



Universidade de Brasília – UnB  
Instituto de Ciências Biológicas – IB  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

# **DIVERSIDADE E ECOLOGIA DE LEVEDURAS EM SOLOS BRASILEIROS**

GEISIANNY AUGUSTA MONTEIRO MOREIRA

Junho/ 2019



Universidade de Brasília – UnB  
Instituto de Ciências Biológicas – IB  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

## **DIVERSIDADE E ECOLOGIA DE LEVEDURAS EM SOLOS BRASILEIROS**

GEISIANNY AUGUSTA MONTEIRO MOREIRA

ORIENTADOR: HELSON MARIO MARTINS DO VALE

Tese de doutorado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação de Biologia Microbiana  
do Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade de Brasília – UnB.

**Brasília - DF**  
**Junho de 2019**



## **Diversidade e ecologia de leveduras em solos brasileiros**

Geisianny Augusta Monteiro Moreira

**Tese aprovada em 28/06/2019 pela banca examinadora:**

Prof. Dr. Helson Mario Martins do Vale – PPG Biologia Microbiana – UnB  
(Presidente da banca e orientador)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Eliane Ferreira Noronha – PPG Biologia Microbiana – UnB  
(Membro titular interno do PPG – Biologia Microbiana)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristine Chaves Barreto – Universidade Católica de Brasília – UCB  
(Membro titular externo ao PPG – Biologia Microbiana)

Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG  
(Membro titular externo ao PPG – Biologia Microbiana)

Dr<sup>a</sup>. Betania Ferraz Quirino – Embrapa Agroenergia  
(Membro suplente)

“I am the product of all the ancestors getting together and deciding these stories need to be told.” *Rupi Kaur*

“O que negas te subordina. O que aceitas te transforma.”

*Carl Gustav Jung*

“Em qualquer lugar que estejam os vestígios do Mestre, os ouvidos daquele que estiver preparado para receber o seu ensinamento se abrirão completamente.” *O Caibalion*

“Everything is everywhere, [but] the environment selects.”

*Wit & Bouvier 2006*

“Silenciosamente, sob as incansáveis mandíbulas químicas dos fungos, os resíduos caídos no solo das florestas rapidamente desaparecem...”

*Forsyth & Miyata, Tropical Nature*

## **Agradecimentos**

Agradeço à toda egrégora espiritual que me sustenta, protege e guia. Honro e agradeço a toda a minha ancestralidade, cujas vidas e histórias me fizeram chegar até aqui.

Se cheguei até esse nível acadêmico foi graças aos professores que tive durante toda a minha vida acadêmica, em especial a minha linhagem de tias educadoras, que com amor e dedicação me alfabetizaram. Aqui deixo minha eterna admiração e gratidão à professora Cynthia Kyaw, que mesmo sem saber, foi a responsável por despertar a minha paixão pelo encantador mundo dos seres invisíveis a olho nu, e que agora é o meu campo de atuação, a Microbiologia. Dentro desse fantástico mundo, agradeço ao professor Helson Mario, por me apresentar as Leveduras, que em tão pouco tempo se tornaram minha grande paixão. Ademais, agradeço ao Helson pela orientação, apoio, suporte e amizade, desde a graduação.

Agradeço aos meus pais Geraldo e Fátima, irmãs Milena, Marília e Eloá, e irmãos George e Geovany. Avós paternos Maria e Chico, e avós maternos Amélia e Cosmo, tias e tios, primas e primos da família Monteiro e família Moreira, pelo apoio essencial e incentivo, encontros familiares, risadas, choros, orações e palavras de motivação, vocês são TUDO para mim. A minha maior conquista desse doutorado é mostrar que sim! Podemos chegar em lugares que foram negados a muito de vocês. Ver que a minha conquista, no fundo é a conquista de vocês, me inspira. Ver a próxima geração querendo seguir os meus passos, me inspira e me mostra que valeu a pena.

Agradeço as amigadas que a pós-graduação me deu, e que levarei para a vida. Cathe e Lucas, sou eternamente grata por todo o apoio, principalmente emocional, que vocês me dão. Samuel, agradeço por toda ajuda nas análises dos meus dados e por me fazer refletir sobre as minhas hipóteses. Lu, agradeço por toda ajuda operacional com matrícula, recursos e etc, e mais ainda por ter se tornado uma grande amiga durante esses seis anos de pós-graduação. Mari, você é o maior presente que um congresso já me deu, agradeço por ter sido minha companheira e apoio em Lima.

Fora do mundo científico, sou grata aos amigos que suavizaram meus dias durante o doutorado. Marcos, é tanta gratidão a tudo que você representa para mim que nem cabe em palavras. Ana, agradeço por ser essa amiga forte que sempre sabe o que me dizer e me trazer de volta. Lucas, que bom que nos (re) encontramos nessa caminhada. Cida, agradeço por todas as vezes que me tirou da caverna. Marília, minha irmã dessa e de outras vidas, toda essa caminhada fica mais leve ao teu lado, obrigada por ser meu forte ponto de apoio.

Agradeço ao meu clã dançante Luana, Vaner, Gabi, Rê, Bruna, Marta, Gi e Tamy. Vocês e a dança me transformaram de tantas formas, e foram meu refúgio e força em momentos tenebrosos.

O doutorado me abriu portas inimagináveis. Me proporcionou experiências profissionais e pessoais incríveis. Fiz viagens internas e externas. Conheci países, pessoas, culturas e diferentes formas de fazer ciência. Vi a ciência de outra perspectiva. Me vi de outra perspectiva. Por isso agradeço à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, que me possibilitou principalmente as viagens internas durante esse processo. Agradeço à FAP/DF que financiou as minhas aventuras dentro e fora do país.

Agradeço todos os outros colaboradores da minha pesquisa científica. Ao grande grupo liderado pela professora Fátima Moreira da Universidade Federal de Lavras (UFLA), do qual gerou o capítulo 3 dessa tese. Agradeço à Nívea Moreira Vieira e ao professor Wendel Batista da Silveira da Universidade Federal de Viçosa (UFV), que possibilitaram o nascimento do capítulo 2, e a todos os co-autores do manuscrito gerado, principalmente à Érica Mangaravite. Agradeço ao Dr. Fábio Bueno da Embrapa Cerrados, e todos os membros do seu laboratório, que me acolheram e me auxiliaram no estabelecimento dos protocolos que geraram o capítulo 4. Agradeço à professora Cristine Chaves Barreto da Universidade Católica de Brasília, a qual possibilitou o nascimento do capítulo 5, e agradeço imensamente a Elisa Catão, a qual facilitou, ensinou e auxiliou as análises dos dados de Metabarcoding. É impossível fazer pesquisa sozinha, por isso agradeço o olhar e auxílio de todos durante esse processo.

Por fim, agradeço a banca de qualificação e a banca de defesa que auxiliaram no refinamento e conclusão desse trabalho.

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.**

**This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.**

## Resumo geral

Fungos contribuem de forma substancial para a biomassa microbiana do solo, cumprindo funções ecológicas importantes. Uma significativa proporção dessa comunidade é formada por fungos unicelulares, que formam um grupo taxonômico heterogêneo denominado por leveduras. Leveduras tem sido relatada em diferentes tipos e condições de solo. Entretanto, estudos sobre a composição das comunidades de leveduras em solos tropicais e subtropicais ainda são escassos. Assim como o conhecimento sobre os fatores ambientais que moldam essas comunidades e a sua importância ecológica nesses ambientes. Fazendo uso de técnicas baseadas em cultivo, sequenciamento de nova geração e triagem de atividades funcionais, a diversidade e ecologia das comunidades de leveduras em solos de ecossistemas naturais e modificados, nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, foram descritas. Fatores ecológicos como tipo de vegetação, atributos do solo, sazonalidade e gradiente altitudinal foram avaliados. Tanto o método de cultivo como o *metabarcoding* mostraram que as comunidades de leveduras foram dissimilares entre os ecossistemas, mostrando uma correlação entre a vegetação e as comunidades. A nível local, atributos do solo influenciaram na composição da comunidade. O gradiente altitudinal foi o principal determinante da composição e diversidade genética das comunidades do RJ. Um total de 379 isolados de leveduras foram obtidos por cultivo, e 52 isolados apresentam traços funcionais como: produção de fitohormônio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e atividade antagônica contra patógenos do solo. A composição das comunidades também diferiu entre as abordagens utilizadas. O *metabarcoding* revelou que 16% das sequências representam espécies de leveduras. Este estudo destaca o possível papel ecológico das comunidades de leveduras na recuperação da qualidade do solo e no restabelecimento da comunidade de plantas, e as caracteriza como promissoras para uso em práticas agrícolas sustentáveis.

