado pelo NAPG - Núcleo de Apoio à Pós-graduação ICB/UFMG, no dia 12 de março de 2020.

### **9.7 Participação em comissões**

**2019 – Atual** Membro representante discente da “Comissão de reestruturação didática do PPG em Microbiologia da UFMG”.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A Artigo publicado no International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology: *Phaffia brasiliiana* sp. nov., a yeast species isolated from soil in a Cerrado – Atlantic Rain Forest ecotone site in Brazil**

## *Phaffia brasiliiana* sp. nov., a yeast species isolated from soil in a Cerrado–Atlantic Rain Forest ecotone site in Brazil

Ana Raquel Oliveira Santos<sup>1</sup>, Andreia Aires<sup>2</sup>, Ana Pontes<sup>2</sup>, Margarida Silva<sup>2</sup>, Patricia H Brito<sup>2</sup>, Marizeth Groenewald<sup>3</sup>, Cidiane G. S. Melo<sup>1</sup>, Marc-André Lachance<sup>4</sup>, José Paulo Sampaio<sup>2,\*</sup> and Carlos A. Rosa<sup>1,\*</sup>

### Abstract

During studies of yeasts associated with soil in a Cerrado–Atlantic Rain Forest ecotone site in Brazil, three orange-pigmented yeast strains were isolated from samples collected in Minas Gerais state, Brazil. Molecular analyses combining the 26S rRNA gene (D1/D2 domains) and the internal transcribed spacer (ITS) sequences as well as whole-genome sequence data showed that these strains could not be ascribed to any known species in the basidiomycetous genus *Phaffia*, and thus they are considered to represent a novel species for which the name *Phaffia brasiliiana* sp. nov. is proposed. The holotype is CBS 16121<sup>T</sup> and the MycoBank number is MB 839315. The occurrence of *P. brasiliiana* in a tropical region is unique for the genus, since all other species occur in temperate regions. Two factors appear to contribute to the distribution of the novel taxon: first, the region where it was found has relatively moderate temperature ranges and, second, an adaptation to grow or withstand temperatures higher than those of the other species in the genus seems to be in place.

### INTRODUCTION

The genus *Phaffia* accommodated until recently a single species, *Phaffia rhodozyma* (synonym *Xanthophyllomyces dendrorhous*), which was renowned for being the only fungus known to produce astaxanthin as its principal carotenoid [1]. Astaxanthin is a lipid-soluble, red–orange oxycarotenoid, and is produced by other organisms such as microalgae and bacteria [2, 3]. Consumption of this carotenoid by humans is associated with several health benefits, including antioxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic properties [3, 4]. The sources of astaxanthin in the human diet include salmon, trout and crustaceans. Astaxanthin is added to feed when animals are farmed in order to attain required orange–pink pigmentation [4]. Commercial preparations of this pigment are obtained mainly from the alga *Haematococcus pluvialis*. Strains of *P. rhodozyma* have been reported to produce astaxanthin with high yields and productivities [5].

*Phaffia rhodozyma* is associated with exudates of deciduous trees in Europe, North America and Japan, mainly from slimy exudates of birch (*Betula* spp.). The species has also been isolated from stromata of *Cyttaria*, an ascomycetous parasite of *Nothofagus* species in South America and in Australasia [6–8]. Recently, three novel *Phaffia* species were reported [8, 9]. Two species, *Phaffia australis* and *P. tasmanica*, were isolated from *Nothofagus* forests in Australasia and both produce astaxanthin. *P. australis* was isolated from leaves of *N. moorei* in Queensland, and *P. tasmanica* from fruiting bodies of *Cyttaria gunnii* on *N. cunninghamii* in Tasmania [8]. The other novel species, *P. aurantiaca*, was described based on a single isolate obtained from a leaf from an unidentified plant collected in Lulang County, Tibet [9]. In this case the ecology and distribution remain mostly unknown and astaxanthin production was not verified, although the culture was reported to exhibit orange pigmentation. Based on the data currently available, *P. rhodozyma* is cosmopolitan as it is present in the Holarctic region, South America and

**Author affiliations:** <sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, ICB, C.P. 486, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; <sup>2</sup>UCIBIO, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516, Caparica, Portugal; <sup>3</sup>Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Uppsalalaan 8, 3584CT Utrecht, The Netherlands; <sup>4</sup>Department of Biology, University of Western Ontario, Ontario, N6A 5B7, Canada.

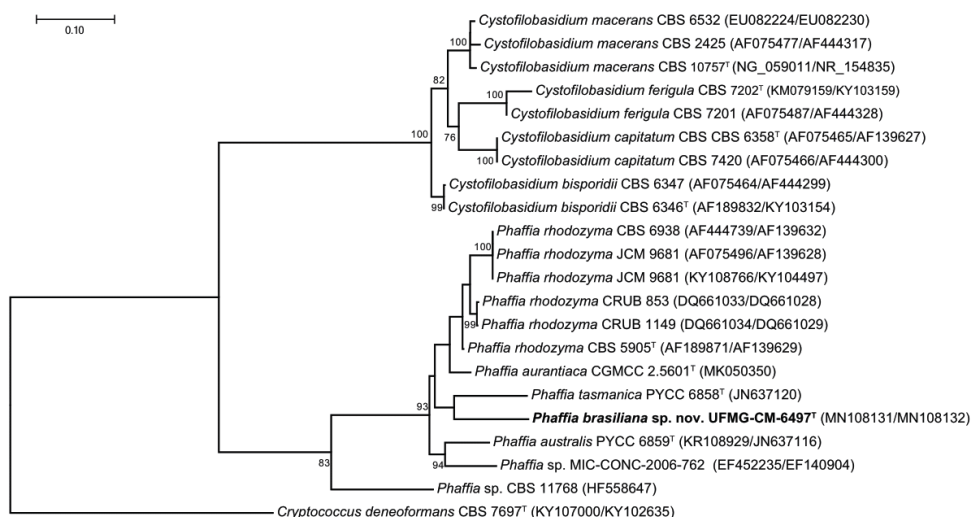
**\*Correspondence:** José Paulo Sampaio, jss@fct.unl.pt; Carlos A. Rosa, carlrosa@icb.ufmg.br

**Keywords:** *Phaffia brasiliiana* sp. nov.; soil; Cerrado–Atlantic Rain Forest ecotone; tropical forest.

**Abbreviations:** ANI, average nucleotide identity; CBS, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Centraalbureau voor Schimmelcultures); GYMP, glucose, yeast extract, malt extract, phosphate agar; ITS, internal transcribed spacer; LSU rRNA, large subunit ribosomal ribonucleic acid; PYCC, Portuguese Yeast Culture Collection, Caparica, Portugal; UFMG-CM, Collection of Microorganisms and Cells of Federal University of Minas32 Gerais; YM, yeast extract-malt extract; YNB, yeast nitrogen base.

The GenBank/EMBL/DDJB accession numbers for the gene sequences of the ITS region and D1/D2 domains of the LSU rRNA gene are MN108132 and MN108131, respectively. Whole genome data: PRJEB43872.

Two supplementary tables are available with the online version of this article.



**Fig. 1.** Phylogenetic placement of *Phaffia brasiliensis* sp. nov. based on a combined alignment of the D1/D2 domain of the 26S rRNA gene and complete ITS region. The maximum-likelihood method and the Kimura two-parameter model of sequence evolution were employed. The tree was rooted with *Cryptococcus deneoformans*. The numbers provided on branches are frequencies with which a given branch appeared in 1000 bootstrap replications (values below 70 % not shown). Bar, 0.1 expected substitutions per site.

Australasia, whereas *P. australis* and *P. tasmanica* are endemic to Australasia. Moreover, the distribution of the four known species suggests that *Phaffia* is restricted to environments with temperate climates. However, during studies on soil yeast biodiversity in a Cerrado–Atlantic Rain Forest ecotone site in Brazil, we isolated three orange-pigmented cultures of an undescribed *Phaffia* species. Sequence analyses of the D1/D2 domains of the LSU rRNA gene combined with the complete internal transcribed spacer (ITS) regions suggested that the Brazilian species is a sister species to *P. tasmanica*, but with low bootstrap support. A whole-genome-based phylogeny unambiguously confirmed the Brazilian isolates as representing a novel species of the genus *Phaffia* but not the close relationship with *P. tasmanica*.

