

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FERNANDA FRAGA GOMES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA COMUNIDADE DE LEVEDURAS
ASSOCIADAS A MACRÓFITAS AQUÁTICAS EM UMA REGIÃO DE MARISMA
DA LAGOA DOS PATOS (RS)**

**IMBÉ
2016**

FERNANDA FRAGA GOMES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA COMUNIDADE DE LEVEDURAS
ASSOCIADAS A MACRÓFITAS AQUÁTICAS EM UMA REGIÃO DE MARISMA
DA LAGOA DOS PATOS (RS)**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em
Biologia Marinha na Universidade Federal do Rio
Grande do Sul

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Valente da Silva

Co-orientador: Me. Mauricio Ramírez Castrillón

IMBÉ

2016

Aos examinadores,

Este trabalho está formatado segundo a obra de DA SILVA, L. N. *et al.* **Manual de trabalhos acadêmicos e científicos**: orientações práticas à comunidade universitária da UERGS. Porto Alegre: UERGS, 2010., que segue as normas da ABNT.

CIP - Catalogação na Publicação

Gomes, Fernanda Fraga

Identificação molecular da comunidade de leveduras associadas a macrófitas aquáticas em uma região de marisma da Lagoa dos Patos (RS) / Fernanda Fraga Gomes. -- 2016.

38 f.

Orientadora: Patricia Valente da Silva.

Coorientador: Mauricio Ramírez Castrillón.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Curso de Ciências Biológicas: Biologia Marinha e Costeira, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. biologia molecular. 2. microbiologia. 3. micologia. I. da Silva, Patricia Valente, orient. II. Castrillón, Mauricio Ramírez, coorient. III. Título.

FERNANDA FRAGA GOMES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA COMUNIDADE DE LEVEDURAS
ASSOCIADAS A MACRÓFITAS AQUÁTICAS EM UMA REGIÃO DE MARISMA
DA LAGOA DOS PATOS (RS)**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biológicas com
ênfase em Biologia Marinha na Universidade
Federal do Rio Grande do Sul

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Valente da
Silva

Aprovado em:/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Lúcia Scroferneker
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS

Ma. Ângela Peres Palú
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS

Coordenador da atividade TCC II – CBM: Prof. Dr. Enio Lupchinski Junior
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

**IMBÉ
2016**

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à UFRGS, universidade da qual eu sempre quis fazer parte, pelo ensino superior gratuito e de qualidade. Sou grata também à FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul) pelo apoio financeiro e à UERGS, universidade que também me proporcionou ensino gratuito e acesso ao conhecimento por meio do seu time de professores engajados.

Muito obrigada à Professora Patricia Valente, minha orientadora, que abriu as portas do Laboratório de Micologia para mim, me proporcionando contato direto com a ciência e consequentemente ampliando os meus conhecimentos de forma significativa. Obrigada também pelo constante incentivo, cobranças e elogios, e também pelas palavras carinhosas e confortáveis que também foram acolhidas com muito prazer.

Dedico um parágrafo exclusivo dos meus agradecimentos ao Maurício Cartrillón, meu co-orientador, que desde a minha chegada ao Laboratório me passou muitos dos seus conhecimentos práticos e teóricos, em especial na área da biologia molecular, tão pequena e restrita dentro do nosso espaço de trabalho, mas que nos proporciona resultados magníficos. Muito obrigada, Maurício, por todos os finais de semana de trabalho, por todas as vezes que tu me repetiste as explicações, o passo a passo, e por estar sempre presente, mesmo quando na verdade estavas a milhas e milhas de distância.

A todas as meninas do Laboratório de Micologia, do Departamento de Microbiologia, ICBS. Um obrigada especial à Daiane Heidrich, que me deu suporte na ausência do Maurício e que respondia a tantas perguntas, das mais básicas às mais complicadas. Agradeço ainda à Belize Leite, que em cada um de seus retornos ao lab dedicava um instante do seu tempo para sanar as minhas dúvidas. Aproveito ainda para agradecer à Andrea Souza, que também se disponibilizou a contribuir para a produção deste trabalho.

Aos bibliotecários do CECLIMAR, Ângelo e Stella, que, com a sua harmonia, fazem da nossa biblioteca um lugar amigável, e que estão sempre prontos para nos auxiliar desde os primeiros até os últimos passos dentro da Universidade. Obrigada também à Marlene, que me ajudou tanto em processos burocráticos nos últimos tempos.

Ainda agradeço a toda a equipe do Centro de Reabilitação de Animais Marinhos e Silvestres, a todos colegas com os quais tive a oportunidade de trabalhar. Obrigada também ao Mauricio Tavares, quem me proporcionou este contato privilegiado e direto com os animais, contato este que sempre fez parte da minha vontade e que demonstra todo o carinho e respeito que tenho pela vida selvagem.

À amiga que a faculdade me deu, Marina Pasetto, que os nossos dias sejam cheios de risadas, como sempre foram, e que eles perdurem. Torço pelo nosso futuro, pelo nosso sucesso.

Sou agradecida também à Rossana, à vó Marta, ao Samir e ao Diogo, pelo suporte, apoio e acolhimento em todos os momentos.

Agradeço ao meu namorado, Bernardo, que me apoia incondicionalmente, que me faz crescer como pessoa todos os dias, que está presente em todos os momentos, nos bons e nos ruins. Obrigada por ser exatamente quem tu és; te agradeço também por todo o suporte e por sempre acreditares em mim e no meu potencial.

À minha mãe, Iara, e ao meu padrasto, Fernando, por morarem no lugar mais lindo do mundo, que serve como meu refúgio, proporcionando todo o contato com a natureza. Agradeço a vocês dois pelo carinho e incentivo.

Ao meu pai, Nei, agradeço igualmente pelo carinho, incentivo e pela amizade. À minha irmã, Shana, que me proporciona momentos em família naquelas horas em que nem toda a família pode estar presente. Obrigada pelo cuidado, carinho e apoio. À minha afilhada linda e amada, Anahí, que me enche de vida, de leveza, me traz esperança e proporciona momentos muito alegres e cheios de esperteza.

“O tamanho das coisas depende da intensidade com que a gente se aproxima ou se afasta delas” (Anônimo)

RESUMO

Estima-se que somente 20% das espécies de fungos no mundo são atualmente conhecidas e que as leveduras são os micro-organismos decompositores menos estudados na literatura. Este padrão é mantido no estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande – RS, Brasil) e região costeira adjacente. Neste sentido, nós objetivamos realizar o levantamento das espécies de leveduras e fungos leveduriformes associados às macrófitas aquáticas *Spartina alterniflora* Loisel, *Spartina densiflora* Brongn. e *Bolboschoenus maritimus* (L.) Palla na Ilha da Pólvora, uma região de marisma da Lagoa dos Patos. Para atingir esse objetivo, nós utilizamos amostras de fungos *in natura* que já haviam sido coletadas, isoladas e morfologicamente classificadas pelo nosso grupo. Nós primeiro extraímos o DNA a partir dos isolados, e então realizamos a técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR) da região ITS do rDNA utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ITS5 e ITS4. Após, a região amplificada foi sequenciada e comparada com a base de dados de sequências genéticas GenBank. De 88 leveduras isoladas, conseguimos o resultado de sequenciamento de 76 amostras, e encontramos 19 espécies diferentes pertencentes aos filos Ascomycota e Basidiomycota (10 e 9, respectivamente). Muitas destas já haviam sido reportadas como espécies que vivem em habitats semelhantes ao da área de estudo; por exemplo, *Scheffersomyces spartinae* tem sido identificada como uma levedura aquática com adaptação para resistir à salinidade que é associada a macrófitas aquáticas. No entanto, nós salientamos que a sequência de sete espécies (37%) não correspondeu àquelas do GenBank, as quais provavelmente são espécies ainda não descritas, indicando a falta de estudos científicos sobre a biodiversidade na área de estudo. A partir destes resultados, podemos afirmar que ampliamos o conhecimento sobre a diversidade de leveduras e fungos leveduriformes associados à região de marisma da Lagoa dos Patos. Por fim, nossos dados também corroboram com a estimativa de que ainda há uma plethora de espécies de fungos atualmente desconhecidas.

Palavras-chave: identificação molecular, levedura, fungos leveduriformes, marisma, macrófitas aquáticas

ABSTRACT

It is estimated that only 20% of the world Fungi species are currently known, and that the yeasts are the least studied decomposer microorganisms in the literature. This pattern is conserved in the Patos Lagoon estuary (Rio Grande-RS, Brazil) and adjacent coastal area. Therefore, we aimed to identify the yeasts and yeast-like fungi associated with the aquatic macrophytes *Spartina alterniflora* Loisel, *Spartina densiflora* Brongn. and *Bolboschoenus maritimus* (L.) Palla at Ilha da Pólvora, a marsh area in the Patos Lagoon. To pursue this aim, we used *in natura* fungal samples that had been previously collected, isolated and morphologically classified by our group. We first extracted DNA from the isolates, and then performed the polymerase chain reaction (PCR) technique to amplify the ITS region of the rDNA using the ITS5 and ITS4 primers. The amplified ITS region was further sequenced and compared to the genetic sequence database GenBank. Out of 88 isolates, we sequenced 76 samples, and found 19 different species belonging to the phyla Ascomycota and Basidiomycota (10 and 9, respectively). Many of these species had already been reported as living in habitats similar to the study area; for instance, *Scheffersomyces spartinae* has been identified as an aquatic yeast with salinity-resistant adaptation that is associated to aquatic plants. However, we point out that the sequence of seven species (37%) did not match with any of those from GenBank, which are likely not yet described species, indicating the lack of scientific investigations on the biodiversity of the study area. From these results, we can conclude that this work broadens the knowledge about the yeast and yeast-like fungi associated with the marsh area of the Patos Lagoon. Finally, our data also corroborates the estimation that there is a plethora of currently unknown fungal species.