**Palavras chaves:** Leveduras do solo, habitats naturais, mineração, gradiente altitudinal, cultivo, Metabarcode.

## **General abstract**

Fungi contribute substantially to the microbial biomass of the soil, play role in important ecological functions. A significant proportion of this community is formed by unicellular fungi, which form a heterogeneous taxonomic group called yeast. Yeasts have been reported in different types and soil conditions. However, studies on the composition of yeast communities in tropical and subtropical soils are still scarce. As well as knowledge about the environmental factors that shape these communities and their ecological importance in these environments. Using a culture-based method, next-generation sequencing-based (metabarcoding) and screening of functional activities, the diversity and ecology of the yeast communities in soils of natural and modified ecosystems in Minas Gerais and Rio de Janeiro states were described. Ecological factors such as vegetation type, soil attributes, seasonality and altitudinal gradient were evaluated. Both the culture-based method and the metabarcoding showed that the yeast communities were dissimilar among the ecosystems, showing a correlation between vegetation and communities. At the local level, soil attributes influenced the composition of the community. The altitudinal gradient was the main determinant of the composition and genetic diversity of the communities of RJ. A total of 379 yeast isolates were obtained by cultivation, and 52 isolates showed functional traits such as: phytohormone production, phosphate solubilization, siderophores production and antagonistic activity against soil phytopathogens. The communities' composition also differed between the approaches used. Metabarcoding revealed that 16% of the sequences represent yeast species. This study highlights the possible ecological role of yeast communities in the recovery of soil quality and in the reestablishment of the plant community, and characterizes them as promising for use in sustainable agricultural practices.

**Keywords:** Soil yeast, natural habitats, mining, altitudinal gradient, cultivation, Metabarcoding.

## Sumário

Legendas de Figuras e Tabelas .....	vii
Motivação .....	xi
Objetivos e hipóteses .....	xii
Organização dos capítulos .....	xiii
Introdução Geral .....	1

CAPÍTULO 1 – Revisão de literatura: Leveduras do solo e suas aplicações no biocontrole e na promoção do crescimento vegetal.....	5
INTRODUÇÃO .....	5
LEVEDURAS DO SOLO .....	7
Taxonomia.....	7
Fatores ecológicos que influenciam a distribuição de leveduras .....	9
Comunidades de leveduras em solos cultivados e florestais .....	18
Comunidade de leveduras em solos de ambientes extremos .....	27
Comunidade de leveduras em solos tropicais .....	30
MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE.....	32
Isolamento e cultivo .....	32
Abordagens independentes de cultivo.....	41
LEVEDURAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE .....	44
LEVEDURAS COMO AGENTES DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL.....	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	60
LITERATURA CITADA .....	62

CAPÍTULO 2 – Yeast communities differing along an altitudinal gradient in the Brazilian Atlantic Forest.....	75
Abstract.....	76
Introduction.....	77
Materials and methods .....	78
Sampling strategy .....	78
Soil characterization.....	79
Yeast isolation and identification.....	80
Multivariate and haplotype network analyses .....	81
Results.....	82
Yeast inventory and community analysis .....	82
Gene genealogy.....	88
Discussion .....	89
References.....	93

CAPÍTULO 3 – Soil yeast community in revegetated iron-mining site is more diverse than in adjacent native areas .....	97
Abstract.....	98
Introduction.....	99
Material and Methods .....	101
Study area.....	101

Sampling design .....	102
Soil chemical analyses .....	102
Yeast isolation and identification .....	103
Community and multivariate analysis .....	104
Results .....	104
Soil characterization .....	104
Yeast diversity .....	106
Multivariate approach .....	110
Discussion .....	111
Conclusions .....	115
References .....	116
CAPÍTULO 4 – Plant growth-promoting traits of yeasts from bulk soil in a revegetated iron-mining site and natural ecosystems .....	121
Abstract .....	122
Introduction .....	123
Materials and Methods .....	125
Yeasts strains .....	125
IAA production .....	125
Detection of siderophore production .....	125
Phosphate solubilization .....	126
Antagonism in solid medium .....	126
Results and Discussion .....	126
References .....	137
CAPÍTULO 5 – Estrutura e composição das comunidades de leveduras em solos brasileiros: uma análise por <i>Metabarcoding</i> .....	141
Resumo .....	141
Introdução .....	142
Metodologia .....	144
Área de estudo e amostragem .....	144
Extração de DNA e sequenciamento de amplicons .....	147
Processamento dos dados de sequenciamento .....	148
Análises das comunidades .....	149
Resultados e Discussão .....	149
Processamento dos dados de sequenciamento .....	149
Estrutura das comunidades fúngicas .....	151
Composição das comunidades de leveduras .....	155
Alpha Diversidade .....	158
Conclusões .....	162
Perspectivas futuras .....	162
Referências .....	163
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	167
ANEXOS .....	174

# Legendas de Figuras e Tabelas

## Legenda de Figuras

- Figura 1.** Sucessão de espécies nas comunidades do filoplano até os horizontes inferiores do solo, enfatizando a diminuição da densidade populacional, a riqueza e a abundância de espécies com a profundidade do solo. Fonte: elaborada com base em Maksimova e Chernov (2004), Glushakova et al. (2017) e Golubtsova et al. (2007). ..... 17
- Figura 2.** Dinâmica da comunidade fúngica no solo e na rizosfera durante o desenvolvimento de plantas de milho. Em destaque, as ordens e as espécies de leveduras basidiomicéticas detectadas (Gomes et al., 2003). ..... 21
- Figura 3.** Proposta de via metabólica da degradação do pesticida lindano nas espécies *Candida* sp. e *Rhodotorula* sp. O composto final (Maleyl acetate), obtido por meio da ação de enzimas secretadas pelas leveduras, é assimilado e utilizado no ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) para geração de energia na célula (Salam e Das 2014; Salam et al. 2013). ..... 23
- Figura 4.** Etapas da caracterização de leveduras isoladas do solo. A) Coleta dos 20 cm iniciais do solo; B) Diluição seriada das amostras e isolamento por cultivo; C) Caracterização morfológica (macro e microscópica) e testes bioquímicos e fisiológicos; D) Caracterização molecular utilizando sequenciamento de genes marcadores. .... 34
- Figura 5.** Diferentes morfotipos de colônias puras de leveduras isoladas de amostras de solo. .... 38
- Figura 6.** Esquematização da estrutura e da organização dos genes e dos espaços internos e intergênicos do RNA ribossomal de leveduras. .... 40
- Figura 7.** Fluxograma de trabalho para a caracterização das comunidades de leveduras, utilizado no Laboratório de Micologia da Universidade de Brasília. .... 44
- Figura 8.** Inibição *in vitro* do crescimento do patógeno do solo *Fusarium oxysporum*, causador de doenças em raízes de plantas, por meio do uso de estirpes de leveduras em placas com meio BDA crescidas durante sete dias. A) *Candida glabrata*; B) e C) *Rhodotorula mucilaginosa*; D) *Wickerhamomyces anomalus*; E) *Papiliotrema laurentii*; F) Controle. .... 46
- Figura 9.** Representações de metodologias utilizadas para verificação de características de PGP em leveduras. A) Produção de AIA utilizando reagente de Salkowski; B) Detecção de sideróforos utilizando Chrome Azurol S; C) Solubilização de fosfato de cálcio utilizando Chrome Azurol S; C) Solubilização de fosfato de cálcio utilizando meio Pikovskaya ágar. .... 59
- Figura 10.** Geographical location of the PARNASO in the Rio de Janeiro State, Brazil; and the four collected points in altitudes ranging from 404 to 2,124 m. .... 79

<b>Figura 11. Relative abundance and taxonomic composition of soil yeast communities at four altitudes (404; 1,016; 1,658; and 2,124 m) of the PARNASO.....</b>	<b>84</b>
<b>Figura 12. A Venn diagram showing yeast species distributions from PARNASO soils sampled at 404; 1,016; 1,658; and 2,124 m. The number of shared species in those altitudes are represented. The different circles represent each sampled altitude and the intersections between them highlight the yeast species that coexisted in the aforementioned altitudes. ....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 13. Principal component analysis using data for physicochemical soil characteristics in four different altitudes of the PARNASO.....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 14. Median-joining network of the four haplotypes of <i>Saitozyma podzolica</i>. A) The four haplotypes (H1, H2, H3 and H4) belong to two genealogical lineages, one depicted in blue and another one depicted in purple. The circle sizes are proportional to the relative frequencies, major circle (n=24), medium circle (n=19) and small circles (n=1). The number of mutation steps are indicated with small bars when more than one step occurs. B) The distribution of the haplotypes along the altitudinal gradient (altitudes 1, 2, 3, and 4). ....</b>	<b>89</b>
<b>Figura 15. Geographical location of studied areas, sampling points and ecosystems. ....</b>	<b>102</b>
<b>Figura 16. Soil yeast species accumulation curves for soil samples.....</b>	<b>108</b>
<b>Figura 17. Venn diagrams of yeast species in soil from different ecosystems, showing the number of shared species in those site sampled. The different circles represent different site with ecosystem sampled, and the intersections of the circles showed the coexisted yeast species in those sites. Total shared diversity in both seasons (a); Diversity shared only dry season (b); Diversity shared only rainy season (c); and diversity shared between seasons (d). NS – Neotropical savanna, IO – Iron outcrops, AF – Atlantic forest, and RA – Revegetated area. ....</b>	<b>109</b>
<b>Figura 18. Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) plot tracking community similarity by ecosystems and season. The species names were abbreviated for easy viewing: the first three letters of the genus in upper case and the first three letters of the species in lower case (CANmal = <i>Candida maltosa</i>). NS – Neotropical savanna, IO – Iron outcrops, AF – Atlantic forest, and RA – Revegetated area.....</b>	<b>110</b>
<b>Figura 19. Halos produced by yeasts on Pikovskaya’s agar by spot inoculation and incubation at 28 °C for 5 d. Phosphate- solubilizing medium separately by using (A and C) tricalcium-phosphates, (B and D) aluminum-phosphates as source of insoluble inorganic phosphate. Strains of <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (A-B) and <i>Wickerhamomyces anomalus</i> (C-D).....</b>	<b>132</b>
<b>Figura 20. <i>In vitro</i> evaluation of antagonism in a solid medium by yeasts against the phytopathogenic fungus <i>Fusarium oxysporum</i>. A: <i>Candida glabrata</i>, B and D: <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>, C: <i>C. maltosa</i>, E: <i>Wickerhamomyces anomalus</i>, F: <i>F. oxysporum</i> alone as the control group. ....</b>	<b>135</b>