## METHODS

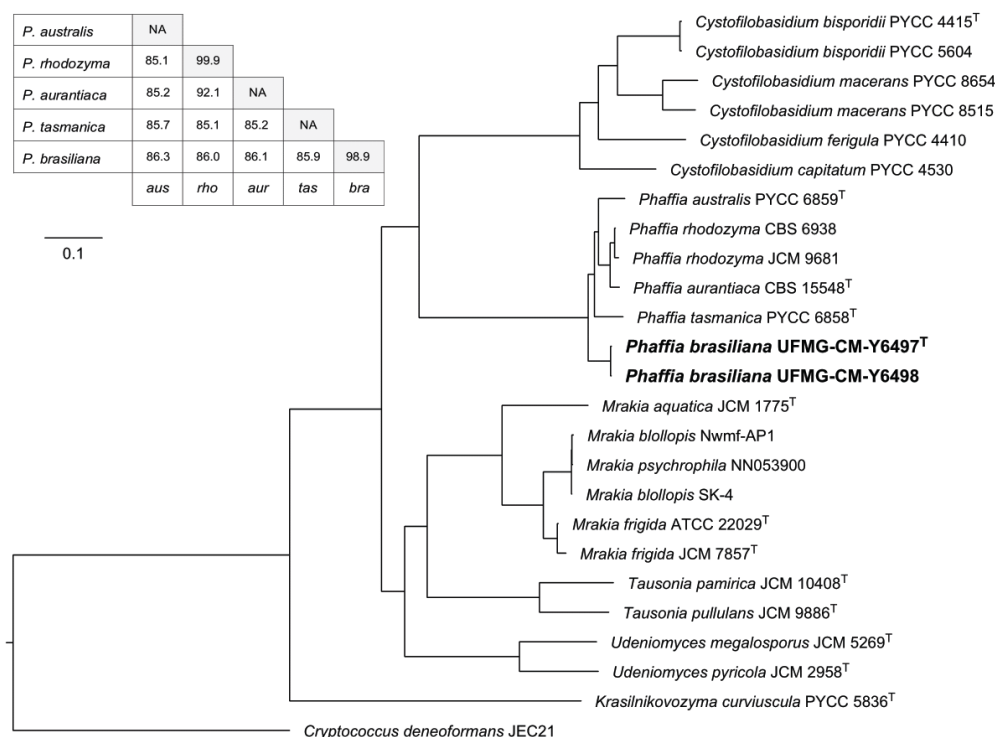
### Yeast isolation and identification

The yeasts were isolated from soil samples collected in a Cerrado–Atlantic Rain Forest ecotone in the Private Natural Heritage Reserve of the Sanctuary of Caraça (20° 05' S 43° 28' W), a nature reserve located in the southeastern slope of the Espinhaço Range, Minas Gerais state, Brazil. Isolate UFMG-CM-Y6497 (=CBS 16121<sup>T</sup>) was obtained from a flooded soil sample collected in December 2017, and UFMG-CM-Y6498 was obtained from a soil sample of Atlantic forest fragment in May 2018. Isolate UFMG-CM-Y6662 was obtained from a soil sample collected in a Cerrado fragment in August 2017. Approximately 1 g of soil was added to a tube containing 10 ml of yeast nitrogen base (YNB) – glucose medium (YNB 0.67%, glucose 8.0%, chloramphenicol 0.1%) and incubated

at 10 °C for 14 days. When growth was detected, 1 ml of the enriched medium was transferred to a tube containing 5 ml of the corresponding medium, and incubated at 10 °C. When growth was observed in these tubes, yeast colonies were recovered by plating appropriate decimal dilutions on YM agar (yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 1%, glucose 2%, chloramphenicol 0.1%, agar 2%), also incubated at 10 °C for 7 days. Representative colonies of the different yeast morphotypes were purified by repeated streaking on YM agar plates, and preserved in GYMP broth (glucose 2 %, yeast extract 0.5 %, malt extract 0.5 %, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%) containing 20 % glycerol at –80 °C. Morphological and physiological characterization was done following standard procedures [10]. Sporulation was tested on YNB with 2 % agar and 0.5 % ribitol.

### Molecular identification and phylogenetic analysis

Species identifications were performed by analysis of the sequences of the ITS–5.8S region and the D1/D2 variable domains of the LSU rRNA gene [11–14]. Sequencing was performed at the Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Belo Horizonte, Brazil, and at the Robarts Genomics Centre, London, Ontario, Canada. The amplified DNA was cleaned and sequenced with an ABI 3130 Genetic Analyzer automated sequencing system using BigDye v3.1 and POP7 polymer. Sequences of the three isolates were edited and aligned using the program MUSCLE provided in the MEGA 6 package [15]. Sequences were compared with those in the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) [16]. For phylogenetic analysis, the



**Fig. 2.** Genome-based phylogenetic placement of *Phaffia brasiliana* sp. nov. The phylogeny was inferred from a concatenated alignment of 471 amino acid sequences corresponding to single-copy core genes. The maximum-likelihood method and the LG+F+I+G4 model of sequence evolution were employed and *Cryptococcus deneoformans* was used to root the tree. All branches have 100 % bootstrap support (fast bootstrap with NNI optimization), and branch lengths correspond to the expected number of substitutions per site (scale bar). A matrix of pairwise measurements of ANI is included for the species in the genus *Phaffia* (within-species measurements are shown in grey-shaded boxes when more than one genome of the species was sequenced).

maximum-likelihood algorithm was used, together with the Kimura two-parameter model, as suggested by the model test implemented in MEGA 6.

### Genome sequencing, assembly and phylogenomic analysis

Genome sequencing assembly and phylogenomic analysis followed the procedures recently described by David-Palma et al. [8]. In brief, genomic DNA was sequenced using paired-end Illumina MiSeq (2×300 cycles) at the sequencing facility of Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal. Raw sequence reads were adapter-trimmed with Trimmomatic v0.39 [17] and independently preprocessed with BBmerge v38.73 [18], which cuts adapter sequences and merges overlapping paired reads into single read sequences. All sets of preprocessed sequencing reads were assembled using SPAdes v3.11.1 [19] with parameter --careful, and k-mer sizes were automatically selected based on read length. The resulting assemblies were compared and assessed for quality with QUAST v5.0 [20], and the assembly with highest genome size and N50 value was considered best. Small contigs of less than

1 kb were discarded from final assemblies. *Ab initio* prediction of protein coding genes and annotation of all final assemblies was performed with AUGUSTUS v3.3.3 [21] using the default gene structure training set for *Cryptococcus deneoformans*. Orthology mapping was carried out using all-against-all BLASTP (NCBI Blast-2.2) searches and a Markov cluster algorithm, OrthoMCL v1.4 [22], with an inflation factor (F) of 1.5 and a minimum pairwise sequence alignment coverage of 50%, as implemented in the Get\_Homologues package [23]. All clusters that contained one single orthologous copy in all analysed genomes were used to generate the dataset for phylogenetic analysis of translated single-copy core genes. Protein sequences of each cluster were aligned with MAFFT v7.407 [24], using the G-INS-I method and default parameter values, trimmed with BMGE v1.12 [25] using the amino acid option, and finally concatenated into a single dataset. Phylogenetic analysis was carried out with IQ-TREE v1.6.12 [26] using maximum-likelihood inference. Model choice was determined by ModelFinder [27] and branch support was estimated using the fast bootstrap approximation with NNI [28], both implemented in IQ-TREE. Average nucleotide



**Table 1.** Differential physiological characteristics among *Phaffia brasiliiana* and the other known *Phaffia* species

+, Positive; -, negative; D, delayed; w, weak results; ND, not determined.