Keywords: molecular identification, yeast, yeast-like fungi, marsh, aquatic macrophytes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	MARISMAS	12
2.2	DECOMPOSIÇÃO DAS MACRÓFITAS AQUÁTICAS	12
2.3	MÉTODOS MOLECULARES.....	13
2.4	POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	ÁREA DE ESTUDO	16
3.2	AMOSTRAGEM.....	17
3.3	ISOLAMENTO E AGRUPAMENTO POR MORFOLOGIA DE LEVEDURAS E FUNGOS LEVEDURIFORMES	17
3.3.1	Teste para determinação do filo dos isolados	18
3.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	19
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1	REPRESENTAÇÃO DE ALGUNS RESULTADOS DE EXTRAÇÕES DE DNA E TESTE PCR.....	21
4.2	RELAÇÃO FUNGO X MACRÓFITAS	22
4.3	AGRUPAMENTO BASEADO NA MORFOLOGIA EM COMPARAÇÃO COM A ANÁLISE MOLECULAR	25
4.4	ANÁLISE FILOGENÉTICA	27
5	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	30
	APÊNDICE A	33
	APÊNDICE B	36
	APÊNDICE C	37
	APÊNDICE D	38

1 INTRODUÇÃO

A ciência que estuda os fungos é conhecida como Micologia. O reino Fungi alberga as leveduras unicelulares, os bolores multicelulares e espécies macroscópicas como os cogumelos. Para obter matéria-prima para as funções vitais, um fungo absorve a matéria orgânica dissolvida através de sua membrana plasmática. Todos os fungos são quimioheterotróficos, necessitando de componentes orgânicos como fontes de energia e carbono (TORTORA, 2012).

Até 2013 foram reportadas aproximadamente 100 mil espécies de fungos; no entanto, estima-se que há cerca de 6 milhões de espécies ainda não descritas (TAYLOR et al., 2013). Estes dados demonstram que ainda há muitas espécies para descrever e estudar acerca da sua ecologia.

As leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, tipicamente esféricos ou ovais. A palavra levedura, bem como o seu equivalente em outros idiomas, é baseada em palavras com o significado de “crescer”, diretamente relacionadas ao processo de fermentação que produz cervejas e pães. Por esta razão, leveduras são frequentemente relacionadas aos fungos ascomicetos, que possuem esta capacidade fermentativa. As leveduras e os ascomicetos são geralmente usados como sinônimos. Contudo, os fungos leveduriformes, caracterizados por serem micetos unicelulares e não filamentosos, possuem representantes tanto no filo Ascomycota, quanto no filo Basidiomycota. Estes dois filamentos têm por característica sua reprodução assexuada por brotamento ou fissão, mas também podem produzir esporos: os ascósporos e os basidiósporos (KURTZMAN *et al.*, 2011).

A micobiota pode ser isolada de múltiplas fontes: néctar de flores, resinas de árvores, superfícies de plantas, água doce e marinha, solos, frutos, animais, corpo humano e detritos em geral (MADIGAN *et al.*, 2010). As leveduras basidiomicéticas são onipresentes em diversos habitats marinhos, são usualmente consideradas alóctones, especialmente porque muitas leveduras desta divisão estão frequentemente associadas ao filoplano das plantas (terrestres e aquáticas) (HAGLER; AHEARN, 1987).

Os fungos são organismos significativamente importantes na cadeia alimentar, por decomporem matéria vegetal morta, reciclando elementos vitais a partir do uso de enzimas extracelulares, como as celulases. Os fungos são os principais decompositores de partes duras das plantas, que não podem ser digeridas pelos animais. A quantidade e a qualidade dos nutrientes disponíveis no filoplano (a superfície das folhas das plantas) são ótimas condições para a inter-relação planta/fungo. A associação entre muitos grupos de plantas, incluindo as

macrófitas aquáticas, e leveduras vem sendo relatada nos últimos anos (BIANCHINI Jr, 2003).

As associações entre plantas e leveduras demonstram grande influência destes fungos na modulação do equilíbrio destes micro-habitats (VALENTE, 2000). Especificamente na região de marisma da Lagoa dos Patos, há estudos que avaliam a composição da assembleia de leveduras no processo de decomposição de macrófitas aquáticas. Leite (2014) isolou leveduras e fungos leveduriformes de macrófitas em decomposição e os avaliou quanto ao seu potencial biotecnológico. Em cada coleta foram amostradas macrófitas pertencentes às espécies *Spartina alterniflora* Loisel, *Spartina densiflora* Brongn e *Bolboschoenus maritimus* (L.) Palla, sendo esta última espécie anteriormente conhecida como *Scirpus maritimus* L. As espécies de macrófitas foram escolhidas em virtude da abundância no local do estudo.

Este trabalho tem como objetivo identificar molecularmente as leveduras coletadas por Souza (2014) associadas a macrófitas aquáticas da ilha da Pólvora, em uma região de marisma da Lagoa dos Patos na cidade de Rio Grande. Para que o propósito da identificação fosse contemplado, foi realizada a amplificação por PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores ITS5 e ITS4.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MARISMAS

Há dois tipos conhecidos de ecossistemas encontrados próximos às regiões estuarinas que são regularmente banhados de acordo com as variações de marés e dos níveis dos rios: as marismas e os manguezais. Observa-se que estes dois ecossistemas são comumente confundidos. A distribuição de ambos é global, porém as marismas ocorrem principalmente nas regiões temperadas, ao passo que os manguezais geralmente ocupam costas de menores latitudes (DEEGAN *et al.*, 2012). Marismas são ecossistemas localizados em áreas entremarés, ou seja, percebem-se nestes locais, variações nos níveis da água, e essas variações são influenciadas pelas preamares e também pelos níveis dos rios. Uma característica marcante deste ecossistema é, portanto, a salinidade: são ambientes salobros, uma vez que se encontram próximos a lagunas e estuários.

A cobertura vegetal encontrada nas marismas é herbácea emergente. A vegetação está disposta em função do grau e do tempo de inundação de cada zona, classificando as espécies de marismas baixas (zonas inundadas constantemente), médias (ocasionalmente inundadas) e altas (raramente inundadas) (ELEUTERIUS, 1979). Além da cobertura vegetal, estes locais ainda são habitats bastante relevantes para a vida animal; neles há a ocorrência de espécies de moluscos, crustáceos, insetos, peixes, aves e mamíferos. Percebe-se, assim, a grande importância do local para a produção primária e também para os demais níveis tróficos (PRATES *et al.*, 2012).

2.2 DECOMPOSIÇÃO DAS MACRÓFITAS AQUÁTICAS

A matéria orgânica não viva é conhecida como detrito: o que está sendo decomposto de um organismo que estava vivo. Adicionalmente, o detrito pode incluir produtos da excreção e da exsudação dos processos de decomposição (MOORE *et al.*, 2004).

A decomposição vegetal é gradual e depende de muitos mecanismos, como por exemplo: 1) a lixiviação, a solubilização de compostos lábeis (i.e. que se decompõem facilmente); 2) a imobilização, que é a metabolização de um elemento em sua forma orgânica; e 3) a mineralização, resultante da liberação de formas inorgânicas na catabolização de um recurso (SCIESSERE, 2007). Estes processos são influenciados pelas comunidades de

espécies encontradas em tais ecossistemas, como também os processos físicos, químicos e a quantidade de biomassa a ser decomposta.

Macrófitas aquáticas possuem alta taxa de crescimento em região neotropical; este crescimento contribui para que essas plantas sejam uma ótima fonte de detritos em ecossistemas aquáticos (BOTTINO *et al.*, no prelo). Dos detritos de macrófitas aquáticas, 70% compreendem o carbono orgânico particulado, o qual constitui a parte fibrosa da planta e é caracterizado pelos polissacarídeos (e.g. celulose, hemicelulose e lignina) (TAIZ E ZEIGER, 2006). Os 30% restantes da matéria fazem parte do carbono orgânico dissolvido, que é composto por substâncias dissolvidas em água, como o nitrogênio, fósforo, carbono, oxigênio, entre outras (BIANCHINI Jr., 2003).

Organismos como bactérias e fungos são mediadores dos processos de decomposição, contribuindo para o ciclo do carbono, bem como para o aporte de nutrientes. Consequentemente, estes micro-organismos levam à formação de compostos inorgânicos, como os íons amônio e fosfato, bem como gases carbônicos e sulfídricos. Neste sentido, a perda de massa da planta é uma consequência destes processos (NUNES *et al.*, 2011).

As bactérias são o grupo de microorganismos decompositores vegetais melhor estudados, porém o papel da micobiota tem emergido, de modo que a diversidade de fungos que ocupa este nicho é considerável (SCHADT *et al.*, 2003). É importante notar a ocorrência tanto de organismos bacterianos como fúngicos nos tecidos vegetais, havendo esparsos relatos de dominância de comunidades de bactérias, geralmente associadas a ambientes com nutrientes limitados.