<b>Figura 21. Evaluation of in vitro antagonism in a solid medium by yeasts against the phytopathogenic fungus <i>Macrophomina phaseolina</i>. A: <i>Candida parapsilosis</i>, B: <i>Wickerhamomyces anomalus</i>, C: <i>M. phaseolina</i> alone as the control group.....</b>	<b>135</b>
<b>Figura 22. Localização geográfica dos ecossistemas analisados nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro.....</b>	<b>145</b>
<b>Figura 23. Ordenação espacial da distribuição das amostras construída utilizando NMDS a partir de uma matriz de similaridade baseada nas sequências variantes detectadas. ...</b>	<b>152</b>
<b>Figura 24. Ordenação espacial da distribuição das amostras construída utilizando NMDS, para o conjunto de dados separados por fator ambiental. A) tipo de vegetação; B) sazonalidade; C) gradiente altitudinal. ....</b>	<b>154</b>
<b>Figura 25. Abundância relativa dos gêneros detectados entre as amostras de solo dos estados de Minas Gerais (experimentos 1 e 2) Rio de Janeiro (experimento 3). Em destaque no gráfico os gêneros com maior abundância relativa.....</b>	<b>156</b>
<b>Figura 26. Análises de diversidade das amostras em ecossistemas nativos e revegetados dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. A) Quantidade de sequências por amostra; B) Riqueza de táxons por amostra.....</b>	<b>159</b>
<b>Figura 27. Análises de diversidade das amostras em ecossistemas nativos e revegetados dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. A) Índice de Shannon (H); B) Índice de Simpson (1-D).....</b>	<b>160</b>

## **Legenda de Tabelas**

<b>Tabela 1. Inventory and abundance of yeast taxa isolated at four altitudes of the PARNASO. ....</b>	<b>82</b>
<b>Tabela 2. Mean values of the chemical and physical properties of the soils at 404; 1,016; 1,658; and 2,124 m the of the PARNASO.....</b>	<b>86</b>
<b>Tabela 3. Geographical characteristics of ecosystems sampled in the Iron quadrangle region, Minas Gerais, Brazil.....</b>	<b>101</b>
<b>Tabela 4. Soil chemical characterization of different ecosystems: Neotropical savanna (NS), Ironstone outcrops (IO), Atlantic Forest (AF), and a Revegetated area (RA) in two climate seasons (dry and rainy) in the Iron quadrangle, MG, Brazil.....</b>	<b>105</b>
<b>Tabela 5. Inventory and abundance of yeast taxa isolates at 4 ecosystems (Neotropical savanna, Iron outcrops, Atlantic forest, and Revegetated area), during 2 sampling seasons: dry and rainy. ....</b>	<b>106</b>
<b>Tabela 6. Soil yeasts that presented positive result to at least one plant growth promoter traits, origin and locality from which they were isolated.....</b>	<b>127</b>

<b>Tabela 7. Production of indole-3-acetic acid (IAA) by yeast species in medium with and without tryptophan. ND: not detected.....</b>	<b>129</b>
<b>Tabela 8. Solubilization activity for aluminum- and tricalcium-phosphates by soil yeasts. ND: not detected.....</b>	<b>131</b>
<b>Tabela 9. Siderophore production and activity of antagonism against the soil-borne plant pathogens. ND: not detected.....</b>	<b>133</b>
<b>Tabela 10. Características das áreas de estudos e detalhamento dos 3 experimentos avaliados.....</b>	<b>147</b>

### **Legenda de Quadros**

<b>Quadro 1. Principais fatores ecológicos (bióticos e abióticos) associados a distribuição de espécies e sua influência na estrutura das comunidades de leveduras nos solos. ....</b>	<b>11</b>
<b>Quadro 2. Densidade populacional e espécies de leveduras mais frequentes em solos cultivados e florestais. ....</b>	<b>18</b>
<b>Quadro 3. Principais meios de cultura utilizados no isolamento de leveduras do solo, composição química e espécies frequentemente isoladas.....</b>	<b>36</b>
<b>Quadro 4. Principais espécies de leveduras que apresentam características de promotoras do crescimento vegetal (<i>Plant Growth Promoters</i> - PGP).....</b>	<b>54</b>

## Motivação

O conhecimento sobre a diversidade e distribuição de microrganismos em ambientes naturais é essencial para o entendimento de quais são os grupos dominantes em cada ambiente e prever as principais funções ecológicas que esses microrganismos estão mediando. Leveduras possuem importante papel ecológico no solo, participando, por exemplo, da ciclagem de nutrientes como carbono e nitrogênio. Porém, ainda existem lacunas no que diz respeito a diversidade desse grupo em solos tropicais e subtropicais, no que se refere principalmente a: 1) qual a estrutura taxonômica e comportamental das comunidades de leveduras em solos?; 2) quais espécies de leveduras são tipicamente habitantes dos solos em clima tropical e subtropical?; 3) quais são os fatores ecológicos que estão influenciando a distribuição de leveduras nos solos?; 4) de que forma a modificação antrópica do ambiente influencia a estrutura e composição das comunidades de leveduras? A maior parte da informação que temos até então referente a diversidade e ecologia de leveduras em solo, está relacionada a solos de clima temperado. Regiões com clima tropical e subtropical como a África e América do Sul são pouco amostradas, onde o conhecimento acerca da composição e ecologia de espécies ainda é escasso, e principalmente relacionado a solos cultivados. Essa lacuna de conhecimento existente me motivou a buscar compreender a composição, distribuição, ecologia e dinâmica dessas comunidades frente a alguns fatores ambientais presentes nas áreas objeto de estudo deste trabalho; e tentar entender de que forma esse grupo fascinante de eucariotos unicelulares se comportam em ambientes naturais. Dessa forma, regiões pouco exploradas e que possuem uma composição de diferentes ambientes, desde ambientes nativos à modificados antropicamente, como o Centro de Tecnologia de Ferrosos no Quadrilátero Ferrífero – Minas Gerais, ou que possuem uma variação de altitudes que podem influenciar na composição da comunidade microbiana como o Parque Nacional da Serra dos Órgãos – Rio de Janeiro, tornaram-se excelentes objetos de estudo.

## Objetivos e hipóteses

	Objetivos	Hipóteses
<b>Geral</b>	- Descrever a comunidade de leveduras em solos sob a influência de diferentes tipos de vegetação, sazonalidade e gradiente altitudinal por meio de técnicas de cultivo e sequenciamento de nova geração.	A composição de espécies das comunidades de leveduras nos solos irá diferir como consequência dos fatores ecológicos avaliados e da técnica utilizada para acessar a diversidade.
<b>Específicos</b>	<i>Capítulo 1</i> - Realizar um levantamento teórico do estado da arte sobre a distribuição de leveduras em solos, e seu uso como agentes do biocontrole e promotoras do crescimento vegetal.	
	<i>Capítulo 2</i> - Descrever a comunidade de leveduras em solos de Mata Atlântica sob um grau altitudinal do Parque Nacional da serra dos Órgãos - RJ, por meio de técnicas de cultivo. - Avaliar como a comunidade responde a mudança de altitude e tipo de vegetação.	A composição da comunidade de leveduras deverá diferir entre as diferentes altitudes e condições ambientais impostas com a mudança altitudinal.
	<i>Capítulo 3</i> - Descrever a comunidade de leveduras em solos de áreas nativas (Mata Atlântica, Cerrado e Campo Rupestre) e área modificada (Capim), em dois períodos sazonais, do Centro de Tecnologia de Ferrosos/ Mina Miguelão – VALE S.A - MG, por meio de técnicas de cultivo. - Avaliar como a comunidade responde a sazonalidade, tipo de vegetação e ação antrópica.	A composição da comunidade de leveduras deverá diferir entre os diferentes tipos de vegetação, e entre os dois períodos sazonais. A comunidade de leveduras da área de Capim deverá apresentar uma estrutura diferente das outras por ser uma área com vegetação modificada antropicamente.
	<i>Capítulo 4</i> - Compreender o papel funcional das leveduras nos solos por meio de testes que verificam sua habilidade como agentes do biocontrole e da promoção do crescimento vegetal.	Os isolados de leveduras do solo possuíram ao menos uma das características testadas.
	<i>Capítulo 5</i> - Descrever a comunidade de leveduras em solos do estado de Minas Gerais e Rio de Janeiro por meio de NGS, identificar espécies dominantes e explorar como a composição da comunidade de leveduras modifica de acordo com fatores bióticos e abióticos.	A composição das comunidades de leveduras irá diferir entre os ecossistemas. A composição de espécies será diferente daquela encontrada por cultivo.

## Organização dos capítulos

**CAPÍTULO 1** – Introdução apresentando a **revisão de literatura** sobre o conhecimento acerca da diversidade de leveduras em solos e seu papel ecológico nesse ambiente, principalmente atuando como agentes do biocontrole e da promoção do crescimento vegetal.