| Physiological attributes                | <i>P. brasiliiana</i> | <i>P. australis</i> | <i>P. tasmanica</i> | <i>P. aurantiaca</i> | <i>P. rhodozyma</i> |
|---|-----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| <b>Fermentation</b>                     |                       |                     |                     |                      |                     |
| Glucose                                 | -                     | +                   | +                   | -                    | +                   |
| <b>Assimilation of carbon compounds</b> |                       |                     |                     |                      |                     |
| D-Galactose                             | D, w                  | -                   | D, w                | +                    | -                   |
| L-Sorbose                               | +                     | -                   | -                   | +                    | D, -                |
| D-Ribose                                | w                     | -                   | -                   | +                    | D, -                |
| D-Xylose                                | +                     | +                   | D, w                | D, w                 | +                   |
| D-Arabinose                             | w                     | -                   | -                   | -                    | D, -                |
| L-Rhamnose                              | +                     | -                   | -                   | -                    | D, -                |
| Salicin                                 | D                     | +                   | +                   | D, w                 | +                   |
| Melibiose                               | +                     | +                   | +                   | +                    | -                   |
| Lactose                                 | D, w                  | -                   | -                   | +                    | -                   |
| Soluble starch                          | -                     | +                   | +                   | -                    | +                   |
| Erythritol                              | -                     | -                   | -                   | +                    | -                   |
| Ribitol                                 | +                     | D                   | -                   | D, w                 | D, -                |
| Xylitol                                 | -                     | +                   | -                   | ND                   | -                   |
| D-Glucitol                              | +                     | +                   | -                   | +                    | D                   |
| <b>Growth temperature</b>               |                       |                     |                     |                      |                     |
| 25 °C                                   | +                     | +                   | +                   | -                    | +                   |
| 30 °C                                   | w                     | -                   | -                   | -                    | -                   |

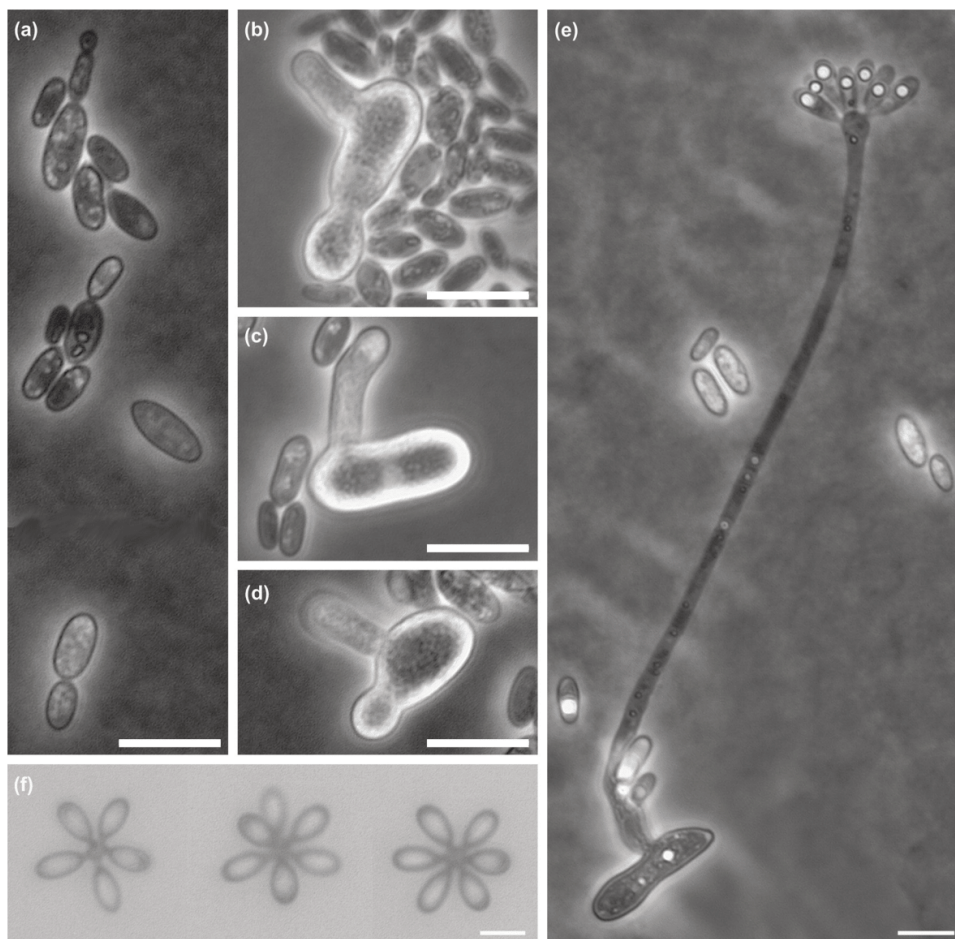
identity (ANI) between all pairwise genome comparisons was estimated from whole genome assemblies aligned with NUCmer (nucleotide MUMmer) v3.1 [29] as applied in pyani v0.2.11 [30].

## RESULTS AND DISCUSSION

### Species characterization

The three isolates of the novel *Phaffia* species, herein described as *P. brasiliiana* sp. nov., have identical ITS and D1/D2 sequences. For phylogenetic analysis we used an alignment combining those two regions from representatives of all known *Phaffia* species and two undescribed species represented by strain MIC-CONC-2006-762, isolated from leaves of *Eucalyptus globulus* in Chile [31], and CBS 11768, isolated from soil in Germany (as per the associated GenBank record). Strains and sequences are detailed in Table S1 (available in the online version of this paper). The phylogeny confirmed the generic placement of the new Brazilian taxon in *Phaffia* and suggested *P. tasmanica* as the closest relative, albeit with a low bootstrap support (Fig. 1). A more robust picture of phylogenetic relationships within the genus *Phaffia* was generated from a

concatenated alignment of the amino acid sequences of 471 single-copy core genes, using genome data of *P. aurantiaca* and *P. brasiliiana* obtained in this study and other sequences retrieved from public databases (Table S2). Given that the type strain of *P. rhodozyma* (CBS 5905) is not an adequate reference because it is a recombinant hybrid between two lineages [8], the type strain of *X. dendrorhous* (JCM 9681), a nomenclatural synonym of *P. rhodozyma* due to the abolishment of the dual nomenclature for sexual and asexual stages, was used instead. Representatives of other genera of the *Cystofilobasidiales* were included for comparison. Whereas a clear confirmation of the assignment of the novel species to the genus *Phaffia* was obtained, the suggested close relationship between *P. brasiliiana* and *P. tasmanica* was not confirmed (Fig. 2). Instead, the novel species was positioned at an external position in relation to the two core species, *P. aurantiaca* and *P. rhodozyma*, the only species found in the northern hemisphere (although *P. rhodozyma* is also found in the southern hemisphere), and to *P. australis* and *P. tasmanica*, endemic to Australasia. Although all bootstrap values in the multigene tree were 100%, indicating the absence of sampling error, the early emerging placement of *P. brasiliiana* relative to the other



**Fig. 3.** Salient micromorphological features of *Phaffia brasiliiana* sp. nov. UFMG-CM-Y6497. Yeast cells on malt extract agar after 5 days at 20 °C (a). Early stages of basidium formation from budding (b,d) or single (c) cells. Mature basidium with basidiospores (e) and basidiospores still attached to the basidium observed from the top and without a cover slip (f). All stages of sexual development were studied on ribitol agar incubated at 18 °C. Phase contrast. Bars, 10 µm.

species hinges on a very short inner internode and may or may not be confirmed when more species are uncovered and more genomes are available for study. Measurements of ANI between pairs of species in the genus *Phaffia* were lower than 95 % (Fig. 2), the highest being that of the comparison between *P. aurantiaca* and *P. rhodozyma* (92.1%). The novel species, *P. brasiliiana*, had around 86 % ANI in comparisons with the other known species in the genus. The two comparisons involving genomes of the same species (*P. brasiliiana* and *P. rhodozyma*) yielded values of 98.9 and 99.9%, respectively.

At the phenotypic level, *P. brasiliiana* shares with *P. aurantiaca* the inability to ferment glucose. The ability for glucose fermentation detected in the remaining *Phaffia* species was

viewed as a distinctive property of the genus *Phaffia* and indeed it is an almost unique characteristic for a basidiomycetous yeast since the vast majority are unable to ferment sugars. The ability to assimilate erythritol distinguishes the two non-fermenting *Phaffia* species, being positive for *P. aurantiaca* and negative for *P. brasiliiana*. A key feature of *P. brasiliiana* that distinguishes this species from all other species in the genus is its ability to grow at 30 °C, albeit moderately. The novel species even grows weakly at 32 °C. Table 1 depicts the physiological characteristics that distinguish the different *Phaffia* species.