2.3 MÉTODOS MOLECULARES

Os métodos convencionais de análises laboratoriais para separação de organismos não se mostram eficientes para espécies de ambientes marinhos, sendo crescente a utilização de métodos moleculares a fim de contribuir para o entendimento de comunidades microbianas das marismas. Uma grande quantidade de descobertas de novas taxa está sendo realizada através destes métodos (SEENA *et al.*, 2008).

Anteriormente à análise filogenética de sequências de DNA, a colocação das leveduras entre os fungos era guiada por interpretação do fenótipo, as quais sugeriam que as leveduras eram fungos primitivos. Sabemos agora, com o avanço das técnicas que possibilitam testes moleculares, que as leveduras se enquadram entre os fungos basidiomicetos e os ascomicetos.

Vê-se a partir dos novos conhecimentos a importância da biologia molecular para a revolução taxonômica no reino dos fungos. (KURTZMAN *et al.*, 2015)

As identificações das leveduras para a obtenção dos resultados desejados neste trabalho serão realizadas a partir do sequenciamento das regiões ITS (Espaçadores Transcritos Internos) para fins de identificação em nível de espécie utilizando a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Schoch *et al.* (2012) analisaram seis diferentes regiões do DNA de fungos com o intuito de avaliar qual delas traria um melhor resultado, a região ITS respondeu como a que possui maior probabilidade de identificação bem-sucedida para a mais ampla variedade de fungos. As regiões ITS separam as subunidades menor (18S) e maior (26S) ribossomais e podem ser amplificadas com primers específicos ancorados nessas duas regiões (FELL *et al.*, 2000).

2.4 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

A identificação de leveduras até o nível taxonômico de espécie é importante para o direcionamento de trabalhos de bioprospecção. A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a mais estudada entre as leveduras, sendo utilizada pelo homem há muitos anos em processos fermentativos (TORTORA, 2012). Estudos sobre potencial biotecnológico que incluem outras leveduras são pouco frequentes, mas eles têm demonstrado que leveduras isoladas de ambientes tropicais representam uma fonte de várias enzimas com potencial para uso biológico (VALENTE, 2000).

O fungo leveduriforme *Aureobasidium pullulans* é um micro-organismo globalmente presente e encontrado no filoplano de plantas e frutos em regiões tropicais. A importância comercial desta espécie deve-se à produção de enzimas de amplo interesse industrial, bem como de proteína. *A. pullulans* possui a capacidade de produzir pululana, um polissacarídeo de aplicação nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e de celulose (RICH *et al.*, 2013). Adicionalmente, podem agir como bioindicadores de poluição. O sistema enzimático destes fungos possui uma enzima chamada lacase que tem a capacidade de degradação de lignina. Estas enzimas catalisam a reação de desmetilação, que é o estágio inicial no processo de biodegradação de cadeias poliméricas, ocorrendo a decomposição de macromoléculas de lignina a partir da ruptura dos anéis aromáticos. Em processo de oxidação de muitos compostos, a lacase apresenta uma alta especificidade para um grande número de efluentes industriais. Sua potencial aplicação na indústria inclui degradação de corantes da indústria

têxtil e materiais tóxicos. Rich *et al.* (2013) demonstraram que a produção de lacases por *A. pullulans* está associada à produção de pigmentos pelas linhagens.

A utilização de micro-organismos em processos de biorremediação é uma alternativa economicamente mais interessante comparada aos principais métodos físico-químicos de tratamento de efluentes. A busca contínua (principalmente a nível específico) de organismos versáteis com capacidade de degradar diversos poluentes de maneira eficiente e com baixo custo é o que motiva pesquisas de biodegradação (KUNZ, 2011).

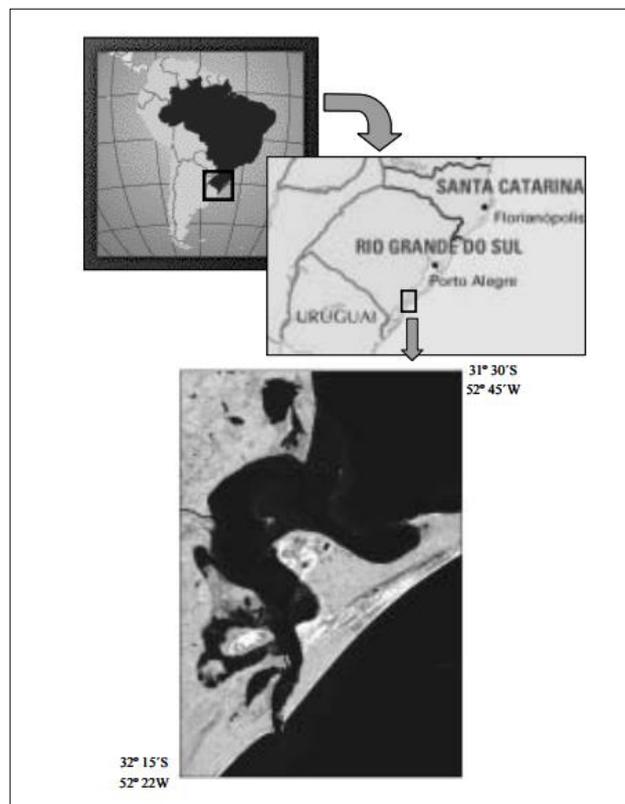
Há poucos trabalhos que versam sobre o potencial biotecnológico das espécies de leveduras do estuário da Lagoa dos Patos (LEITE, 2014; SOUZA, 2014). No entanto, destaca-se o papel das leveduras deste ambiente na produção enzimática de lipase, esterase, celulase, caseinase e amilase em ordem quantitativa (LEITE, 2014). Além disso, Souza (2014) comparou o potencial entre leveduras e fungos leveduriformes associados a macrófitas em decomposição e *in natura*, concluindo que ambos os substratos são boas fontes de enzimas de interesse industriais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

A Lagoa tem como limite continental de distribuição o canal de São Gonçalo na margem oeste e a Ponta Rasa na margem leste. Os municípios de Rio Grande e São José do Norte localizam-se respectivamente nas margens oeste e leste da Lagoa dos Patos (Figura 1). A área de marisma da Lagoa dos Patos ocorre em torno das margens e ilhas do seu estuário, abrangendo 70km² de área. Há, na Lagoa dos Patos, 24 unidades de marismas que se restringem à sua margem inferior. A Lagoa recebe cargas de água doce dos rios da planície costeira do Rio Grande do Sul e dos rios afluentes da Lagoa Mirim, assim formando um escoadouro natural da bacia hidrográfica para o Oceano Atlântico que está situado na extremidade sul e forma com a Lagoa dos Patos uma região estuarina de 1.000 Km² (NOGUEIRA; COSTA 2003). As coordenadas da área de estudo são: 32°01'16.9"S 52°06'16.9"W.

Figura 1 - Localização da área de estudo. Estuário da Ilha da Pólvora, Lagoa dos Patos. RS

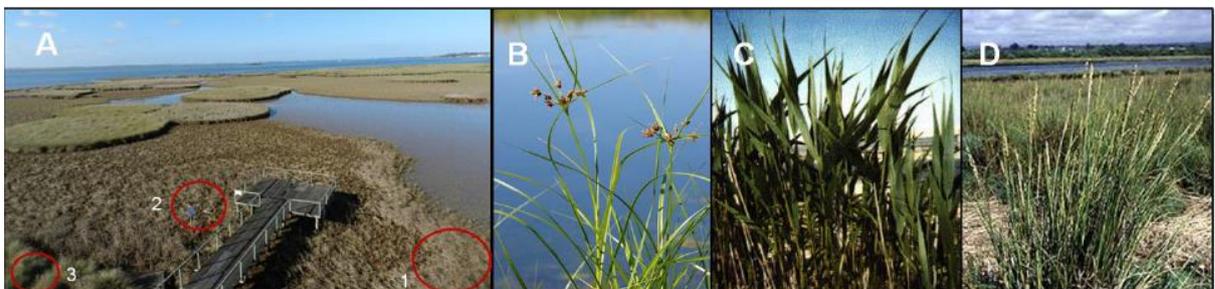


Fonte: Nogueira e Costa (2003).

3.2 AMOSTRAGEM

O presente estudo baseia-se nas cinco coletas realizadas na Ilha da Pólvora, Souza (2014) e Leite (2014) realizaram cinco coletas de macrófitas aquáticas entre junho de 2012 e janeiro de 2013 na região de marismas da Lagoa dos Patos, no município de Rio Grande - RS. Este período de coleta permitiu avaliar duas estações do ano. As plantas macrófitas pertencem às espécies *Spartina alterniflora* Loisel, *Spartina densiflora* Brongn., e *Bolboschoenus maritimus* (L.) Palla (figura 2). Em relação à morfologia das plantas, *Bolboschoenus maritimus* apresenta o colmo triangular e folhas largas pertencendo à família Cyperaceae; *Spartina alterniflora* e *Spartina densiflora*, pertencem à família Poaceae e como característica desta família possuem colmo circular, diferenciando-se uma da outra no tamanho do diâmetro do colmo. Hastes e folhas das três espécies de macrófitas *in natura* foram retiradas de três pontos distintos das marismas. As plantas foram preservadas em sacos plásticos individuais, etiquetadas, transportadas em caixas refrigeradas e então processadas em laboratório em um pequeno intervalo de 24h.