**CAPÍTULO 2** – Caracterização da comunidade de leveduras em solos de Mata Atlântica sob um **grau altitudinal**, no estado do Rio de Janeiro, com base em técnicas de cultivo, discutindo a influência das características dos solos e condições ambientais intrínsecas a cada altitude no padrão de distribuição das leveduras. Para as mesmas amostras foi feito o isolamento de leveduras oleaginosas pela Dra. Nívea Moreira Vieira (UFV), com a tese intitulada “Physiological, genomic and metabolic characterization of the oleaginous yeast *Papiliotrema laurentii* UFV-1”.

**CAPÍTULO 3** – Caracterização da comunidade de leveduras em solos de **áreas nativas e áreas modificadas antropicamente**, na região do Quadrilátero Ferrífero, no estado de Minas Gerais, com base em técnicas de cultivo, discutindo a influência das características dos solos, tipo de vegetação e sazonalidade no padrão de distribuição das leveduras. Este capítulo é parte de um projeto maior, coordenado pela Prof. Dra. Fátima Moreira (UFLA), denominado “Diversidade de plantas e organismos do solo com potencial biotecnológico e indicadores de impacto ambiental no estado de Minas Gerais, Brasil” - FAPEMIG (CRA-RDP 136-10), cujo objetivo principal é caracterizar todos os grupos funcionais de organismos do solo presentes nas áreas, bem como a vegetação do local.

**CAPÍTULO 4** – Investiga o **papel funcional** das leveduras obtidas por cultivo por meio de testes relacionados ao seu possível papel ecológico no solo, verificando as seguintes características: produção de Ácido Indol Acético (AIA), produção de sideróforos, solubilização de fosfato de cálcio e alumínio, e antagonismo contra fungos patógenos do solo.

**CAPÍTULO 5** – Análise da diversidade da comunidade de leveduras em solos utilizando a abordagem de **metabarcoding**, discutindo a aplicabilidade dessa abordagem no estudo de ecologia de leveduras em solos.

## Introdução Geral

Ecossistema designa o conjunto formado por todos os fatores bióticos (populações de animais, plantas e micro-organismos) e abióticos (água, luminosidade, fatores químicos e físicos) que atuam simultaneamente em determinada região. Dessa forma, o solo pode ser considerado um ecossistema, onde ocorrem processos biológicos importantes e cruciais para a manutenção da vida no planeta, tais como: decomposição da matéria orgânica, produção de húmus, ciclagem de nutrientes, formação de agregados, produção de metabólitos diversos, bem como a produção de alimentos e produtos oriundos que mantêm a sociedade humana (Moreira *et al.*, 2013).

Os solos são formados pela decomposição de rochas, a qual é influenciada pela ação das mais variadas condições climáticas e atuação diferenciada de organismos vivos, bem como o relevo e tempo, gerando assim diferentes tipos de solos no mundo. A decomposição das rochas leva à formação de pequenas partículas minerais das quais os solos são constituídos, juntamente com as partículas orgânicas provenientes da decomposição da matéria orgânica (Coelho *et al.*, 2013).

Dessa forma, o solo é composto por uma mistura dinâmica de matéria orgânica e partículas minerais de tamanhos variáveis, organismos vivos e restos inanimados, formando três fases: líquida (água com materiais dissolvidos), gasosa (os mesmos gases da atmosfera em diferentes proporções) e sólida (partículas minerais, raízes de plantas, populações de organismos macro e microscópicos, matéria orgânica). A característica estrutural dominante é formada por complexos de argila e matéria orgânica estabilizados em partículas de diferentes tamanhos, formas e arranjos (Metting, 1992; Moreira & Siqueira, 2002).

O solo é provavelmente o mais desafiador de todos os ambientes naturais para os microbiologistas devido ao tamanho e complexidade da comunidade microbiana e a diversidade de espécies ali presente. Os micro-organismos dos solos geralmente se aderem ou adsorvem-se fortemente às partículas do solo, como os grãos de areia ou os complexos de argila e matéria orgânica. O metabolismo e sobrevivência dos micro-organismos no solo são fortemente influenciados pela disponibilidade e acesso de água

e nutrientes aos micros habitats. Como consequência, esse ambiente sofre alterações cíclicas drásticas no teor de água variando da saturação de água à extrema aridez, fazendo com que a composição da comunidade microbiana flutue consideravelmente. Além disso, outros fatores ambientais como pH e disponibilidade de oxigênio podem influenciar na composição de espécies dessa comunidade (Daniel, 2005).

Os micro-organismos merecem destaque uma vez que desempenham atividades cruciais para a sustentabilidade dos ecossistemas e estabelecem interações diversas com os demais seres vivos, sendo fundamentais para a manutenção e sobrevivência das comunidades vegetais e animais (Moreira & Campos, 2013). A comunidade microbiana dos solos, principalmente bactérias e fungos, possuem um papel importante nos ciclos biogeoquímicos, sendo responsáveis pela ciclagem dos compostos orgânicos, além de influenciarem os ecossistemas acima dos solos contribuindo para a nutrição de plantas, fitossanidade, estrutura e fertilidade dos solos (Kirk *et al.*, 2004).

Uma grama de solo pode abrigar até 10 bilhões de micro-organismos de milhares de espécies diferentes, podendo ser encontrados cerca de  $10^{12}$  bactérias,  $10^5$  leveduras, 25 km de hifas fúngicas, com expressiva diversidade genética, funcional e metabólica (Moreira & Campos, 2013). Porém, menos de 1% desses são atualmente cultivados, deixando grande parte desse habitat ainda inexplorado (Torsvik & Øvreås, 2002).

Estima-se que existam 4000 diferentes unidades genômicas bacterianas em 1 g de solo e que cerca de 5000 espécies bacterianas já foram descritas. Já para fungos, estima-se que existem 1.500.000 espécies de fungos no mundo, mas diferentemente das bactérias, muitos fungos ainda não podem ser facilmente cultivados em laboratório, e pouca pesquisa utilizando métodos moleculares tem sido feita para estudar a diversidade de fungos nos solos (Kirk *et al.*, 2004), principalmente quando se refere a uma pequena parcela da comunidade fúngica, os fungos unicelulares ou leveduras.

Leveduras são fungos (Reino Fungi, Domínio Eukarya), inseridos nos Filos Ascomycota e Basidiomycota, cujo crescimento vegetativo se dá predominantemente por brotação ou fissão, e que não formam estados sexuais dentro ou sobre corpos de frutificação (Kurtzman & Fell, 1998). Habitats complexos e ainda pouco explorados,

como os solos, podem abrigar um grande número de espécies ainda não descritas (Yurkov et al., 2012a).

O estudo sobre a ecologia de leveduras se faz importante e base fundamental para entender a diversidade, papel ecológico e evolução de espécies desse grupo. A interação entre as leveduras e seu substrato na natureza pode levar a mudanças evolutivas nas espécies. No solo, a composição de espécies da comunidade de leveduras depende dos nutrientes presentes, e são frequentemente dependentes da ação de outros microrganismos para realizar a quebra de polímeros recalcitrantes, liberando assim formas assimiláveis. Muitas espécies de leveduras são transientes, ou seja, residem temporariamente nos solos, e são provenientes do decaimento de folhas, flores e frutos ou ainda de restos animais. Entretanto, algumas espécies são residentes permanentes nos solos (Spencer & Spencer, 1997; Botha, 2011).

Considerando a heterogeneidade dos solos espera-se que o número e a diversidade de espécies de leveduras sejam distribuídos de forma desigual e mostre variação temporal (Botha, 2006). Leveduras ocorrem em uma ampla faixa de diferentes tipos de solos, desde solos florestais e cultiváveis (Sláviková & Vadkertiová 2000; Sláviková & Vadkertiová 2003a) até solos de ambientes extremos como a Antártica (Connell et al., 2008). Além disso, fatores como temperatura, umidade, composição química e localização geográfica podem influenciar a diversidade de leveduras nesses ambientes (Vishniac, 2006).

Os dados sobre diversidade de espécies de leveduras no solo são provenientes de estudos baseados em técnicas de cultivo. Embora atualmente, usando métodos independentes de cultivo, a composição da comunidade microbiana do solo pode ser inferida a partir da extração, quantificação e identificação de moléculas, principalmente DNA e RNA, que são específicas de certos microrganismos ou grupos microbianos (Hill et al., 2000). Recentemente, Masínová et al. (2017a) publicaram o primeiro trabalho focado apenas nos fatores que determinam a composição da comunidade de leveduras em solos florestais na Europa utilizando sequenciamento de *amplicons* pela plataforma Illumina MiSeq. Demonstrando a aplicabilidade dessas novas tecnologias de sequenciamento no estudo das comunidades de leveduras nos solos.

As leveduras têm beneficiado a humanidade por milênios. Na agricultura, as leveduras apresentam papel importante como agentes de biocontrole, biofertilizante, biorremediação e indicadoras da qualidade ambiental (Johnson & Echavarri-Erasun, 2011). Muitas são as espécies de leveduras empregadas em processos biotecnológicos, e a prospecção de cepas com traços de microrganismos promotores do crescimento vegetal e controle biológico de fungos fitopatogênicos vem ganhando destaque (El-Tarabily & Sivasithamparam 2006).