*Phaffia brasiliiana* was isolated from three different soil samples collected in a Cerrado–Atlantic Rain Forest ecotone in Brazil. In general, this mountainous region has annual

average temperatures around 20 °C and during winter the temperatures range between 5 and 15 °C. The climate of the Atlantic Rain Forest tends to be cooler than that of the Cerrado, which has a savanna-type vegetation. The moderate temperatures in this ecotone and the ability of *P. brasiliana* to grow at 30–32 °C but not at 34 °C suggest that this species is ecologically adapted to the ecosystem where it was found. All the other species in the genus were isolated in temperate environments in the northern and southern hemispheres, and none grows at 30 °C. Therefore, the isolation of a *Phaffia* species in a tropical ecosystem could be due to locally moderate temperature ranges. Nevertheless, *P. brasiliana* does not appear to have a particular adaptation to thrive in hot climates since it was isolated from soil samples incubated at 10 °C but not from samples incubated at 25 or 35 °C. However, this yeast grows at 30 °C, and growth at 32 °C is weak. A total of 424 isolates were obtained in this study, and the novel species represented a minor component of these communities (A. R. O. Santos and C. A. Rosa, unpublished results). Isolate UFMG-CM-Y6497 was obtained during the rainy season, and the others during the dry season. Five samples from three different environments (Forest, Cerrado and flooded sites) were collected every other month during a 1 year period. The novel species was isolated from three soil samples, one from each of these environments. We hypothesize that *P. brasiliana* is primarily associated with plants of the Cerrado–Atlantic Rain Forest ecosystem, ending up in the soil samples via foliar detritus. *Rhodotorula glutinis*, *Apiotrichum xylopinii* and a novel species of *Wickerhamomyces* were also isolated from the sample that yielded UFMG-CM-Y6497. *Candida argentea* was isolated from the sample that yielded UFMG-CM-Y6498, and *Aureobasidium leucospermi* was associated with UFMG-CM-Y6662. Most of these are typical phylloplane species, which strengthens our hypothesis.

#### DESCRIPTION OF *PHAFFIA BRASILIANA* SANTOS, AIRES, PONTES, M. SILVA, BRITO, GROENEWALD, LACHANCE, SAMPAIO AND ROSA SP. NOV.

*Phaffia brasiliana* (bra.si.li.a.na. N.L. fem. adj. *brasiliana* pertaining to Brazil, the country where this species was originally found).

On YM agar after 5 days at 20 °C, colonies are small, convex, orange to salmon-red, and have an entire margin. In yeast extract (0.5%) – glucose (2%) broth after 1 month, sediment is formed, and pellicle and ring are present. In 5 % malt extract agar after 5 days at 20 °C, cells are ovoid to ellipsoidal (3–5×7–9 µm) and occur singly or in pairs (Fig. 3a). Budding can be multilateral but is predominantly polar. The sexual stage can be observed in YNB-ribitol agar incubated at 18 °C. After 2–3 days, large cells (4–6×10–14 µm), single or in the budding stage, initiate the stage of basidial development (Fig. 3b–d). Conjugation is not observed. After 4–6 days mature basidia can be observed. Basidia are slender and long (2–3×80–140 µm) and have a slight swelling at the apex (Fig. 3e). The basidiospores are formed terminally in the

basidium, are ellipsoidal (3–4×8–9 µm), range from five to eight (Fig. 3e–f), and germinate by budding.

Fermentation of glucose is negative. Assimilation of carbon compounds: glucose, sucrose, raffinose, melibiose, galactose (delayed, weak), lactose (delayed, weak), trehalose, maltose, melizitose, cellobiose, salicin (weak), L-rhamnose, D-xylose, L-arabinose, D-arabinose (weak), ribose (weak), glycerol, ribitol, D-mannitol, D-glucitol, *myo*-inositol, succinate, D-gluconate (weak) and N-acetyl-D-glucosamine. No growth occurs on inulin, soluble starch, L-sorbose, methanol, ethanol, erythritol, galactitol, DL-lactate, citrate, hexadecane, xylitol, acetone, ethylacetate or 2-propanol. Assimilation of nitrogen compounds: negative for nitrate and nitrite, and positive for lysine. Growth in amino-acid-free medium is positive. Maximum temperature for growth is 32 °C. Growth on YM agar with 10 % NaCl and in 50 % glucose/yeast extract (0.5 %) is negative. Acid production is negative. Growth is negative with 100 µg cycloheximide ml<sup>-1</sup>. Starch-like compounds are produced. Diazonium blue B and urease reactions are positive.

The holotype, CBS 16121<sup>T</sup>, is preserved in a metabolically inactive state in the CBS Yeast Collection of the Westerdijk Fungal Diversity Institute, Utrecht, the Netherlands. Isotype (metabolically inactive) strains of *Phaffia brasiliana* sp. nov. are deposited in the Collection of Microorganisms and Cells of the Federal University of Minas Gerais (Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, as UFMG-CM-Y6497 and in the Portuguese Yeast Culture Collection, Caparica, Portugal, as PYCC 8851. Strain UFMG-CM-Y6497 was isolated from a flooded soil sample collected in a Cerrado/Atlantic Forest ecotone site in the Private Natural Heritage Reserve of the Sanctuary of Caraça, Minas Gerais State, Brazil. The MycoBank accession number is MB 839315. The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the gene sequences of the ITS region and D1/D2 domains of the LSU rRNA gene are MN108132 and MN108131, respectively. Whole genome data: PRJEB43872 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB43872>)

#### Funding information

This work was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil, process numbers 407415/2013-1 and 0457499/2014-1), Fundação do Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, process numbers APQ-01525-14, APQ-01477-13 and APQ-02552-15) and the Natural Science and Engineering Council of Canada (M.A.L.).

#### Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### References

1. Fell JW, Johanson EA, Phaffia MW, Miller, Yoneyama & Soneda (1976). Kurtzman CP, Fell JW and Boekhout T (eds). In: *The yeasts, a taxonomic study*, 5th edn. Amsterdam: Elsevier; 2011. pp. 1853–1855.
2. Johnson EA, Echavarri-Erasum C. Yeast biotechnology. Kurtzman CP, Fell JW and Boekhout T (eds). In: *The yeasts, a taxonomic study*, 5th edn. Amsterdam: Elsevier; 2011. p. 21.

3. Xia W, Tang N, Kord-Varkaneh H, Low TY, Tan SC, et al. The effects of astaxanthin supplementation on obesity, blood pressure, CRP, glycemic biomarkers, and lipid profile: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol Res* 2020;161:105113.
4. Brendler T, Williamson EM. Astaxanthin: How much is too much? A safety review. *Phytother Res* 2019;33:3090–3111.
5. Harith ZT, de Andrade Lima M, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A. Optimised production and extraction of astaxanthin from the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Microorganisms* 2020;8:430.
6. Libkind D, Ruffini A, Van Broock M, Alves L, Sampaio JP. Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:1120–1125.
7. David-Palma M, Libkind D, Sampaio JP. Global distribution, diversity hot spots and niche transitions of an astaxanthin-producing eukaryotic microbe. *Mol Ecol* 2014;23:921–932.
8. David-Palma M, Libkind D, Brito PH, Silva M, Bellora N, et al. The Untapped Australasian Diversity of Astaxanthin-Producing Yeasts with Biotechnological Potential—*Phaffia australis* sp. nov. and *Phaffia tasmanica* sp. nov. *Microorganisms* 2020;8:1651.
9. Li A-H, Yuan F-X, Groenewald M, Bensch K, Yurkov AM, et al. Diversity and phylogeny of basidiomycetous yeasts from plant leaves and soil: Proposal of two new orders, three new families, eight new genera and one hundred and seven new species. *Stud Mycol* 2020;96:17–140.
10. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, Robert V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. Kurtzman CP, Fell JW and Boekhout T (eds). In: *The yeasts*, 5th edn, Vol. 1. Amsterdam: Elsevier, . pp. 87–110.
11. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and 660 direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (eds). In: *PCR protocols*. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315.
12. O'Donnell K. *Fusarium and its near relatives*. Reynolds DR (eds). In: *The fungal holomorph*. Oregon: CAB International; 1993. p. 225.
13. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 1998;73:331–371.
14. Lachance MA, Bowles JM, Starmer WT, Barker JSF. *Kodamaea kakaoduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. *Can J Microbiol* 1999;45:172–177.
15. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis desktop version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725–2729.
16. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403–410.
17. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014;30:2114–2120.
18. Bushnell B, Rood J, Singer E. BBMerge - Accurate paired shotgun read merging via overlap. *PLoS One* 2017;12:e0185056.
19. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, et al. Spades: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012;19:455–477.
20. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 2013;29:1072–1075.
21. Stanke M, Waack S. Gene prediction with a hidden markov model and a new intron submodel. *Bioinformatics* 2003;Suppl 2:ii215–225.
22. Li L, Stoeckert CJ, Roos DS. Orthomcl: Identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res* 2003;13:2178–2189.
23. Contreras-Moreira B, Vinuesa P. Get\_homologues, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:7696–7701.
24. Katoh K, Standley DM. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 2013;30:772–780.
25. Criscuolo A, Gribaldo S. BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): A new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol Biol* 2010;10:210.
26. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* 2015;32:268–274.
27. Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, Von Haeseler A, Jermin LS. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods* 2017;14:587–589.
28. Hoang DT, Chernomor O, von Haeseler A, Minh BQ, Vinh LS. Ufboot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol Biol Evol* 2018;35:518–522.
29. Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, et al. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* 2004;5:R12.
30. Pritchard L, Glover RH, Humphris S, Elphinstone JG, Toth IK. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: Soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Anal Methods* 2016;8:12–24.
31. Weber RWS, Becerra J, Silva MJ, Davoli P. An unusual xanthophyllomyces strain from leaves of *Eucalyptus globulus* in Chile. *Mycol Res* 2008;112:861–867.