Figura 2 – Espécies de macrófitas aquáticas nas quais os fungos foram coletados



Fonte: Souza (2014). A: Marisma da Ilha da Pólvora; B: *Bolboschoenus maritimus*; C: *Spartina alterniflora*; D: *Spartina densiflora*.

3.3 ISOLAMENTO E AGRUPAMENTO POR MORFOLOGIA DE LEVEDURAS E FUNGOS LEVEDURIFORMES

Primeiramente, as plantas foram cortadas em pequenos pedaços com lâmina estéril e 3g de cada amostra foram colocadas em frascos erlenmeyers contendo 30mL de detergente Tween 20 na concentração 0,5% (p/v). Os frascos foram agitados em shaker orbital programado com velocidade de 200rpm por 30 minutos. A partir da mistura, foram realizadas diluições decimais (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e 0,1mL foi pipetado e inoculado de acordo com a

técnica de *Spread plate* em placas de Petri contendo meio de cultura YM (1% (p/v) de glicose, 0,3% (p/v) de extrato de malte, 0,3% (p/v) de extrato de levedura, 0,5% (p/v) de peptona, 2% (p/v) de ágar, suplementado com 0,04% (p/v) de cloranfenicol e 0,01% (p/v) de bifenila; ajustado a pH=4).

Após incubação a 20-25°C por sete dias, as placas foram examinadas, fotografadas e as unidades formadoras de colônia foram contabilizadas. As colônias presentes foram agrupadas de acordo com a sua morfologia e conforme os seguintes aspectos: cor, tamanho, forma, elevação, margem, brilho e consistência. Os isolados das leveduras foram conservados em tubos com meio de cultura GYP inclinado (1% (p/v) de extrato de levedura; 1% (p/v) de peptona; 2% (p/v) de glicose; 2% (p/v) de ágar), cobertos com uma camada de óleo mineral estéril a 4°C com a finalidade de conservar os isolados. As metodologias de isolamento e avaliação do potencial biotecnológico das leveduras foram realizadas de acordo com as utilizadas por Landell (2009).

3.3.1 Teste para determinação do filo dos isolados

Os isolados foram testados quanto à capacidade de reagir com o corante DBB. O teste com o Diazonium Blue B é um teste bioquímico que distingue as leveduras e os fungos leveduriformes em dois grupos distintos: Ascomycota e Basidiomycota. A parede celular das colônias basidiomicéticas reagem ao DBB tingindo-se de vermelho, ao contrário das colônias ascomicéticas que não reagem ao corante (DEAK, 2006; Figura 3).

Figura 3 – Diferenças de ascomiceto e basidiomiceto após o teste DBB.



Fonte: Souza (2014)

3.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

As leveduras foram identificadas a nível taxonômico de espécie ou gênero por meio de métodos moleculares, passando pelas seguintes etapas: extração do DNA genômico, amplificação de regiões ribossomais usando a técnica de PCR, purificação e sequenciamento, realizado a partir do método de Sanger. A extração do DNA genômico total das leveduras isoladas foi realizada a partir de culturas puras dos isolados previamente cultivados em ágar YM e incubados por três a cinco dias a temperatura de 23-25°C. Alçadas de colônias puras foram inoculadas em 0,5mL de tampão de lise celular (0,15M NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 2% SDS, pH8) e incubadas à 65°C pelo período de uma hora. A seguir foi adicionado um volume de 0,2mL de acetato de potássio 5M pH 4,8 em tubos eppendorfs, a solução foi ressuspendida por no mínimo 30 segundos e as amostras foram preservadas em banho de gelo por 30 minutos. Os tubos foram centrifugados a 14000rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. A etapa de centrifugação foi repetida para eliminar impurezas, e o sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo eppendorf. O DNA foi precipitado com 1mL de isopropanol gelado à -20°C. Os tubos foram homogenizados por inversão durante 5 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugados a 14000rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 0,5mL de etanol a 70% conservado a -20°C em cada tubo e as amostras foram centrifugadas a 14000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente. As amostras foram diluídas em 50µL de TE (TRIS-EDTA, pH 7,4) tratadas com 2,5µL de RNase (conservada à -20°C).

A quantidade e a qualidade do DNA obtido foram verificadas através de eletroforese de DNA em gel de agarose 1,5% (p/v) com solução de tampão TAE 1x. A amplificação por PCR da região ITS-5.8S-ITS2 foi realizada com os primers universais ITS5 (*Forward*) e ITS4 (*Reverse*) usando aproximadamente 1ng/µL de DNA. Para a verificação do produto de PCR também se utilizou gel de agarose 1,5% (p/v). Após a verificação do produto de PCR em gel, purificou-se a solução utilizando o kit ExoSapIT e finalmente o material foi submetido ao serviço UAMP (Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As sequências, resultantes do sequenciamento, foram editadas manualmente, unidas e comparadas com as cepas tipo depositadas no GenBank usando o algoritmo BLAST. Para identificação no nível taxonômico de espécie foi considerado uma identidade igual ou superior a 99% com uma cepa tipo. Sequências que não cumpriram esse critério foram classificadas usando análise filogenética. Árvores filogenéticas foram construídas usando o

método de Neighbour Joining e bootstrap com 500 repetições. Os clados foram considerados com suporte estatístico quando igual ou superior a 70.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada uma comparação dos agrupamentos realizados por morfologia e os resultados da identificação molecular (considerado como o padrão ouro). Erros na identificação por morfologia foi considerado como falso positivo, enquanto que a impossibilidade do sequenciamento foi considerada verdadeiro negativo. Acertos nos agrupamentos foram considerados verdadeiros positivos e a impossibilidade de agrupar o isolado foi considerada como falso negativo. Tendo em conta esses valores, foram feitos testes de sensibilidade e probabilidade de obter resultados positivos. Os dois testes seguem as lógicas das seguintes equações:

$$\textit{Sensibilidade} = \frac{\textit{Resultados Positivos}}{\textit{Resultados Positivos} + \textit{Falsos Negativos}}$$

e

$$\textit{Probabilidade de Resultados Positivo} = \left(\frac{\textit{Resultados Positivos}}{\textit{Resultados Positivos} + \textit{Falsos Positivos}} \right) \times 100$$

Portanto, a sensibilidade é o cálculo da divisão dos resultados positivos de cada grupo, pela soma dos mesmos com os resultados dos falsos negativos de cada grupo. Enquanto que para a probabilidade de resultados positivos usa-se praticamente o mesmo raciocínio, porém a divisão dos resultados positivos é feita pela soma dos mesmos com os resultados dos falsos positivos de cada grupo, sendo o valor final multiplicado por cem.

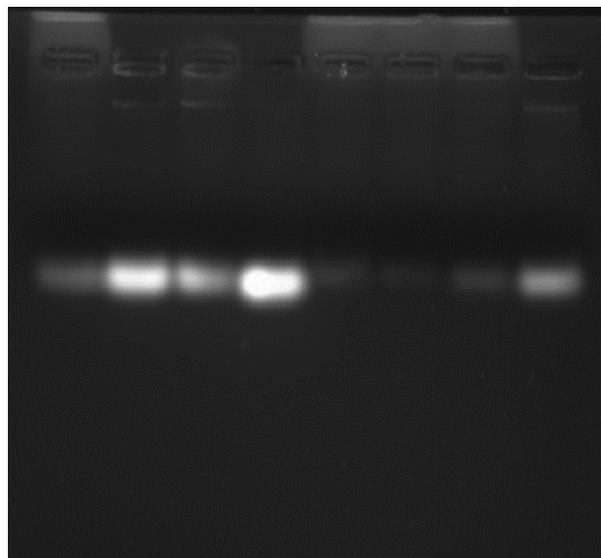
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final das coletas, obtiveram-se 88 isolados de leveduras e fungos leveduriformes a partir do filoplano das macrófitas aquáticas, dos quais 76 isolados foram identificados usando técnicas de biologia molecular. Do total, 37 isolados pertencem ao filo Basidiomycota (9 espécies), e os 39 isolados restantes correspondem ao filo Ascomycota (10 espécies). Portanto, encontramos 19 espécies distintas, sendo que sete (37%) delas não corresponderam a nenhuma sequência disponível no banco de dados Genbank e foram classificados como potenciais novas espécies. Trabalhos posteriores serão realizados para descrição de espécies novas.

4.1 REPRESENTAÇÃO DE ALGUNS RESULTADOS DE EXTRAÇÕES DE DNA E TESTE PCR

Um resultado de extração de DNA pode ser observado na Figura 4, que mostra uma fotografia registrada em fotodocumentador com luz ultravioleta.