Assim a prospecção de substâncias bioativas ou atividades por leveduras selvagens pode ser promissora em futuras aplicações industriais, e a associação do conhecimento sobre a diversidade genética desse grupo com a sua diversidade funcional é essencial para o entendimento do papel ecológico em ambientes naturais. Com isso percebe-se a importância de conhecer a diversidade de leveduras nos solos, primeiramente devido a sua importância ecológica nesse ecossistema, principalmente por participar ativamente na ciclagem dos nutrientes no solo; e, por outro lado, temos que as atividades humanas, a gestão da terra e as mudanças climáticas estão causando grande impacto na biologia do solo, o que pode alterar completamente a comunidade microbiana ali presente, e limitar o nosso conhecimento sobre a real diversidade em ambientes naturais.

Dessa forma o principal objetivo desse trabalho foi realizar o inventário de espécies de leveduras em amostras de solos provenientes do Estado de Minas Gerais e do Rio de Janeiro, por meio de abordagens de cultivo e sequenciamento de nova geração (*Metabarcoding*). Com base nessas amostras, nós investigamos de que forma os fatores ecológicos existentes influenciaram a composição e distribuição de espécies. Investigamos também de que forma a técnica utilizada para acessar a diversidade pode modificar o resultado esperado. E, por fim, com base nos isolados recuperados das amostras, nós investigamos características relacionadas ao papel funcional dessas espécies nos solos.

## **CAPÍTULO 1 – Revisão de literatura: Leveduras do solo e suas aplicações no biocontrole e na promoção do crescimento vegetal**

Geisianny Augusta Monteiro Moreira & Helson Mario Martins do Vale

*Publicado na forma de capítulo do livro “Tópicos em Ciência do Solo – Volume X”, pela Sociedade Brasileira de Ciências do Solo. Tópicos Ci. Solo, 10:1-59, 2019.*

### **INTRODUÇÃO**

Leveduras são fungos unicelulares (reino Fungi, domínio Eukarya) que fazem parte dos filos Ascomycota e Basidiomycota, e seu crescimento vegetativo se dá, predominantemente, por brotação ou por fissão, além de não formar estados sexuais dentro de corpos de frutificação ou sobre eles (Kurtzman e Fell, 1998). Estimativas sugerem que a diversidade de fungos varie entre 1,5 e 5,1 milhões de espécies, das quais apenas cerca de 100 mil foram descritas (Blackwell, 2011). Habitats complexos e ainda pouco explorados, como os solos, podem abrigar um grande número de espécies não descritas (Yurkov et al., 2012b). A partir da primeira edição do livro “*The yeasts: a taxonomic study*”, o número de espécies de leveduras descritas cresceu de 164, em 1952, para 349, em 1970, 500, em 1984, e 700, em 1998 (Kurtzman e Fell, 1998). Uma extrapolação desses dados levou a uma predição de mais de mil espécies descritas a partir de 2005 (Lachance, 2006).

O estudo sobre a ecologia de leveduras se faz importante e é base fundamental para entender a diversidade, o papel ecológico e a evolução de espécies desse grupo, uma vez que a interação entre leveduras e seu substrato na natureza pode levar a mudanças evolutivas nas espécies. As leveduras estão amplamente distribuídas no mundo, habitando plantas (raízes, caules, folhas, flores, frutos e exsudados), insetos (drosófilas e abelhas), água e solos (Spencer e Spencer, 1997).

No solo, a composição de espécies da comunidade de leveduras depende dos nutrientes presentes, as quais são frequentemente subordinadas à ação de outros microrganismos para realizar a quebra de polímeros recalcitrantes, liberando, assim, formas assimiláveis. Muitas espécies de leveduras são transientes, ou seja, residem

temporariamente nos solos, e são provenientes do decaimento de folhas, flores, frutos e restos de animais. Entretanto, algumas delas são residentes permanentes nos solos (espécies pedobiontes), incluindo espécies dos gêneros *Lipomyces* e *Cryptococcus* (Spencer e Spencer, 1997; Botha, 2011).

A capacidade de sobrevivência de espécies tipicamente pedobiontes no solo é conferida a algumas características, tais como: ampla capacidade metabólica, produção de esporos resistentes, produção de cápsulas exopoliméricas e produção de substâncias poliméricas extracelulares, facilitando a formação de biofilmes em ambientes oligotróficos (Botha, 2006).

As leveduras do solo são conhecidas por sua capacidade de crescer em condições extremas, por exemplo, solos hipersalinos (Mokhtarnejad et al., 2015), solos desérticos de regiões polares (Connell et al., 2008), habitats ricos em nutrientes, como a rizosfera (Mestre et al., 2011a), e solos de Mata Atlântica (Pimenta et al., 2009). As espécies relatadas são capazes de utilizar um amplo espectro de fontes de carbono, incluindo produtos da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, tais como compostos aromáticos simples, hemicelulose e ácidos orgânicos (Yurkov et al., 2012a).

Considerando a heterogeneidade dos solos, pode-se esperar que o número e a diversidade de espécies sejam distribuídos de forma desigual e mostrem variação temporal (Botha, 2006). Leveduras ocorrem em uma ampla faixa de diferentes tipos de solo, desde florestais e cultiváveis (Sláviková e Vadkertiová, 2000, 2003a) até de ambientes extremos, como a Antártida (Connell et al., 2008). Além disso, fatores, como temperatura, umidade, composição química e localização geográfica, podem influenciar a diversidade de leveduras nesses ambientes (Vishniac, 2006).

Os dados sobre diversidade de espécies de leveduras no solo são provenientes de estudos fundamentados em técnicas de cultivo, e, segundo Masínová et al. (2017a), esse é um grupo de microrganismo de fácil cultivo. Atualmente, métodos independentes de cultivo permitem que a composição da comunidade microbiana do solo possa ser inferida a partir da extração, da quantificação e da identificação de moléculas, principalmente de DNA e RNA (Hill et al., 2000). Recentemente, Masínová et al. (2017a) publicaram o primeiro trabalho com foco apenas nos fatores que determinam a

composição da comunidade de leveduras em solos florestais na Europa utilizando sequenciamento de *amplicons* pela plataforma Illumina MiSeq.

Muitas são as espécies de leveduras empregadas em processos biotecnológicos, e a prospecção de estirpes com características que promovem o crescimento vegetal e o controle biológico de fungos fitopatogênicos vem ganhando destaque (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006). Assim, prospectar substâncias bioativas ou atividades por leveduras selvagens pode ser promissora em futuras aplicações industriais; logo, a associação do conhecimento sobre a diversidade genética desse grupo com a sua diversidade funcional é essencial para o entendimento do papel ecológico em ambientes naturais.

Com isso, percebe-se a importância de conhecer a diversidade de leveduras nos solos, primeiramente por causa da sua importância ecológica nesse ecossistema, sobretudo por participar de maneira ativa na ciclagem dos nutrientes no solo. Por outro lado, as atividades humanas, a gestão do uso e manejo da terra e as mudanças climáticas estão causando grande impacto na biologia do solo, o que pode alterar completamente a comunidade microbiana e limitar o conhecimento sobre a real diversidade dos ambientes naturais. Dessa forma, o objetivo deste capítulo é expor o estado da arte sobre a diversidade desse grupo em diversos tipos de solo no mundo, apresentar as ferramentas, e as metodologias de estudo das comunidades de leveduras em solos e demonstrar as possíveis aplicações das leveduras como agentes no biocontrole e na promoção do crescimento de plantas. Espera-se que este material possa auxiliar e incentivar o desenvolvimento de pesquisas sobre a diversidade e a ecologia de leveduras em solos brasileiros, visando reduzir a atual lacuna de conhecimento nesse campo.

## **LEVEDURAS DO SOLO**

### **Taxonomia**

Leveduras, caracterizadas como um grupo taxonômico heterogêneo de fungos unicelulares, possuem distribuição ubíqua, mas não uniforme, em ambientes aquáticos e terrestres e na atmosfera (Péter et al., 2017; Buzzini et al., 2017). Estudos sobre a diversidade de leveduras nos solos se iniciaram no século XIX, período em que o solo

era considerado apenas um reservatório de leveduras provenientes de outros habitats; posteriormente, foi demonstrado que as comunidades de leveduras do solo são diversas e diferentes, em termos taxonômicos, dos presentes acima dele (Yurkov, 2018). Por definição clássica, leveduras são “fungos cujo crescimento vegetativo é predominantemente unicelular resultante de brotamento ou fissão e que não formam seus estados sexuais dentro de um corpo de frutificação ou sobre ele” (Kurtzman e Fell, 1998).

Filogeneticamente, as leveduras estão inseridas nos filos Ascomycota e Basidiomycota. Para o Ascomycota, espécies de leveduras são encontradas de forma exclusiva nos subfilos Saccharomycotina e Taphrinomycotina, com 103 gêneros descritos, sendo que alguns deles, como *Lipomyces*, possuem espécies predominantemente isoladas do solo (Buzzini et al., 2017). Espécies desse filo apresentam importância biotecnológica e industrial, geralmente associadas a processos fermentativos, tais como produção de bebidas alcoólicas, produtos de panificação, queijos, entre outros (Kurtzman et al., 2011). No filo Basidiomycota, espécies de leveduras ocorrem nos três subfilos: Agaricomycotina, Pucciniomycotina e Ustilaginomycotina, com aproximadamente 121 gêneros. Muitas dessas espécies são dimórficas, ou seja, alternam entre os estágios leveduriforme e hifal durante o seu ciclo de vida (Buzzini et al., 2017).