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

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

Find out more and submit your article at [microbiologyresearch.org](http://microbiologyresearch.org).

**APÊNDICE B Tabela com os valores par-a-par de turnover, aninhamento e dissimilaridade entre os sítios de coleta da RPPN Santuário do Caraça.**

|                                |       | alagado | campo |
|--------------------------------|-------|---------|-------|
| <b>Turnover</b>                | campo | 0,69    |       |
|                                | mata  | 0,76    | 0,76  |
| <b>Aninhamento</b>             | campo | 0,07    |       |
|                                | mata  | 0,01    | 0,04  |
| <b>Dissimilaridade Jaccard</b> | campo | 0,76    |       |
|                                | mata  | 0,77    | 0,81  |

**APÊNDICE C Tabela com os valores par-a-par de turnover, aninhamento e dissimilaridade entre as seis coletas realizadas na RPPN Santuário do Caraça.**

|                                |           | <b>c1</b> | <b>c2</b> | <b>c3</b> | <b>c4</b> | <b>c5</b> |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Turnover</b>                | <b>c2</b> | 0,762     |           |           |           |           |
|                                | <b>c3</b> | 0,696     | 0,791     |           |           |           |
|                                | <b>c4</b> | 0,776     | 0,870     | 0,828     |           |           |
|                                | <b>c5</b> | 0,776     | 0,844     | 0,640     | 0,833     |           |
|                                | <b>c6</b> | 0,750     | 0,844     | 0,667     | 0,814     | 0,691     |
| <b>Aninhamento</b>             | <b>c2</b> | 0,021     |           |           |           |           |
|                                | <b>c3</b> | 0,024     | 0,033     |           |           |           |
|                                | <b>c4</b> | 0,021     | 0,021     | 0,003     |           |           |
|                                | <b>c5</b> | 0,024     | 0,028     | 0,014     | 0,003     |           |
|                                | <b>c6</b> | 0,028     | 0,028     | 0,013     | 0,003     | 0,000     |
| <b>Dissimilaridade Jaccard</b> | <b>c2</b> | 0,783     |           |           |           |           |
|                                | <b>c3</b> | 0,720     | 0,824     |           |           |           |
|                                | <b>c4</b> | 0,796     | 0,891     | 0,831     |           |           |
|                                | <b>c5</b> | 0,800     | 0,873     | 0,654     | 0,836     |           |
|                                | <b>c6</b> | 0,778     | 0,873     | 0,679     | 0,817     | 0,691     |

**APÊNDICE D Tabela com os valores de SCBD para as espécies de leveduras isoladas do solo da RPPN Santuário do Caraça. Apenas espécies cujos valores foram superiores à média estão listadas.**

| <b>ESPECIE</b>           | <b>SCBD</b>        |
|--------------------------|--------------------|
| Cand_solani              | 0,040533780        |
| Kazac_saulgeensis,serrab | 0,036327440        |
| Pap_flavescens           | 0,026142900        |
| Cand_melibiosica         | 0,022961841        |
| Api_porosum              | 0,021365697        |
| Cyber_subsufficiens      | 0,021073482        |
| Rh_mucilaginosa          | 0,020676419        |
| Pap_laurentii            | 0,020613303        |
| Cand_albicans            | 0,019504523        |
| Rh_nothofagi,C,_pallid   | 0,018023528        |
| Hans_uvarum              | 0,017091058        |
| Kazac_sp1                | 0,017091058        |
| Schwan_polymorphus       | 0,016659496        |
| Hans_uvarum,clermon      | 0,015671334        |
| Conio_angustispora       | 0,015240664        |
| Kurtz_sp1                | 0,015040590        |
| Kod_ohmeri               | 0,014459571        |
| Rh_glutinis              | 0,014459571        |
| Rh_toruloides            | 0,014224434        |
| Cand_sp2                 | 0,013786575        |
| Pic_kluyveri             | 0,012204509        |
| Cand_sp1                 | 0,010852539        |
| Phaffia_sp1              | 0,010841576        |
| Naka_sp                  | 0,010405711        |
| Cand_pseudolambica       | 0,010376296        |
| Kazac_exigua             | 0,010376296        |
| Meyer_carib,carp,guil    | 0,010376296        |
| Zygot_florentina         | 0,010376296        |
| Cand_glabrata            | 0,010027060        |
| Nakazaw_ishiwadae        | 0,010027060        |
| Pleuro_richardsiae       | 0,010027060        |
| Kazac_turicensis,bulderi | 0,009878268        |
| Cand_boidinii            | 0,009737197        |
| Pleuro_bogoriensis       | 0,009061491        |
| Satur_silvae             | 0,009061491        |
| <b>média</b>             | <b>0,008849558</b> |

**APÊNDICE E Tabela com os valores par-a-par de turnover, aninhamento e dissimilaridade entre os sítios de coleta de Itacoatiara - AM.**

|                                |          | "caru" | "piquia" | "TPI" |
|--------------------------------|----------|--------|----------|-------|
| <b>Turnover</b>                | "piquia" | 0,71   |          |       |
|                                | "TPI"    | 0,81   | 0,81     |       |
|                                | "UFAM"   | 0,53   | 0,78     | 0,77  |
| <b>Aninhamento</b>             | "piquia" | 0,13   |          |       |
|                                | "TPI"    | 0,02   | 0,09     |       |
|                                | "UFAM"   | 0,19   | 0,02     | 0,10  |
| <b>Dissimilaridade Jaccard</b> | "piquia" | 0,83   |          |       |
|                                | "TPI"    | 0,83   | 0,90     |       |
|                                | "UFAM"   | 0,72   | 0,80     | 0,87  |



**APÊNDICE F Tabela com os valores de SCBD para as espécies de leveduras isoladas do solo coletado em Itacoatiara- AM. Apenas espécies cujos valores foram superiores à média estão listadas.**

| <b>Espécie</b>      | <b>SCBD</b> |
|---------------------|-------------|
| Papilio_laurentii   | 0,104956710 |
| Naka_sp             | 0,050581201 |
| Mey_car_carp_guilli | 0,048748988 |
| C_tropicalis        | 0,044865821 |
| Saito_podzolica     | 0,043818769 |
| Rh_mucil_Rh_albo    | 0,036407438 |
| Yamadazyma_sp1      | 0,032303391 |
| Kwo_mangrovensis    | 0,028731236 |
| Schwan_polymorphus  | 0,028347602 |
| Apiotrichum_sp      | 0,027666349 |
| C_pseudointermedia  | 0,021151461 |
| Api_sporotrichoides | 0,020510089 |
| Kaz_saulg_serra     | 0,017946328 |
| Galact_sp1          | 0,017007353 |
| Aureobasidium       | 0,016681558 |
| Galact_sp2          | 0,016201701 |
| C_railenensis       | 0,014541638 |
| Kaz_unispora        | 0,013459746 |
| Cyber_subsufficiens | 0,013218649 |
| Geotr_sp1           | 0,012306054 |
| Schef_amazonensis   | 0,012306054 |