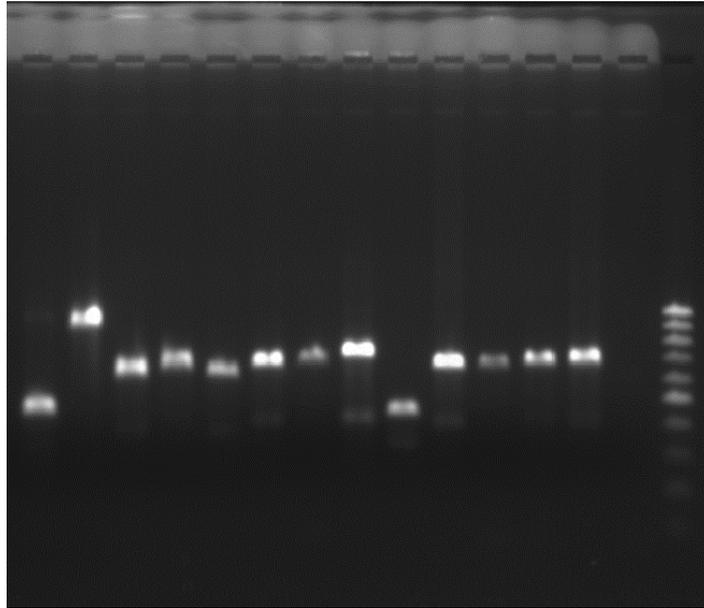
Figura 4 – Gel de eletroforese representando um resultado de extração de DNA



Fonte: autora (2016).

Após o programa estabelecido no termociclador, e a corrida do DNA no gel de eletroforese, realizada em cuba eletrolítica, vê-se o resultado do PCR em fotodocumentador com luz UV, assim como o resultado da extração de DNA. O que visualizamos está demonstrado na Figura 5.

Figura 5 – Gel de eletroforese representando o resultado de um PCR

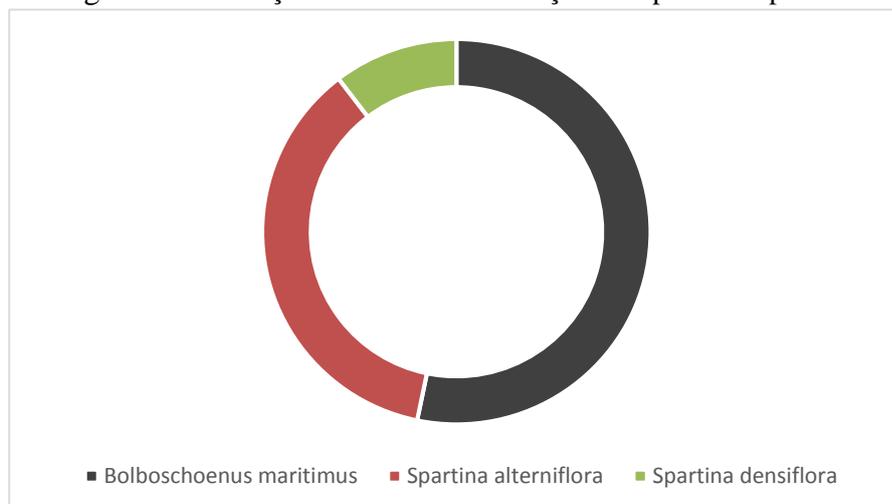


Fonte: autora (2016).

4.2 RELAÇÃO FUNGO X MACRÓFITAS

Em comparação com as três espécies diferentes de macrófitas aquáticas, foi encontrado que 53% dos fungos isolados foram obtidos a partir da espécie *Bolboschoenus maritimus*, 36% dos isolados de *Spartina alterniflora* e *Spartina densiflora* obteve 10% das espécies de fungos isoladas (Figura 6).

Figura 6 - Presença de leveduras em relação às espécies de plantas



Fonte: autora (2016).

Leite (2014) e Souza (2014) avaliaram a comunidade de leveduras das mesmas espécies de macrófitas aquáticas da região de marisma da Ilha da Pólvora. Porém enquanto Leite (2014) analisou as leveduras responsáveis pela decomposição destas plantas, Souza (2014) as coletou *in natura*. Comparando os dois trabalhos, vê-se que eles apresentaram alguns resultados diferenciados. Esta relação nos demonstra que a microbiota associada à planta viva não é necessariamente a mesma que atua no seu processo de decomposição, uma vez que os projetos foram realizados em paralelo e as condições ambientais foram as mesmas (Tabela 1). Um dado bastante expressivo é o da espécie *S. densiflora*, que apresentou apenas 10% das espécies de fungo, porém na análise de Leite (2014) este foi o substrato de origem da maior parte dos isolados coletados. Este fato pode ser explicado pela estrutura da folha seca de *S. densiflora*, que é mais fina e estreita em relação às duas outras plantas e, por isso, capaz de sofrer mais com as lavagens das chuvas, causando a diminuição da comunidade microbiana. A macrófita *S. densiflora* teve uma contínua diminuição no número de isolados desde o início do experimento, em junho de 2012 e foi a única que não obteve nenhuma colônia na última coleta, época em que a precipitação era intensa.

Tabela 1 – Variações físicas de cada coleta

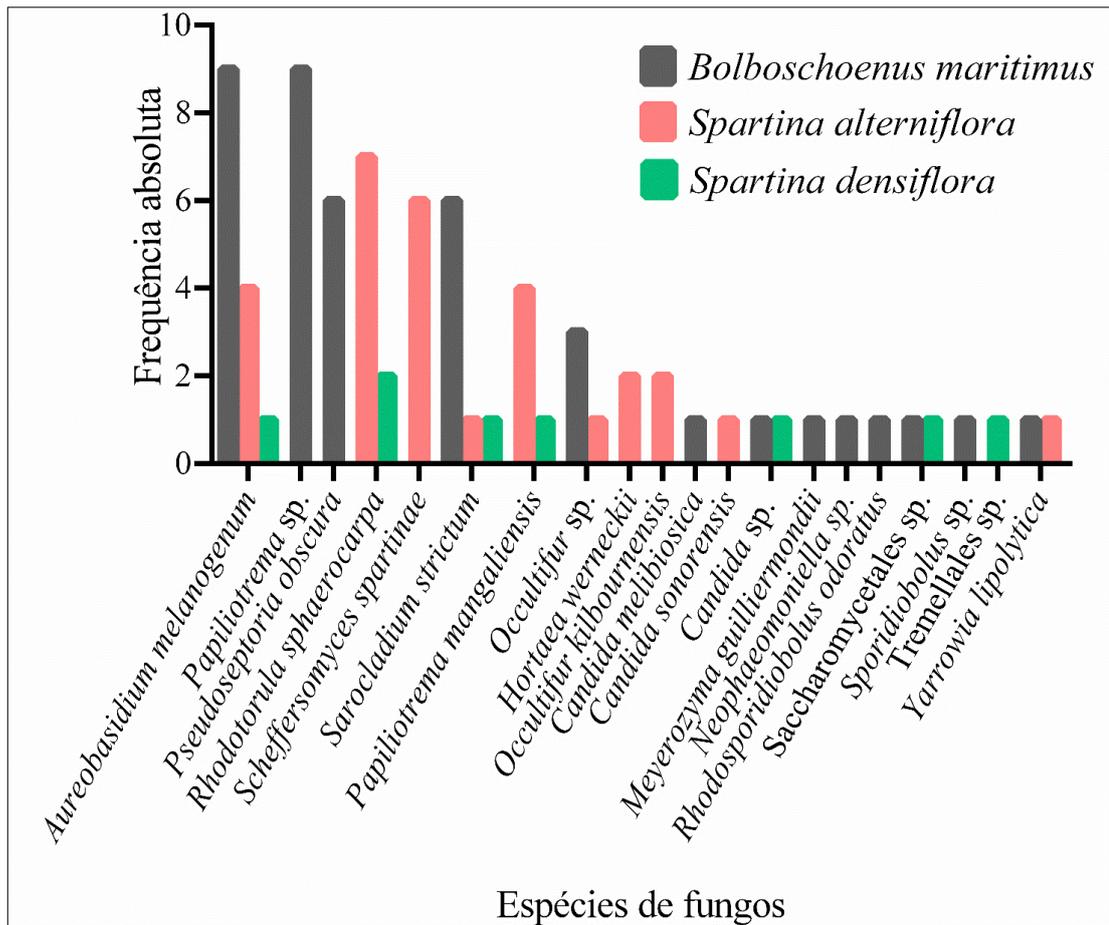
Coletas	25/06/12	02/07/2012	07/08/2012	24/09/2012	21/01/2013
Temperatura do ar (°C)	12	14	15	20	25
Temperatura da água (°C)	14	12	14	16	25
Salinidade (%)	28	23	16	6	14
Precipitação (mm)	37	74	104,8	137,8	136,4

Fonte: Souza (2014)

A Figura 7 mostra a relação das plantas com a frequência absoluta das espécies de fungos. *Aureobasidium melanogenum* e *Sarocladium strictum* são as únicas espécies que mesmo com uma grande variação das frequências ocorrem em todas as plantas. *Scheffersomyces spartinae* foi reportada em outros trabalhos unicamente na macrófita *S. alterniflora* (MEYERS *et al.*, 1975). O resultado deste trabalho confirma esse resultado,

sendo isolado da mesma macrófita (n=7). Fora as espécies de leveduras já mencionadas, as que também apresentam um valor mais alto de ocorrência, igual ou maior que seis em relação à frequência absoluta, são *Pseudoseptoria obscura*, *Rhodotorula sphaerocarpa* e uma espécie ainda não descrita do gênero *Papiliotrema sp.*

Figura 7 – Relação das espécies de fungos associadas às macrófitas aquáticas



Fonte: autora (2016).

Outras espécies de levedura isoladas ocorreram em menor frequência ou tiveram isolados únicos. A importância desse resultado se dá em relação à qualidade e não apenas à quantidade, uma vez que se fez comprovado os nomes de muitas espécies de leveduras e fungos leveduriformes que estão associados a estas espécies de macrófitas na região sul do estado.