Apesar de as leveduras basidiomicéticas possuírem considerável importância médica, econômica e agrônômica, estima-se que as espécies descritas representem 1% das existentes na natureza. A identificação e a filogenia de leveduras basidiomicéticas são difíceis de se solucionar por causa da natureza polifilética desse grupo (Fell et al., 2000), embora esforços recentes tenham buscado esclarecer as relações filogenéticas e atualizar a classificação taxonômica de espécies pertencentes ao filo Basidiomycota (Scorzetti et al., 2002; Liu et al., 2015). Espécies desse filo apresentam uma grande diversidade de interações ecológicas, como patógenos de plantas, insetos, micoparasitas e saprófitas (Buzzini et al., 2017).

O conhecimento sobre a diversidade de leveduras em diversos habitats tem aumentado de modo exponencial, com relatos de 1.500 espécies descritas até 2011, na última versão do “*The yeasts: a taxonomic study*” (Kurtzman et al., 2011), com

estimativas do total de espécies de leveduras chegando a 15 mil (Lachance, 2006). Porém, aproximadamente 130 espécies têm sido relatadas por causa de sua associação com o ecossistema solo em todo o mundo (Yurkov et al., 2011).

Várias novas espécies de leveduras isoladas de forma exclusiva dos solos têm sido descritas recentemente, tanto no filo Basidiomycota (Middelhoven et al., 2001; Sugita et al., 2002; Valente et al., 2012; Motaung et al., 2013; Masínová et al., 2017b) quanto no filo Ascomycota (Lee et al., 2009; Ribeiro et al., 2011; Mestre et al., 2011b; Nouri et al., 2018). Esses recentes relatos demonstram o quão pouco é explorada a diversidade desse grupo e comprovam a urgente necessidade de esforços e desenvolvimento de abordagens para promover o inventário global da diversidade de leveduras em solos.

### **Fatores ecológicos que influenciam a distribuição de leveduras**

As leveduras representam uma parte significativa da comunidade fúngica dos solos. Elas possuem papel ecológico importante e fundamental, pois influenciam o crescimento microbiano e vegetal, atuam na formação de agregados e na manutenção da estrutura dos solos, servem como fonte de nutrientes para predadores, participam da mineralização da matéria orgânica e da dissipação de carbono e energia, bem como atuam na ciclagem de nutrientes, como nitrogênio e enxofre, e na solubilização de nutrientes, como o fosfato (Botha, 2011).

A quantidade e a composição de espécies das comunidades nos solos são distribuídas de forma desigual. São observadas com frequência, em riqueza e abundância, nas camadas superficiais dos solos mais do que nas camadas mais profundas (Masínová et al., 2017a; Glushakova et al., 2017), em maior quantidade nos solos rizosféricos e em associação com ectomicorrizas do que em solos não rizosféricos (Mestre et al., 2011a) e em menor número em associação com invertebrados do solo (Ba et al., 2000). A distribuição de leveduras no solo é frequentemente fragmentada, com poucas espécies compartilhadas entre os sítios amostrados (Yurkov, 2017).

A comunidade de leveduras do solo pode conter espécies que de fato residem nesse habitat e espécies que são transitórias ou que ocasionalmente estão presentes nos solos. Espécies que se originam, reproduzem-se e são residentes exclusivas nos solos

são chamadas de autóctones. Já espécies originárias de outros habitats são chamadas de alóctones (Starmer e Lachance, 2011). Na prática, essa distinção é difícil de ser feita, sobretudo em habitats como o solo, que, muitas vezes, pode servir de reservatórios para espécies provenientes de outros habitats (Yurkov, 2018). Entretanto, espécies de leveduras, que são repetidamente isoladas do solo, podem ser consideradas como autóctones (Starmer e Lachance, 2011). Por exemplo, espécies do gênero *Lipomyces* são bem conhecidas por sua associação com solos nas camadas ricas em matéria orgânica, e todas as espécies descritas até o momento são provenientes exclusivamente de amostras de solo (Ribeiro et al., 2010).

Leveduras pigmentadas, como *Cystobasidium*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridiobolus*, *Sporobolomyces* e *Vishniacozyma*, originam-se de superfícies de plantas e são com frequência encontradas em solos. Espécies dos gêneros *Cystofilobasidium* e *Apiotrichum* são, muitas vezes, compartilhadas entre o horizonte A do solo e a serapilheira, enquanto os gêneros *Lipomyces* e *Myxozyma* são residentes permanentes nos solos (Botha, 2011).

A capacidade de sobrevivência de leveduras autóctones no solo se deve a alguns fatores, a saber: ampla capacidade metabólica que propicia a assimilação de diversos nutrientes, produção de esporos resistentes e de cápsulas exopoliméricas, que permite a sobrevivência em ambientes oligotróficos e facilita a formação de biofilmes (Botha, 2006).

A habilidade na produção de cápsulas exopoliméricas confere vantagens às espécies de leveduras, uma vez que esse mecanismo facilita o sequestro e a concentração de nutrientes em ambientes com baixa concentração nutricional e teor de água, como solos semiáridos, nos quais ocorre uma predominância de leveduras encapsuladas (Vishniac, 2006). Além disso, em razão dessa habilidade, leveduras dos gêneros *Cryptococcus* e *Lipomyces* possuem um importante papel na formação e na estabilidade de agregados do solo, afetando a capacidade de retenção de água e, consequentemente, aumentando a fertilidade do solo (Botha, 2011).

Ao contrário do fenótipo sacarolítico tipicamente associado a leveduras, ou seja, sua capacidade de decompor açúcares como fonte de energia no metabolismo, as

espécies relatadas nos solos são capazes de utilizar um amplo espectro de fontes de carbono, incluindo produtos da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, tais como compostos aromáticos simples, hemicelulose e ácidos orgânicos (Yurkov et al., 2012a).

Algumas espécies são capazes de utilizar aerobicamente L-arabinose, D-xilose e celobiose, provenientes da hidrólise enzimática de materiais vegetais lignocelulósicos, realizada por bactérias e fungos. Enquanto isso, outras poucas espécies assimilam intermediários da degradação da lignina, como ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico e ácido vanílico (Botha, 2006).

Recentemente Masínová et al. (2018) demonstraram que algumas espécies de leveduras podem atuar como decompositoras eficientes de hemicelulose, celulose e quitina, assim como grande parte da atividade enzimática está associada com a superfície da parede celular. Essa característica difere da estratégia utilizada por fungos filamentosos decompositores, os quais secretam enzimas hidrolíticas no ambiente.

Considerando a heterogeneidade dos solos, pode-se esperar que o número e a diversidade de espécies de leveduras sejam distribuídos de forma desigual e mostrem variação temporal, dependendo das condições ambientais que estão em constante mudança (Botha, 2006). A densidade e a presença de certas espécies de leveduras podem variar desde nenhuma ou algumas até milhares de células por grama de solo, com influência de diversos fatores, tais como: tipo e forma de manejo do solo, precipitação e condições climáticas e presença de plantas e animais (Phaff e Starmer, 1987; Sláviková e Vadkertiová, 2000, 2003a).

O ambiente possui importância fundamental para o desenvolvimento de leveduras nos solos. Assim, os parâmetros abióticos explicam algumas diferenças encontradas nas comunidades de leveduras, embora estas possam variar extremamente dentro de uma pequena escala espacial, entre diferentes tipos de floresta ou diferentes tipos e intensidades de manejo do solo (Quadro 1) (Yurkov et al., 2012a).

**Quadro 1. Principais fatores ecológicos (bióticos e abióticos) associados a distribuição de espécies e sua influência na estrutura das comunidades de leveduras nos solos.**

<b>Espécies de levedura</b>	<b>Fator ecológico associado a distribuição de espécies</b>	<b>Resultados na comunidade</b>	<b>Referência</b>
<i>Candida frijolensis</i> <i>Candida neerlandica</i> <i>Candida orthopsilosis</i> <i>Candida railenensis</i> <i>Candida sojae</i> <i>Candida tetrigidarum</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida flavescens</i> <i>Kazachstania exigua</i> <i>Torulaspora globosa</i> <i>Torulaspora maleeae</i> <i>Apiotrichum loubieri</i>	Acidez total e alto teor de alumínio	Modifica a composição taxonômica	Carvalho et al., 2013.
<i>Saitozyma podzolica</i>	Alta Precipitação pluvial e conteúdo de matéria orgânica. Alta relação C:N. Matéria orgânica em decomposição	Aumenta a abundância da espécie	Vishniac, 2006. Yurkov et al., 2012a. Mestre et al., 2014.
<i>Cryptococcus albidus</i> <i>Cryptococcus chernovii</i>	Temperatura	Determina a distribuição das espécies	Vishniac, 2006.
<i>Barnettozyma californica</i> <i>Barnettozyma vustinii</i> <i>Clavispora reshetovae</i> <i>Lindnera saturnus</i> <i>Schwanniomyces occidentalis</i> <i>Barnettozyma pratensis</i> <i>Candida kruisii</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Kazachstania piceae</i> <i>Lindnera misumaiensis</i>	Tipo de vegetação (Pastagem ou Florestal)	Modifica a composição taxonômica	Yurkov et al., 2012.
<i>Cryptococcus phenolicus</i>	Baixa precipitação pluvial	Aumenta a predominância da espécie	Mestre et al., 2014.
<i>Apiotrichum porosum</i>	Baixas temperaturas, pouca disponibilidade de nutrientes e água	Aumenta a predominância da espécie	Mestre et al., 2014.
<i>Solicoccozyma terricola</i> <i>Cystofilobasidium capitatum</i> <i>Trichosporon pullulans</i> <i>Rhodotorula rubra</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Kloeckera apis</i> <i>Debaryomyces castellii</i> <i>Debaryomyces polymorphus</i> <i>Pichia americana</i>	Tipo de vegetação (diferentes formações florestais)	Modifica a composição taxonômica	Maksimova e Chernov, 2004. Sláviková e Vadkertiová, 2000.