**APÊNDICE G Valores de identidade e gaps das sequências dos domínios D1/D2 e ITS entre as linhagens de *Lipomyces* isolados e as linhagens tipo.**

| Isolado | Região | Espécie                            | Linhagem     | Acesso Genbank | Identidade   |           |
|---------|--------|------------------------------------|--------------|----------------|--------------|-----------|
|         |        |                                    |              |                | D1/D2        | Gaps      |
| LSA1.1  | D1/D2  | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | KY108299.1     | 539/543(99%) | 0/543(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 537/543(99%) | 0/543(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces starkeyi</i>          | NRRL Y-11557 | JQ689072.1     | 537/543(99%) | 0/543(0%) |
|         | ITS    | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | NR_138181.1    | 511/518(99%) | 2/518(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | AB614132.1     | 511/518(99%) | 2/518(0%) |
| LSA2.1  | D1/D2  | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | KY108299.1     | 547/548(99%) | 0/548(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 545/548(99%) | 0/548(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NR_077108.1    | 545/548(99%) | 0/548(0%) |
|         | ITS    | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | NR_138181.1    | 482/496(97%) | 1/496(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | AB614132.1     | 482/496(97%) | 1/496(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532     | NR_136955.1    | 480/494(97%) | 3/494(0%) |
| LSA4.1  | D1/D2  | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | AB747658.1     | 534/536(99%) | 0/536(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | AB747653.1     | 533/536(99%) | 0/536(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 531/536(99%) | 0/536(0%) |
|         | ITS    | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | NR_138181.1    | 504/508(99%) | 3/508(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS:2514     | AB614132.1     | 504/508(99%) | 3/508(0%) |
| LSA4.2  | D1/D2  | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | AB747658.1     | 571/574(99%) | 0/574(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NG_055384.1    | 576/582(99%) | 0/582(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | KY108299.1     | 570/574(99%) | 0/574(0%) |
|         | ITS    | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | NR_138181.1    | 518/521(99%) | 2/521(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS:2514     | AB614132.1     | 518/521(99%) | 2/521(0%) |
| LSA6.1  | D1/D2  | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | AB747653.1     | 550/551(99%) | 0/551(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 548/551(99%) | 0/551(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NG_055384.1    | 548/551(99%) | 0/551(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces mesembrius</i>        | CBS 7661     | AB747656.1     | 547/551(99%) | 0/551(0%) |

| Isolado | Região       | Espécie                            | Linhagem     | Acesso Genbank | Identidade   |           |
|---------|--------------|------------------------------------|--------------|----------------|--------------|-----------|
|         |              |                                    |              |                | D1/D2        | Gaps      |
| LSA7.1  | <b>D1/D2</b> | <i>Lipomyces okinawensis</i>       | NBRC 110620  | NG_060358.1    | 533/536(99%) | 0/536(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | AB747653.1     | 529/536(99%) | 0/536(0%) |
|         | <b>ITS</b>   | <i>Lipomyces okinawensis</i>       | NBRC 110620  | NR_155341.1    | 490/493(99%) | 0/493(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557     | JN943159.1     | 484/499(97%) | 2/499(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532     | NR_136955.1    | 483/498(97%) | 1/498(0%) |
| LSA7.2  | <b>D1/D2</b> | <i>Lipomyces starkeyi</i>          | NRRL Y-11557 | JQ689072.1     | 549/554(99%) | 0/554(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NG_055384.1    | 549/554(99%) | 0/554(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces orientalis</i>        | CBS 10300    | AB747657.1     | 546/550(99%) | 1/550(0%) |
|         | <b>ITS</b>   | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NR_077108.1    | 488/503(97%) | 4/503(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces orientalis</i>        | CBS 10300    | NR_137648.1    | 485/503(96%) | 4/503(0%) |
| LSA9.1  | <b>D1/D2</b> | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | AB747653.1     | 518/519(99%) | 0/519(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 517/518(99%) | 0/518(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces mesembrius</i>        | CBS 7661     | AB747656.1     | 516/518(99%) | 0/518(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces doorenjongii</i>      | CBS 7542     | AB747650.1     | 516/518(99%) | 0/518(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces starkeyi</i>          | NRRL Y-11557 | JQ689072.1     | 514/515(99%) | 0/515(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NG_055384.1    | 516/518(99%) | 0/518(0%) |
|         | <b>ITS</b>   | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | NR_138181.1    | 494/508(97%) | 1/508(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS:2514     | AB614132.1     | 494/508(97%) | 1/508(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532     | NR_136955.1    | 494/509(97%) | 4/509(0%) |
| LSA10.1 | <b>D1/D2</b> | <i>Lipomyces orientalis</i>        | CBS 10300    | NG_058332.1    | 545/549(99%) | 1/549(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 543/548(99%) | 0/548(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces starkeyi</i>          | NRRL Y-11557 | JQ689072.1     | 543/548(99%) | 0/548(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NR_077108.1    | 543/548(99%) | 0/548(0%) |
|         | <b>ITS</b>   | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NR_077108.1    | 490/504(97%) | 4/504(0%) |
| LSA12.1 | <b>D1/D2</b> | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | KY108299.1     | 558/560(99%) | 0/560(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 556/560(99%) | 0/560(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NR_077108.1    | 556/560(99%) | 0/560(0%) |
|         | <b>ITS</b>   | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | NR_138181.1    | 506/520(97%) | 1/520(0%) |

| Isolado | Região | Espécie                            | Linhagem     | Acesso Genbank | Identidade    |           |
|---------|--------|------------------------------------|--------------|----------------|---------------|-----------|
|         |        |                                    |              |                | D1/D2         | Gaps      |
|         |        | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | AB614132.1     | 506/520(97%)  | 1/520(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532     | NR_136955.1    | 506/521(97%)  | 4/521(0%) |
| LSA12.2 | NL1    | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS:8113     | KY108299.1     | 491/491(100%) | 0/491(0%) |
| LSA13.1 | D1/D2  | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | KY108299.1     | 544/545(99%)  | 0/545(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 542/545(99%)  | 0/545(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NR_077108.1    | 542/545(99%)  | 0/545(0%) |
| LSA13.2 | D1/D2  | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | KY108299.1     | 561/562(99%)  | 0/562(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 559/562(99%)  | 0/562(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NR_077108.1    | 559/562(99%)  | 0/562(0%) |
|         | ITS    | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | NR_138181.1    | 513/528(97%)  | 1/528(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | AB614132.1     | 513/528(97%)  | 1/528(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532     | NR_136955.1    | 513/529(97%)  | 4/529(0%) |
| LSA16.1 | D1/D2  | <i>Lipomyces orientalis</i>        | CBS 10300    | NG_058332.1    | 565/569(99%)  | 1/569(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NR_077108.1    | 565/570(99%)  | 0/570(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces starkeyi</i>          | NRRL Y-11557 | JQ689072.1     | 564/569(99%)  | 0/569(0%) |
|         | ITS    | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NR_077108.1    | 364/377(97%)  | 3/377(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces orientalis</i>        | CBS 10300    | NR_137648.1    | 363/377(96%)  | 3/377(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 360/377(95%)  | 3/377(0%) |
| LSA18.1 | D1/D2  | <i>Lipomyces orientalis</i>        | CBS 10300    | NG_058332.1    | 570/574(99%)  | 1/574(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NR_077108.1    | 569/574(99%)  | 0/574(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 568/573(99%)  | 0/573(0%) |
|         | ITS    | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NR_077108.1    | 496/511(97%)  | 4/511(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces orientalis</i>        | CBS 10300    | NR_137648.1    | 496/515(96%)  | 5/515(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 490/515(95%)  | 7/515(1%) |
| LSA20.2 |        | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS:2514     | KY108298.1     | 488/489(99%)  | 0/489(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces starkeyi</i>          | NRRL Y-11557 | JQ689072.1     | 486/489(99%)  | 0/489(0%) |
|         |        | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NG_055384.1    | 486/489(99%)  | 0/489(0%) |