4.3 AGRUPAMENTO BASEADO NA MORFOLOGIA EM COMPARAÇÃO COM A ANÁLISE MOLECULAR

As técnicas moleculares de identificação de espécies da micobiota são reconhecidamente mais precisas do que as morfológicas (Kurtzman *et al.*, 2015). Isso se faz bastante fundamentado porque as espécies deste reino variam muito ao longo do seu ciclo de vida. Uma espécie de fungo pode apresentar uma morfologia corporal durante a reprodução sexuada (estado teleomorfo), e outra morfologia extremamente distinta quando o seu ciclo de vida no momento é o assexuado (estado anamorfo). Sendo assim, é provável que muito das espécies já descritas possam corresponder ao mesmo tipo de organismo. Por isso a identificação molecular se faz tão importante e indispensável (MAUTONE, 2008). Porém, mesmo que as técnicas de identificação morfológicas sejam complicadas para identificação a nível específico, elas são de grande utilidade para separar isolados em morfotipos, possibilitando assim, uma organização inicial. Souza (2014) separou as amostras discutidas neste trabalho em 19 grupos distintos, e obteve sucesso em grande parte dos seus resultados. Podemos comparar, portanto, a análise morfológica feita por Souza (2014) com as análises moleculares que obtivemos após a análise das sequências.

Na Tabela 2 foram comparados os resultados dos agrupamentos morfológicos com a identificação molecular. Para que se possa entender melhor o cabeçalho da tabela, seguem as instruções: Morfotipos são os grupamentos morfológicos que Souza (2014) determinou. Número de isolados é a quantidade de isolados que aquele grupo reuniu. A coluna “quantidade de espécies diferentes” se refere ao número de espécies diferentes que se comprovou serem dispostas naquele grupo após os testes moleculares. A quarta coluna da tabela se refere à porcentagem de acertos encontrados em cada grupo a partir das comparações. As letras “FP” e “FN” são as análises falso positivo e falso negativo que são discutidas no texto. A sensibilidade, avalia a probabilidade de um teste obter um resultado positivo, comparando os valores positivos com os falsos negativos. E por fim, a probabilidade de resultados positivos, avalia a probabilidade de um teste obter um resultado positivo, comparando os valores positivos com os falsos positivos.

Percebe-se que grande parte do agrupamento de isolados obtiveram um valor máximo de 100% em relação à porcentagem de acertos. Nota-se também que entre quatro grupos (grupo 5, 7, 8 e 10) que possui alta frequência, maior ou igual à dez isolados, obtiveram-se apenas dois resultados julgados como falsos positivos para cada um. Por outro lado, quatro resultados dos agrupamentos não obtiveram grande sucesso (grupo 9, 11, 14 e 15) sendo os

mesmos números que contabilizam a quantidade de isolados, também correspondentes aos números de espécies diferentes, e ainda igual em relação à quantidade de falsos positivos. Ou seja, tomando como exemplo o grupo “9” que tem três isolados, que resultaram em três espécies distintas, nos mostra que há neste caso um resultado de falso positivo igual a três.

Tabela 2 – Análise morfológica *versus* análise molecular

Morfo- tipos	Isolados	Resultados positivos	Quantidade de espécies diferentes	% acertos	FP	FN	Sensb.	Probabilidade de resultados positivos
1	8	8	1	100%	0	0	1	100%
2	4	4	1	100%	0	0	1	100%
3	2	2	1	100%	0	0	1	100%
4	1	-	-	0%	-	-	-	-
5	11	9	3	82%	2	0	1	81,81%
6	2	2	1	100%	0	0	1	100%
7	12	9	3	75%	2	0	1	75%
8	10	8	3	80%	2	0	1	80%
9	3	0	3	0%	3	0	0	0%
10	7	5	3	72%	2	0	1	71,42%
11	3	0	3	0%	3	0	0	0%
12	2	2	1	100%	0	0	0	100%
13	2	2	1	100%	0	0	1	100%
14	2	0	2	0%	2	0	0	0%
15	4	0	4	0%	4	0	0	0%
16	1	1	1	100%	0	1	0,5	100%
17	1	1	1	100%	0	1	0,5	100%
18	1	-	-	0%	-	-	-	-
19	2	2	1	100%	0	0	1	100%

Fonte: autora (2016).

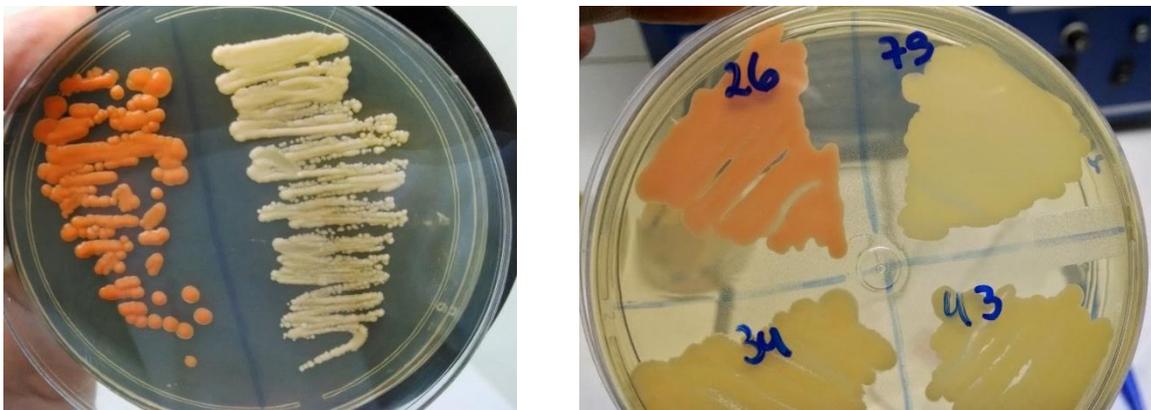
Os grupos 16 e 17 possuem apenas um isolado cada um. Mesmo que a estatística nos demonstre que eles apresentam valor total na porcentagem de acertos, detectamos neste caso, a presença de falsos negativos. Isto acontece porque estas leveduras poderiam estar presentes em algum outro grupo, compartilhando características que foram julgadas como negativas em relação à outras amostras, mas que na verdade eram positivas.

Estes dois últimos grupos mencionados apresentaram um grau de sensibilidade 0,5, ou seja, a metade do seu valor total, devido à presença dos falsos positivos. O mesmo não se aplica aos grupos que apresentaram 100% dos acertos. Estes têm o seu grau de sensibilidade máximo, uma vez que dentre todos os isolados encontraram um número máximo de resultados positivos, sem a presença de nenhum falso negativo quando comparado a análise morfológica com a molecular.

Estes dados resultam em uma porcentagem de acertos igual a 0%. No resultado final dos agrupamentos, dois grupos ficaram de fora da análise comparativa entre morfologia e biologia molecular. São os grupos 4 e 18, isto ocorreu porque alguns procedimentos de extração e amplificação de DNA não obtiveram bons resultados. Pode-se observar ao final desta monografia, no Apêndice A, uma tabela que mostra os resultados comparando a divisão dos grupos feita a partir da morfologia com as espécies encontradas a partir dos testes moleculares.

A espécie *Sarocladium strictum* somente ocorreu no grupo 1. Fatos assim podem ocorrer uma vez que alguma espécie seja facilmente distinguível morfologicamente das outras. Em contrapartida, *Aureobasidium melanogenum* se encontra distribuída em diversos grupos, sendo difícil a distinção dela com outras leveduras. O gênero *Aureobasidium* é caracterizado por micro-organismos que apresentam colônias de diversas colorações e que se tornam completamente pretas ao longo do período de conservação em laboratório (SOUZA; 2014). Na figura 8 pode-se analisar comparações entre espécies sendo que podemos observar que ora elas se assemelham muito e ora elas se diferem bastante.

Figura 8 – Morfologia externa dos isolados de leveduras e fungos leveduriformes extraídos de macrófitas aquáticas da Ilha da Pólvora, Rio Grande – RS



Fonte: autora (2016).

4.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Conseguiu-se chegar a nível específico na maior parte das amostras analisadas. Somente dois isolados não nos mostraram resultados suficientes após os seus sequenciamentos, BEL 47 e BEL 75. Estas apresentaram identidade menor que 85% quando comparados com a base de dados GenBank. Esses isolados, portanto, foram classificados até nível taxonômico de ordem.

Muitos dos isolados BEL se agruparam e não se assemelharam a nenhuma espécie já descrita, porém obtivemos um valor de 99% de certeza na identificação destas espécies quanto aos seus gêneros. Os apêndices (B, C e D) contendo algumas das árvores filogenéticas que foram construídas a partir da interpretação dos resultados após análise em software estão dispostas ao final do trabalho. Estas árvores nos mostram o parentesco das nossas espécies novas com as demais já conhecidas.