<i>Apiotrichum porosum</i> <i>Cryptococcus carnescens</i> <i>Dothiora cannabinae</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Cryptococcus magnus</i> <i>Cryptococcus saitoi</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Pichia misumaensis</i>	Horizonte e tipo do solo	Modifica a composição taxonômica	Glushakova et al., 2017.
<i>Saitozyma podzolica</i> <i>Lipomyces kononenkoae</i> <i>Aureobasidium leucospermi</i>	Acidez total e alto teor de alumínio, potássio e matéria orgânica	Aumenta a predominância da espécie	Moreira e Vale, 2018.
<i>Candida valida</i> <i>Williopsis saturnus</i> <i>Cryptococcus albidus</i> <i>Debaryomyces occidentalis</i>	Cultura agronômica	Modifica a composição taxonômica	Sláviková e Vadkertiová, 2003.
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Cystofilobasidium capitatum</i>	Sazonalidade	Modifica a composição taxonômica	Sláviková e Vadkertiová, 2000.
<i>Saitozyma podzolica</i> <i>Solicoccozyma fuscescens</i> <i>Solicoccozyma terricola</i> <i>Apiotrichum porosum</i> <i>Apiotrichum dulcitum</i> <i>Cutaneotrichosporon moniliiforme</i> <i>Fellozyma inositophila</i>	pH do solo e tipo de vegetação (Espécie de árvore dominante)	Modifica a composição taxonômica	Masínová et al., 2017.
<i>Williopsis saturnus</i> <i>Pichia aff. stipitis</i>	Macrofauna do solo (ex. minhocas)	Modifica a composição taxonômica (Aumenta ascomicetos)	Yurkov et al., 2008.
<i>Candida parapsilosis</i> <i>Cryptococcus uzbekistanensis</i> <i>Cryptococcus huempfi</i> <i>Rhodospiridium babjevae</i> <i>Schwanniomyces polymorphus</i> <i>Sporobolomyces roseus</i>	Baixa precipitação	Modifica a composição taxonômica (Aumenta o número de espécies raras)	Yurkov et al., 2016.
<i>Solicoccozyma terricola</i> <i>Saitozyma podzolica</i>	Solos ricos em nutrientes, teor de N, pH do solo e teor de água	Modifica a composição taxonômica (Aumenta basidiomicetos)	Yarwood et al., 2010.
<i>Candida santamariae</i> <i>Candida oregonensis</i> <i>Schizoblastosporion skarkeyi-henricii</i> <i>Apiotrichum porosum</i> <i>Solicoccozyma terricola</i> <i>Saitozyma podzolica</i>	Sazonalidade	Modifica a composição taxonômica (Aumenta a abundância na primavera)	França et al., 2016.

<i>Cryptococcus carnescens</i> <i>Cryptococcus nyarrowii</i> <i>Mrakia stokesii</i> <i>Cryptococcus carnescens</i> <i>Leucosporidium</i> spp. <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Rhodotorula laryngis</i> <i>Clavispora lusitaniae</i>	pH alcalino e baixos valores de condutividade elétrica	Modifica a composição taxonômica (Aumenta diversidade de espécies)	Connell et al., 2008.
<i>Candida maritima</i> <i>Holtermanniella wattica</i> <i>Rhodotorula fujisanensis</i> <i>Lindnera rhizosphaerae</i> <i>Rhodotorula colostri</i> <i>Apiotrichum dulciturum</i> <i>Dothiora cannabinae</i>	Fração do solo	Modifica a composição taxonômica (Aumenta a proporção de leveduras ascomicéticas na rizosfera)	Mestre et al., 2011a.

---

Temperatura, taxa de precipitação anual, pH e teor de carbono são os principais parâmetros do solo frequentemente associados à distribuição de leveduras (Quadro 1) (Yurkov et al., 2012b). Baixos valores de pH favorecem o crescimento e a permanência de fungos no solo, resultando em um maior tamanho populacional das comunidades presentes em solos ácidos. A textura dos solos, no que se refere à porcentagem de partículas (areia, silte e argila), também influencia a comunidade de leveduras, a qual, em solos semiáridos, apresentou um maior número de células em amostras com maior conteúdo de silte e baixo pH. Já solos ácidos favorecem o crescimento fúngico, pois acredita-se que o efeito da textura do solo (maior conteúdo de silte) esteja relacionado a uma maior disponibilidade de nutrientes, como cátions, os quais tendem a ficar adsorvidos a partículas de argila e silte em solos alcalinos (Vreulink et al., 2007). Já em solos alcalinos, o número de células de leveduras das espécies mais comuns apresentou baixos valores, em comparação a solos ácidos (Maksimova e Chernov, 2004).

Solos de alta fertilidade suportam uma maior diversidade de espécies do que solos de baixa fertilidade. Leveduras presentes em solos de baixa fertilidade desenvolvem estratégias de sobrevivência, como a produção de cápsulas de exopolissacarídeos e a formação de biofilmes para sequestro de umidade e nutrientes (Spencer e Spencer, 1997; Botha, 2006).

Alto teor de alumínio e acidez total podem determinar a distribuição das comunidades de leveduras em solos do domínio Cerrado, bem como o pH, a textura e o conteúdo de fósforo (Quadro 1) (Carvalho et al., 2013; Moreira e Vale, 2018), em que aproximadamente 90% da distribuição de espécies do gênero *Candida* foi correlacionada com altos teores de alumínio e acidez total, sugerindo que essas espécies possuam mecanismos de tolerância a essas condições (Carvalho et al., 2013).

As populações de leveduras nos solos são fortemente afetadas não somente pela umidade e pela temperatura, mas também pela drenagem do solo, no que se refere à textura e ao conteúdo de matéria orgânica (Di Menna, 1965). O teor de umidade do solo e a disponibilidade de nutrientes em formas assimiláveis podem propiciar um maior número de células de leveduras. Em ambientes hostis, com menor disponibilidade de nutrientes facilmente assimiláveis, o número de leveduras diminui, e as comunidades apresentam uma composição diferente de espécies, estando relacionada à textura do solo, à disponibilidade de água e à capacidade das espécies em assimilar moléculas complexas (Vishniac, 2006; Vreulink et al., 2007; Carvalho et al., 2013).

As características físico-químicas dos solos podem influenciar a distribuição taxonômica. Uma combinação de temperatura e precipitação explica a maior parte do padrão de distribuição de espécies predominantes nos solos, enquanto uma combinação de precipitação e pH explica a distribuição em nível de clado dentro das ordens mais comuns, com influência do tipo de vegetação presente. Por exemplo, espécies do gênero *Cryptococcus*, inseridas no clado *Albidus*, predominam em solos desérticos, enquanto espécies de outros clados, em solos mais úmidos e com mais vegetação, com as espécies da ordem Tremellales sendo favorecidas em solos com baixo pH (Vishniac, 2006).

A incidência de radiação UV pode ser um importante fator ecológico que determina a distribuição das comunidades de leveduras em ambientes sem vegetação ou dominados por vegetação rasteira (Tosi et al., 2005), propiciando uma maior abundância de leveduras pigmentadas, como *Rhodotorula mucilaginosa*, cuja pigmentação confere vantagens seletivas ao proteger as células contra a incidência de luz UV (Connell et al., 2008).

A diversidade de leveduras em ambientes com condições extremas é menor em comparação com ecossistemas florestais ou cultivados. Leveduras pertencentes, principalmente, aos gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula* são responsáveis por uma porcentagem significativa de sua população em regiões com condições climáticas adversas. Leveduras ascomicéticas, por sua vez, são escassas nesse tipo de ecossistema (Lisichkina et al., 2003).