| Isolado             | Região                       | Espécie                            | Linhagem                  | Acesso Genbank | Identidade    |               |
|---------------------|------------------------------|------------------------------------|---------------------------|----------------|---------------|---------------|
|                     |                              |                                    |                           |                | D1/D2         | Gaps          |
| LSA21.1             | <b>D1/D2</b>                 | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532                  | AB747662.1     | 544/545(99%)  | 0/545(0%)     |
|                     |                              | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557                  | NG_055386.1    | 544/545(99%)  | 0/545(0%)     |
|                     |                              | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514                  | KY108299.1     | 537/538(99%)  | 0/538(0%)     |
|                     |                              | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729                  | AB747652.1     | 536/539(99%)  | 0/539(0%)     |
|                     | <b>ITS</b>                   | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532                  | NR_136955.1    | 491/492(99%)  | 0/492(0%)     |
|                     |                              | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557                  | AB747663.1     | 481/494(97%)  | 2/494(0%)     |
|                     |                              | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608                  | NR_138181.1    | 477/494(97%)  | 4/494(0%)     |
| LSA25.1=            | <b>D1/D2</b>                 | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557                  | NG_055386.1    | 517/518(99%)  | 0/518(0%)     |
| LSA31.1=            |                              | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532                  | AB747662.1     | 515/518(99%)  | 0/518(0%)     |
| LSA46.1             |                              | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514                  | KY108299.1     | 515/518(99%)  | 0/518(0%)     |
|                     | <b>ITS</b>                   | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557                  | AB747663.1     | 478/481(99%)  | 0/481(0%)     |
|                     |                              | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532                  | NR_136955.1    | 483/495(98%)  | 3/495(0%)     |
|                     |                              | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608                  | NR_138181.1    | 481/496(97%)  | 4/496(0%)     |
|                     | LSA27.1<br>=LSA27.2          | <b>D1/D2</b>                       | <i>Lipomyces yarrowii</i> | CBS 7557       | NG_055386.1   | 510/510(100%) |
|                     | <i>Lipomyces yamadae</i>     |                                    | CBS 7532                  | AB747662.1     | 508/510(99%)  | 0/510(0%)     |
|                     | <i>Lipomyces kononenkoae</i> |                                    | CBS 2514                  | KY108299.1     | 507/509(99%)  | 0/509(0%)     |
|                     | <i>Lipomyces kockii</i>      |                                    | CBS 7729                  | AB747652.1     | 507/510(99%)  | 0/510(0%)     |
|                     | <i>Lipomyces starkeyi</i>    |                                    | NRRL Y-11557              | JQ689072.1     | 507/510(99%)  | 0/510(0%)     |
|                     | <b>ITS</b>                   | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557                  | AB747663.1     | 474/474(100%) | 0/474(0%)     |
|                     |                              | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532                  | NR_136955.1    | 463/475(97%)  | 3/475(0%)     |
|                     |                              | <i>Lipomyces okinawensis</i>       | NBRC 110620               | NR_155341.1    | 461/475(97%)  | 2/475(0%)     |
| LSA28.1<br>=LSA28.2 | <b>D1/D2</b>                 | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS:8113                  | KY108299.1     | 487/488(99%)  | 0/488(0%)     |
|                     | <b>ITS</b>                   | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514                  | AB614132.1     | 512/515(99%)  | 0/515(0%)     |
|                     |                              | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532                  | NR_136955.1    | 494/516(96%)  | 5/516(0%)     |
|                     |                              | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608                  | NR_138181.1    | 493/516(96%)  | 4/516(0%)     |
| LSA29.1             | <b>D1/D2</b>                 | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514                  | AB614132.1     | 545/550(99%)  | 0/550(0%)     |
|                     |                              | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729                  | AB747652.1     | 545/550(99%)  | 0/550(0%)     |
|                     |                              | <i>Lipomyces mesembrius</i>        | CBS 7661                  | AB747656.1     | 544/550(99%)  | 0/550(0%)     |

| Isolado                            | Região | Espécie                            | Linhagem     | Acesso Genbank | Identidade    |           |
|------------------------------------|--------|------------------------------------|--------------|----------------|---------------|-----------|
|                                    |        |                                    |              |                | D1/D2         | Gaps      |
|                                    | ITS    | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | NR_138181.1    | 497/516(96%)  | 4/516(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557     | AB747663.1     | 498/517(96%)  | 5/517(0%) |
| LSA29.2                            | D1/D2  | <i>Lipomyces kononenkoeae</i>      | CBS 2514     | KY108299.1     | 570/571(99%)  | 0/571(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NR_077108.1    | 570/573(99%)  | 0/573(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 568/571(99%)  | 0/571(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces starkeyi</i>          | NRRL Y-11557 | JQ689072.1     | 566/569(99%)  | 0/569(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NR_077108.1    | 566/569(99%)  | 0/569(0%) |
|                                    | ITS    | <i>Lipomyces kononenkoeae</i>      | CBS 2514     | AB614132.1     | 513/515(99%)  | 1/515(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532     | NR_136955.1    | 497/516(96%)  | 6/516(1%) |
| <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> |        | CBS 5608                           | NR_138181.1  | 496/516(96%)   | 5/516(0%)     |           |
| LSA30.1                            | D1/D2  | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557     | NG_055386.1    | 539/539(100%) | 0/539(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532     | AB747662.1     | 537/539(99%)  | 0/539(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces kononenkoeae</i>      | CBS 2514     | KY108299.1     | 534/538(99%)  | 0/538(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 534/538(99%)  | 0/538(0%) |
|                                    | ITS    | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557     | AB747663.1     | 505/505(100%) | 0/505(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532     | NR_136955.1    | 507/519(98%)  | 3/519(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | NR_138181.1    | 503/520(97%)  | 4/520(0%) |
| LSA32.1                            | D1/D2  | <i>Lipomyces kononenkoeae</i>      | CBS 2514     | KY108299.1     | 486/491(99%)  | 0/491(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 531/536(99%)  | 0/536(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces starkeyi</i>          | NRRL Y-11557 | JQ689072.1     | 531/536(99%)  | 0/536(0%) |
|                                    | ITS    | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557     | AB747663.1     | 504/523(96%)  | 4/523(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | NR_138181.1    | 504/523(96%)  | 5/523(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces kononenkoeae</i>      | CBS 2514     | AB614132.1     | 504/523(96%)  | 5/523(0%) |
| LSA33.2                            | D1/D2  | <i>Lipomyces kononenkoeae</i>      | CBS 2514     | AB747653.1     | 569/570(99%)  | 0/570(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NG_055384.1    | 568/571(99%)  | 0/571(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 567/570(99%)  | 0/570(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces starkeyi</i>          | NRRL Y-11557 | JQ689072.1     | 565/568(99%)  | 0/568(0%) |
|                                    |        | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | DQ518980.1     | 565/568(99%)  | 0/568(0%) |