5 CONCLUSÃO

Das 76 amostras sequenciadas, 19 espécies distintas dos filos Ascomycota e Basidiomycota foram encontradas, incluindo sete provavelmente ainda não descritas. Esta monografia ainda comparou a classificação morfológica destes fungos com os dados moleculares. Fica claro que a análise morfológica destes organismos é bastante útil para o auxílio na pesquisa, porém esta, sozinha, não é suficiente, podendo induzir a categorizações desconcordantes com a classificação filogenética. A partir dos nossos resultados, podemos afirmar que este trabalho contribui para a ampliação do conhecimento sobre a diversidade de leveduras e fungos leveduriformes associados a macrófitas aquáticas da região de marisma da Lagoa dos Patos. Além disso, tendo em vista que 37% das espécies encontradas provavelmente ainda não foram descritas, nossos dados também corroboram com a estimativa de que ainda há uma plethora de espécies de fungos atualmente desconhecidas.

REFERÊNCIAS

- BIANCHINI JR., I. **Modelos de crescimento e decomposição de macrófitas aquáticas**. In: THOMAZ, S. M.; BINI, L. M. (Eds.) *Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas*. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2003. p. 85-126.
- BOTTINO, F.; CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI Jr, I. Decomposition of Particulate Organic Carbon from Aquatic Macrophytes Under Different Nutrient Conditions. **Aquatic Geochemistry**, v. 22, p. 17-33, jan. 2016.
- DEAK, T. Environmental factors influencing yeast. In: ROSA, C. A.; PETER, G. (Eds.). **Biodiversity and Ecophysiology of Yeast. The Yeast Handbook**. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, 2006, p. 155-174.
- DEEGAN, L. A.; JOHNSON, D. S.; WARREN, R. S.; PETERSON, J. B.; FLEEGER, J. W.; FAGHERAZZI, S.; WOLLHEIM, W. M. Coastal eutrophication as a driver of salt marsh loss. **Nature**, v. 490, p.388–392, 18 out. 2012.
- ELEUTERIUS, L. N.; ELEUTERIUS, C. K. Tide Levels and Salt Marsh Zonation. **Bulletin of Marine Science**, v. 29, n. 3, p. 394-400. Jul. 1979.
- FELL, J.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p.1351-1371, 2000.
- HAGLER, A. N.; AHEARN, D. G. Rapid Diazonium Blue B Test to Detect Basidiomycetous Yeasts. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 31, n. 2, p. 204-208, Abr. 1981.
- KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, 78-82, 2001.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeast: a taxonomic study**. 5. ed., London: Elsevier, 2011.
- KURTZMAN, C. P.; MATEO, R. Q.; KOLECKA, A.; THEELEN, B.; ROBERT, V.; BOEKHOUT, T.; Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways. **FEMS, Yeast Research**, v. 15, n 0, May. 2015.
- LANDELL, M. F. **Caracterização genética e avaliação da diversidade de leveduras associadas a bromélias no Parque de Itapuã-Viamão/RS**. 187 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, UFRGS, Porto Alegre, 2009.
- LEITE, B. R. **Avaliação da comunidade de leveduras associada à decomposição de macrófitas aquáticas em uma marisma da lagoa dos Patos (RS)**. 159 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014.

MADIGAN, M. T. et al. Capítulo 18: Biologia Celular Eucariótica e Microrganismos Eucarióticos. In: __. **Microbiologia de Brock**. Tradução Andrea Queiroz Maranhão e colaboradores. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAUTONE, J. N. **Identificação e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras associadas a figueira do Parque de Itapuã, RS, Brasil**. 124 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 2008.

MEYERS, S.P.; AHEARN, D.G.; ALEXANDER, S.K.; COOK, W.L. *Pichia spartinae*, a Dominant Yeast of the *Spartina* salt marsh. **Dev. In Indust. Microbiol.**, 6: 261-267, 1975.

MOORE, J. C.; BERLOW, E. L.; COLEMAN, D. C. Detritus, trophic dynamics and biodiversity. **Ecology Letters**, v. 7, p. 584-600, 2004.

NOGUEIRA, R. X. S. & COSTA, C. S. B. Mapeamento das marismas do estuário da Lagoa dos Patos (RS) utilizando fotografias aéreas digitais 35 mm no modo infravermelho. In: Congresso da Associação Brasileira de Estudos do Quaternário, 9, Recife. **Resumos...** Recife: UFPE, 2003.

NUNES M.F., CUNHA-SANTINO M.B., BIANCHINI Jr, I. Xylanase and cellulase activities during anaerobic decomposition of three aquatic macrophytes. **Braz J Microbiol**, v. 42, p. 75–83, 2011

PRATES, A.P.; GONÇALVES, M. A.; ROSA, M. R. **Panorama da conservação dos ecossistemas costeiros e marinhos no Brasil**. 2. ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2012. 152 p.

RICH, J. O.; LEATHERS T. D.; ANDERSON, A. M.; BISCHOFF, K. M.; MANITCHOTPISIT, P. Laccases from *Aureobasidium pullulans*. **Enzyme Microb Technol**, v. 53, n. 1, p. 33-37, 2013.

SCHADT, C. W.; MARTIN, A. P.; LIPSON, D. A.; SCHMIDT, S. K. Seasonal dynamics of previously unknown fungal lineages in tundra soils. **Science**, v. 301, p. 1359-1361, 2003.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A.; CHEN, W.; Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 109(16), p. 6241-6246, Apr. 2012.

SCIESSERE, L. **Demanda de oxigênio da mineralização de detritos refratários de macrófitas aquáticas**. 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2007.

SEENA, S.; WYNBERG, N.; BÄRLOCHER, F. Fungal diversity during leaf decomposition in a stream assessed through clone libraries. **Fungal Diversity**, v. 30, p.1-14, 2008.

SOUZA, A. F. **Potencial biotecnológico de leveduras associadas à macrófitas**. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

TAYLOR, D. L.; HOLLINGSWORTH, T. N.; MCFARLAND, J.; LENNON, N. J.; NUSBAUM, C.; RUESS, R. W. A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. *Ecology*, 2013. DOI:10.1890/12-1693.1

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

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

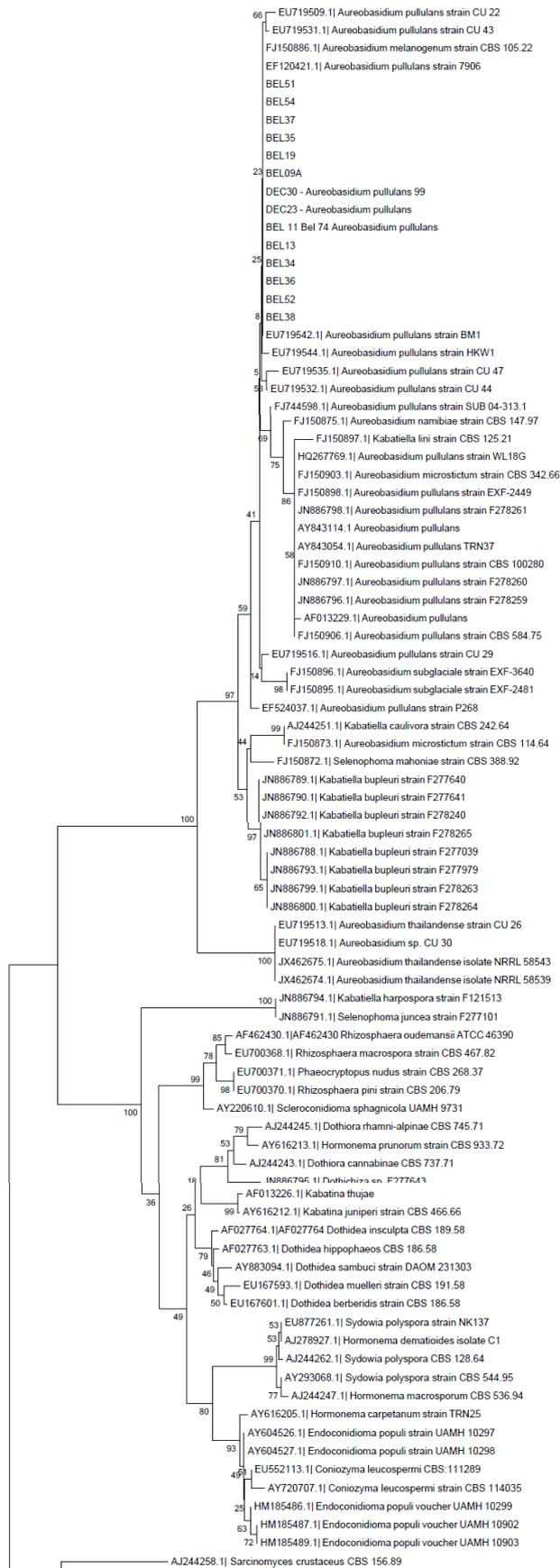
APÊNDICE A – Relação entre as macrófitas aquáticas, isolados e morfotipos