| Isolado                            | Região                  | Espécie                            | Linhagem                      | Acesso Genbank | Identidade   |              |           |
|------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|-------------------------------|----------------|--------------|--------------|-----------|
|                                    |                         |                                    |                               |                | D1/D2        | Gaps         |           |
|                                    | ITS                     | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514                      | AB614132.1     | 509/510(99%) | 0/510(0%)    |           |
|                                    |                         | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557                      | AB747663.1     | 492/509(97%) | 4/509(0%)    |           |
|                                    |                         | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532                      | NR_136955.1    | 493/511(96%) | 5/511(0%)    |           |
| LSA35.1                            | D1/D2                   | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532                      | AB747662.1     | 526/531(99%) | 0/531(0%)    |           |
|                                    |                         | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514                      | AB747653.1     | 526/531(99%) | 0/531(0%)    |           |
|                                    |                         | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729                      | AB747652.1     | 526/531(99%) | 0/531(0%)    |           |
|                                    |                         | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557                      | NG_055386.1    | 526/531(99%) | 0/531(0%)    |           |
|                                    |                         | <i>Lipomyces starkeyi</i>          | NRRL Y-11557                  | JQ689072.1     | 525/530(99%) | 0/530(0%)    |           |
|                                    | ITS                     | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608                      | NR_138181.1    | 487/504(97%) | 4/504(0%)    |           |
|                                    |                         | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514                      | AB614132.1     | 487/504(97%) | 4/504(0%)    |           |
|                                    | LSA36.1                 | D1/D2                              | <i>Lipomyces kononenkoae</i>  | CBS:2514       | AB747653.1   | 564/565(99%) | 0/565(0%) |
|                                    |                         |                                    | <i>Lipomyces starkeyi</i>     | NRRL Y-11557   | JQ689072.1   | 564/567(99%) | 0/567(0%) |
|                                    |                         |                                    | <i>Lipomyces tetrasporus</i>  | CBS 5910       | NG_055384.1  | 564/567(99%) | 0/567(0%) |
| <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> |                         |                                    | CBS 5608                      | DQ518980.1     | 564/567(99%) | 0/567(0%)    |           |
| <i>Lipomyces kockii</i>            |                         |                                    | CBS 7729                      | AB747652.1     | 562/565(99%) | 0/565(0%)    |           |
| ITS                                |                         | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514                      | NR_138180.1    | 498/499(99%) | 0/499(0%)    |           |
|                                    |                         | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557                      | JN943159.1     | 483/500(97%) | 4/500(0%)    |           |
| LSA37.1                            |                         | D1/D2                              | <i>Lipomyces yamadae</i>      | CBS 7532       | AB747662.1   | 564/565(99%) | 0/565(0%) |
|                                    |                         |                                    | <i>Lipomyces yarrowii</i>     | CBS 7557       | NG_055386.1  | 564/565(99%) | 0/565(0%) |
|                                    |                         |                                    | <i>Lipomyces kononenkoae</i>  | CBS 2514       | AB747653.1   | 560/561(99%) | 0/561(0%) |
|                                    | <i>Lipomyces kockii</i> |                                    | CBS 7729                      | AB747652.1     | 560/565(99%) | 0/565(0%)    |           |
|                                    | ITS                     | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532                      | NR_136955.1    | 516/519(99%) | 2/519(0%)    |           |
|                                    |                         | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557                      | AB747663.1     | 506/521(97%) | 4/521(0%)    |           |
|                                    |                         | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608                      | NR_138181.1    | 502/522(96%) | 7/522(1%)    |           |
|                                    | LSA37.2                 | D1/D2                              | <i>Lipomyces starkeyi</i>     | NRRL Y-11557   | JQ689072.1   | 556/561(99%) | 0/561(0%) |
|                                    |                         |                                    | <i>Lipomyces doorenjongii</i> | CBS 7542       | NG_055383.1  | 555/561(99%) | 0/561(0%) |
|                                    |                         |                                    | <i>Lipomyces mesembrius</i>   | CBS 7661       | AB747656.1   | 555/561(99%) | 0/561(0%) |
| ITS                                |                         | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557                      | AB747663.1     | 502/521(96%) | 4/521(0%)    |           |

| Isolado  | Região       | Espécie                            | Linhagem     | Acesso Genbank | Identidade    |           |
|----------|--------------|------------------------------------|--------------|----------------|---------------|-----------|
|          |              |                                    |              |                | D1/D2         | Gaps      |
| LSA38.1  | <b>D1/D2</b> | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | NR_138181.1    | 502/521(96%)  | 5/521(0%) |
|          |              | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | AB747653.1     | 528/533(99%)  | 0/533(0%) |
|          |              | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 528/533(99%)  | 0/533(0%) |
|          |              | <i>Lipomyces starkeyi</i>          | NRRL Y-11557 | JQ689072.1     | 528/533(99%)  | 0/533(0%) |
|          | <b>ITS</b>   | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557     | AB747663.1     | 484/502(96%)  | 4/502(0%) |
|          |              | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | AB747658.1     | 484/502(96%)  | 5/502(0%) |
|          |              | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | AB614132.1     | 484/502(96%)  | 5/502(0%) |
| LSA42.1  | <b>D1/D2</b> | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | AB747653.1     | 515/518(99%)  | 2/518(0%) |
|          |              | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532     | AB747662.1     | 498/519(96%)  | 7/519(1%) |
|          |              | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | DQ518980.1     | 497/519(96%)  | 6/519(1%) |
|          | <b>ITS</b>   | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | NR_138180.1    | 515/518(99%)  | 2/518(0%) |
|          |              | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532     | NR_136955.1    | 498/519(96%)  | 7/519(1%) |
|          |              | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | AB747658.1     | 497/519(96%)  | 6/519(1%) |
|          |              |                                    |              |                |               |           |
| LSA44.1  | <b>D1/D2</b> | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557     | NG_055386.1    | 540/540(100%) | 0/540(0%) |
|          |              | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532     | AB747662.1     | 538/540(99%)  | 0/540(0%) |
|          |              | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | AB747653.1     | 538/540(99%)  | 0/540(0%) |
|          |              | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 534/540(99%)  | 0/540(0%) |
|          |              | <i>Lipomyces starkeyi</i>          | NRRL Y-11557 | JQ689072.1     | 534/540(99%)  | 0/540(0%) |
|          | <b>ITS</b>   | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557     | AB747663.1     | 511/521(98%)  | 1/521(0%) |
|          |              | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532     | NR_136955.1    | 510/520(98%)  | 1/520(0%) |
|          |              | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | AB747658.1     | 502/522(96%)  | 4/522(0%) |
|          |              |                                    |              |                |               |           |
| LSA46.2= | <b>D1/D2</b> | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | AB747653.1     | 527/528(99%)  | 0/528(0%) |
| LSA60.1= |              | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729     | AB747652.1     | 525/528(99%)  | 0/528(0%) |
| LSA65.1= |              | <i>Lipomyces starkeyi</i>          | NRRL Y-11557 | JQ689072.1     | 525/528(99%)  | 0/528(0%) |
| LSA67.1= |              | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910     | NG_055384.1    | 525/528(99%)  | 0/528(0%) |
| LSA67.2  |              | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608     | DQ518980.1     | 525/528(99%)  | 0/528(0%) |
|          | <b>ITS</b>   | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514     | NR_138180.1    | 509/510(99%)  | 0/510(0%) |
|          |              | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532     | NR_136955.1    | 493/511(96%)  | 5/511(0%) |



| Isolado | Região       | Espécie                            | Linhagem    | Acesso Genbank | Identidade    |           |
|---------|--------------|------------------------------------|-------------|----------------|---------------|-----------|
|         |              |                                    |             |                | D1/D2         | Gaps      |
|         |              | <i>Lipomyces spencermartinsiae</i> | CBS 5608    | AB747658.1     | 492/511(96%)  | 4/511(0%) |
| LSA49.2 | <b>D1/D2</b> | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557    | NG_055386.1    | 538/538(100%) | 0/538(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532    | AB747662.1     | 536/538(99%)  | 0/538(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514    | AB747653.1     | 531/535(99%)  | 0/535(0%) |
| LSA66.1 | <b>D1/D2</b> | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557    | NG_055386.1    | 533/534(99%)  | 0/534(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532    | NG_055351.1    | 528/531(99%)  | 0/531(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514    | DQ518977.1     | 527/530(99%)  | 0/530(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729    | AB747652.1     | 529/534(99%)  | 0/534(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces mesembrius</i>        | CBS 7661    | AB747656.1     | 528/534(99%)  | 0/534(0%) |
|         | <b>ITS</b>   | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557    | AB747663.1     | 486/497(98%)  | 1/497(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces okinawensis</i>       | NBRC 110620 | NR_155341.1    | 484/495(98%)  | 2/495(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces yamadae</i>           | CBS 7532    | NR_136955.1    | 485/497(98%)  | 3/497(0%) |
| LSA70.1 | <b>D1/D2</b> | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514    | AB747653.1     | 574/575(99%)  | 0/575(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces tetrasporus</i>       | CBS 5910    | NG_055384.1    | 573/576(99%)  | 0/576(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces kockii</i>            | CBS 7729    | AB747652.1     | 572/575(99%)  | 0/575(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces mesembrius</i>        | CBS 7661    | AB747656.1     | 571/575(99%)  | 0/575(0%) |
|         | <b>ITS</b>   | <i>Lipomyces kononenkoae</i>       | CBS 2514    | NR_138180.1    | 506/510(99%)  | 3/510(0%) |
|         |              | <i>Lipomyces yarrowii</i>          | CBS 7557    | JN943159.1     | 489/509(96%)  | 7/509(1%) |