Espécies de plantas	Amostras	Espécies de fungos	Grupos	Código GenBank
Bolboschoenus maritimus	BEL 01	<i>Sarocladium strictum</i>	1	
Spartina alterniflora	BEL 12	<i>Sarocladium strictum</i>	1	
Spartina densiflora	BEL 32	<i>Sarocladium strictum</i>	1	
Bolboschoenus maritimus	BEL 53	<i>Sarocladium strictum</i>	1	
Bolboschoenus maritimus	BEL 56	<i>Sarocladium strictum</i>	1	
Bolboschoenus maritimus	BEL 81	<i>Sarocladium strictum</i>	1	
Bolboschoenus maritimus	BEL 85	<i>Sarocladium strictum</i>	1	
Bolboschoenus maritimus	BEL 104	<i>Sarocladium strictum</i>	1	
Bolboschoenus maritimus	BEL 06	<i>Pseudoseptoria obscura</i>	2	
Bolboschoenus maritimus	BEL 86	<i>Pseudoseptoria obscura</i>	2	
Bolboschoenus maritimus	BEL 101	<i>Pseudoseptoria obscura</i>	2	
Bolboschoenus maritimus	BEL 105	<i>Pseudoseptoria obscura</i>	2	
Spartina alterniflora	BEL 109	<i>Hortaea werneckii</i>	3	KR261084
Spartina alterniflora	BEL 110	<i>Hortaea werneckii</i>	3	KR261085
Bolboschoenus maritimus	BEL 03	<i>Pseudoseptoria obscura</i>	5	
Bolboschoenus maritimus	BEL 09 A	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	5	KX353817
Spartina alterniflora	BEL 11	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	5	
Spartina alterniflora	BEL 13	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	5	KX353818
Spartina alterniflora	BEL 16	<i>Occultifur kilbournensis</i>	5	
Spartina alterniflora	BEL 19	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	5	KX353819
Bolboschoenus maritimus	BEL 34	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	5	KX353820
Bolboschoenus maritimus	BEL 35	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	5	KX353821
Bolboschoenus maritimus	BEL 36	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	5	KX353822
Bolboschoenus maritimus	BEL 37	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	5	KX353823
Bolboschoenus maritimus	BEL 102	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	5	
Bolboschoenus maritimus	BEL 52	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	6	KX353824
Spartina densiflora	BEL 74	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	6	
Bolboschoenus maritimus	BEL 43	<i>Papiliotrema sp.</i>	7	
Bolboschoenus maritimus	BEL 45	<i>Papiliotrema sp.</i>	7	
Bolboschoenus maritimus	BEL 46	<i>Papiliotrema sp.</i>	7	KT724212
Bolboschoenus maritimus	BEL 63	<i>Pseudoseptoria obscura</i>	7	
Bolboschoenus maritimus	BEL 80	<i>Papiliotrema sp.</i>	7	
Bolboschoenus maritimus	BEL 84	<i>Papiliotrema sp.</i>	7	

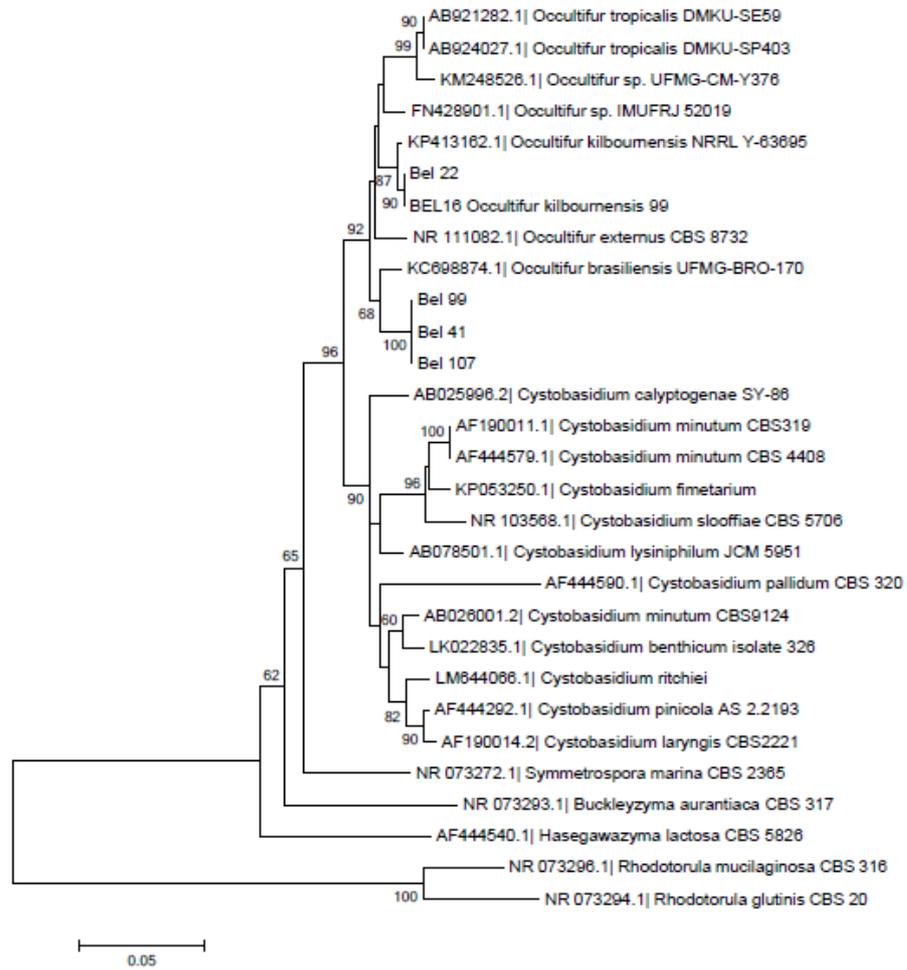
Bolboschoenus maritimus	BEL 87	<i>Papiliotrema sp.</i>	7	
Bolboschoenus maritimus	BEL 89	<i>Papiliotrema sp.</i>	7	
Bolboschoenus maritimus	BEL 90	<i>Papiliotrema sp.</i>	7	KT724213
Spartina alterniflora	BEL 91	<i>Papiliotrema mangaliensis</i>	7	
Spartina densiflora	BEL 95	<i>Papiliotrema mangaliensis</i>	7	
Bolboschoenus maritimus	BEL 108	<i>Papiliotrema sp.</i>	7	
Spartina alterniflora	BEL 14	<i>Rhodotorula sphaerocarpa</i>	8	
Spartina alterniflora	BEL 20	<i>Rhodotorula sphaerocarpa</i>	8	
Spartina alterniflora	BEL 23	<i>Rhodotorula sphaerocarpa</i>	8	
Spartina densiflora	BEL 26	<i>Rhodotorula sphaerocarpa</i>	8	
Bolboschoenus maritimus	BEL 55	<i>Rhodospiridiobolus odoratus</i>	8	
Spartina alterniflora	BEL 58	<i>Rhodotorula sphaerocarpa</i>	8	
Spartina alterniflora	BEL 67	<i>Rhodotorula sphaerocarpa</i>	8	
Bolboschoenus maritimus	BEL 82	<i>Sporidiobolus sp.</i>	8	KX371578
Spartina alterniflora	BEL 92	<i>Rhodotorula sphaerocarpa</i>	8	
Spartina alterniflora	BEL 111	<i>Rhodotorula sphaerocarpa</i>	8	
Spartina alterniflora	BEL 22	<i>Occultifur kilbournensis</i>	9	KX356666
Spartina densiflora	BEL 25	<i>Rhodotorula sphaerocarpa</i>	9	
Bolboschoenus maritimus	BEL 41	<i>Occultifur sp.</i>	9	KX356665
Spartina alterniflora	BEL 10	<i>Scheffersomyces spartinae</i>	10	
Spartina alterniflora	BEL 17	<i>Scheffersomyces spartinae</i>	10	
Spartina alterniflora	BEL 18	<i>Scheffersomyces spartinae</i>	10	
Spartina alterniflora	BEL 24	<i>Scheffersomyces spartinae</i>	10	
Bolboschoenus maritimus	BEL 40	<i>Candida sp.</i>	10	KX371579
Bolboschoenus maritimus	BEL 44	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	10	
Spartina alterniflora	BEL 48	<i>Scheffersomyces spartinae</i>	10	
Spartina densiflora	BEL 28	<i>Candida sp.</i>	11	KX371580
Bolboschoenus maritimus	BEL 62	<i>Saccharomycetales sp.</i>	11	
Spartina alterniflora	BEL 69	<i>Papiliotrema mangaliensis</i>	11	
Bolboschoenus maritimus	BEL 99	<i>Occultifur sp.</i>	12	KX356664
Bolboschoenus maritimus	BEL 107	<i>Occultifur sp.</i>	12	KU854927
Spartina alterniflora	BEL 93	<i>Papiliotrema mangaliensis</i>	13	
Spartina alterniflora	BEL 94	<i>Papiliotrema mangaliensis</i>	13	
Spartina alterniflora	BEL 71	<i>Yarrowia lipolytica</i>	14	
Spartina densiflora	BEL 75	<i>Saccharomycetales sp.</i>	14	

Bolboschoenus maritimus	BEL 54	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	15	KX353825
Spartina alterniflora	BEL 59	<i>Scheffersomyces spartinae</i>	15	
Bolboschoenus maritimus	BEL 66	<i>Yarrowia lipolytica</i>	15	
Bolboschoenus maritimus	BEL 103	<i>Candida melibiosica</i>	15	
Spartina densiflora	BEL 47	Tremellales sp.	16	
Bolboschoenus maritimus	BEL 106	<i>Neophaeomoniella sp.</i>	17	KU854926
Spartina alterniflora	BEL 38	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	19	KX353826
Bolboschoenus maritimus	BEL 51	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	19	KX353827

APÊNDICE B – Árvore filogenética das amostras BEL em relação a *Aureobasidium*



APÊNDICE C – Árvore filogenética das amostras BEL em relação a *Occultifur*



APÊNDICE D – Árvore filogenética das amostras BEL em relação a *Candida*