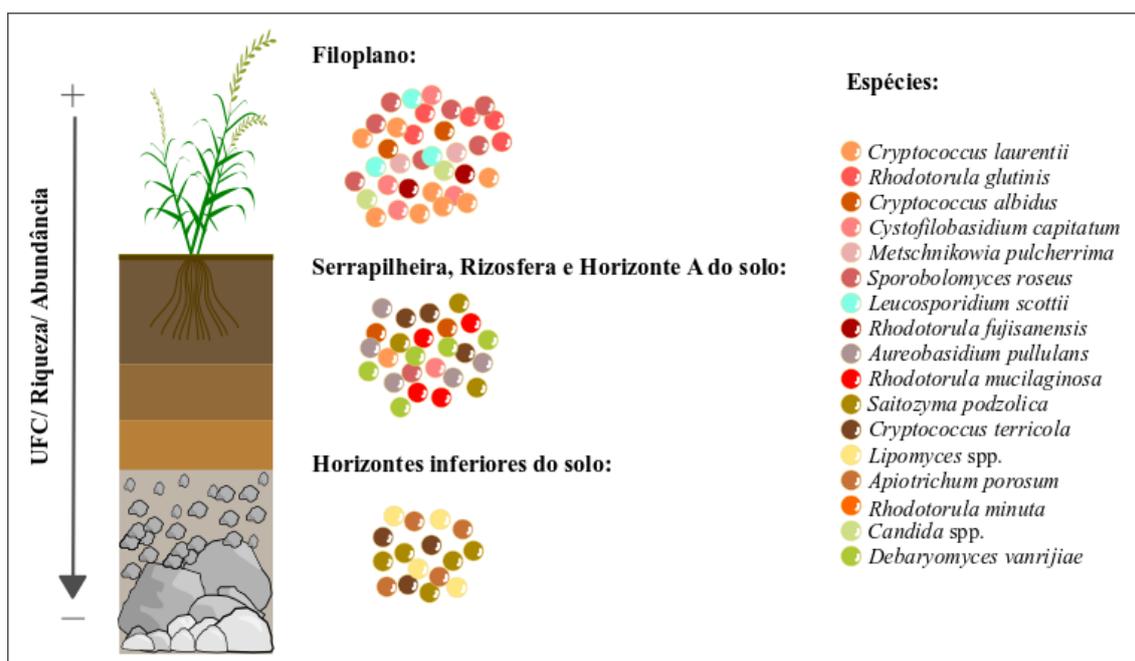
Fatores ambientais, além de determinar a contagem de leveduras, podem ditar a composição ou a dominância de espécies nas comunidades. Em solos florestais da Patagônia, algumas espécies tipicamente isoladas de solos tiveram diferentes padrões de distribuição. *Saitozyma podzolica* foi dominante em solos ricos em nutrientes, enquanto *Apiotrichum porosum* dominou solos com baixa disponibilidade de nutrientes e de água e com temperaturas mais baixas; já leveduras encapsuladas, como *Cryptococcus phenolicus*, dominaram locais com baixa precipitação (Mestre et al., 2014).

A composição da comunidade de leveduras do solo pode ser afetada também pelo tipo de vegetação. O decaimento de folhas, provenientes de plantas acima do solo, pode contribuir de modo substancial para a composição das comunidades, uma vez que o filoplano contém uma população abundante de leveduras (Yurkov et al., 2012b). Porém, a semelhança entre a comunidade do filoplano e dos solos diminui gradualmente, tanto em abundância como em riqueza de espécies, desde a serapilheira até os horizontes mais profundos do solo (Figura 1) (Maksimova e Chernov, 2004).

Além disso, observa-se uma sucessão de espécies desde o filoplano até as camadas mais profundas do solo (Figura 1). Por exemplo, *Papiliotrema laurentii* e *Rhodotorula glutinis* são espécies predominantes nas partes aéreas de plantas e consideradas transientes ou alóctones nos solos. Já nos resíduos vegetais em decomposição, geralmente encontram-se fungos leveduriformes, como *Aureobasidium pullulans* e *Cystofilobasidium capitatum*. Nos horizontes superiores e, sobretudo, mais profundos dos solos, são encontradas espécies tipicamente pedobiontes ou autóctones do solo, como *Saitozyma podzolica* e *Solicoccozyma terricola* (Maksimova e Chernov, 2004).

A atividade da macrofauna do solo também pode afetar a distribuição e a composição taxonômica das comunidades de leveduras nos solos. Em solos florestais, a atividade das minhocas *Lumbricus terrestris* teve pouco efeito na abundância total de leveduras, porém influenciou substancialmente a composição taxonômica da comunidade, aumentando, de modo significativo, a quantidade de leveduras ascomicéticas em substratos associados com a atividade das minhocas (Yurkov et al., 2008).

Por causa do pequeno tamanho das células, as comunidades de leveduras ocupam micro-habitats no solo que podem ser afetados por diversas propriedades do solo, como acidez, teor de água e disponibilidade de nutrientes, conforme demonstrado. Esses atributos do solo, por sua vez, podem ser afetados pela composição de espécies de plantas presentes.



**Figura 1. Sucessão de espécies nas comunidades do filoplano até os horizontes inferiores do solo, enfatizando a diminuição da densidade populacional, a riqueza e a abundância de espécies com a profundidade do solo. Fonte: elaborada com base em Maksimova e Chernov (2004), Glushakova et al. (2017) e Golubtsova et al. (2007).**

Dessa forma, sugere-se que as comunidades de leveduras do solo sejam influenciadas por um conjunto de interações complexas de diversos fatores ambientais,

em menor ou maior grau, que irá ditar a composição e a estrutura dessas comunidades (Mestre et al., 2014; Masínová et al., 2017a).

### Comunidades de leveduras em solos cultivados e florestais

A influência do tipo de vegetação e do uso e manejo da terra na composição da comunidade de leveduras do solo (Quadro 2) revela um forte efeito a longo prazo da substituição de florestas por vegetação campestre (Yurkov et al., 2012a). Em solos florestais não manejados, foi observada a predominância das espécies *Solicoccozyma terricola* e *Trichosporon dulciturum*. Contudo, à medida que se aumenta a intensidade de manejo florestal, elas estão sendo substituídas pelas espécies *Saitozyma podzolica* e *Cryptococcus terreus*. Já em pastagens, a abundância das espécies *Schwanniomyces castellii* e *Cryptococcus aerius* diminui conforme se intensifica o manejo das áreas.

**Quadro 2. Densidade populacional e espécies de leveduras mais frequentes em solos cultivados e florestais.**

Tipo de solo/ manejo	Densidade de leveduras (UFC/g de solo)	Espécies predominantes	Referência
Cultivado (milho, beterraba, batata)	$40 - 6.8 \times 10^3$	<i>Papiliotrema laurentii</i> <i>Candida maltosa</i> <i>Metschnikowia pulcherrima</i> <i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	Sláviková e Vadkertiová, 2003a.
Cultivado (cana-de-açúcar)	$1.5 \times 10^6 - 10.23 \times 10^6$	<i>Papiliotrema laurentii</i> <i>Cryptococcus albidus</i> <i>Fellomyces horovitziae</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Candida azyma</i> <i>Bullera variabilis</i>	de Azeredo et al., 1998.
Cultivado (ameixa)	$1.7 \times 10^5 - 2.8 \times 10^5$	<i>Rhodotorula</i> spp. <i>Candida</i> spp.	Tuszynski e Satora, 2003.
Florestal (Rússia)	$10^3 - 10^5$	<i>Saitozyma podzolica</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i> <i>Rhodotorula mucilaginoso</i> <i>Cryptococcus magnus</i> <i>Schwanniomyces castellii</i> <i>Torulasporea delbrueckii</i> <i>Apiotrichum porosum</i> <i>Apiotrichum laibachii</i> <i>Apiotrichum dulciturum</i>	Glushakova et al., 2015.

Florestal (Rússia)	$10^2 - 10^4$	<i>Apiotrichum porosum</i> <i>Cryptococcus saitoi</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Cryptococcus wieringae</i> <i>Cryptococcus tephrensis</i> <i>Rhodotorula colostri</i> <i>Cryptococcus magnus</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Cryptococcus carnescens</i>	Glushakova et al., 2017.
Florestal (Alemanha)	$2.4 \times 10^3 - 9.7 \times 10^5$	<i>Kazachstania piceae</i> <i>Schizoblastosporion starkeyi-henricii</i> <i>Solicoccozyma terricola</i> <i>Rhodotorula colostri</i> <i>Apiotrichum dulciturum</i> <i>Apiotrichum porosum</i> <i>Saitozyma podzolica</i>	Yurkov et al., 2012a.
Florestal (Portugal)	$1.3 \times 10^5 - 1.3 \times 10^6$	<i>Cryptococcus terreus</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Cryptococcus aerius</i> <i>Candida quercitrusa</i> <i>Meyerozyma guilliermondii</i> <i>Aureobasidium namibiae</i> <i>Lachancea thermotolerans</i>	Yurkov et al., 2016.
Florestal (Eslováquia)	$1.5 \times 10^3 - 1.1 \times 10^4$	<i>Papiliotrema laurentii</i> <i>Cystofilobasidium capitatum</i> <i>Leucosporidium scottii</i> <i>Rhodotorula aurantiaca</i> <i>Trichosporon cutaneum</i>	Sláviková e Vadkertiová, 2000.
Florestal (Argentina)	$3.42 \times 10^3 - 3.75 \times 10^3$	<i>Saitozyma podzolica</i> <i>Cryptococcus phenolicus</i> <i>Cryptococcus aerius</i> <i>Candida maritima</i> <i>Holtermanniella wattica</i> <i>Solicoccozyma terricola</i> <i>Cryptococcus terreus</i> <i>Apiotrichum porosum</i>	Mestre et al., 2011a.

Leveduras ascomicéticas, em geral, são mais frequentes e abundantes em solos cultivados e pastagens, ao passo que leveduras basidiomicéticas, em solos florestais (Yurkov, 2018). A composição de espécies também modifica entre os solos cultivados e florestais. Enquanto espécies, como *Papiliotrema laurentii*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Leucosporidium scottii*, *Rhodotorula aurantiaca* e *Trichosporon cutaneum*, predominam em solos florestais (Sláviková e Vadkertiová, 2000), outras espécies, como

*Candida maltosa*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Sporobolomyces salmonicolor*, são predominantes em solos cultivados (Sláviková e Vadkertiová, 2003a).

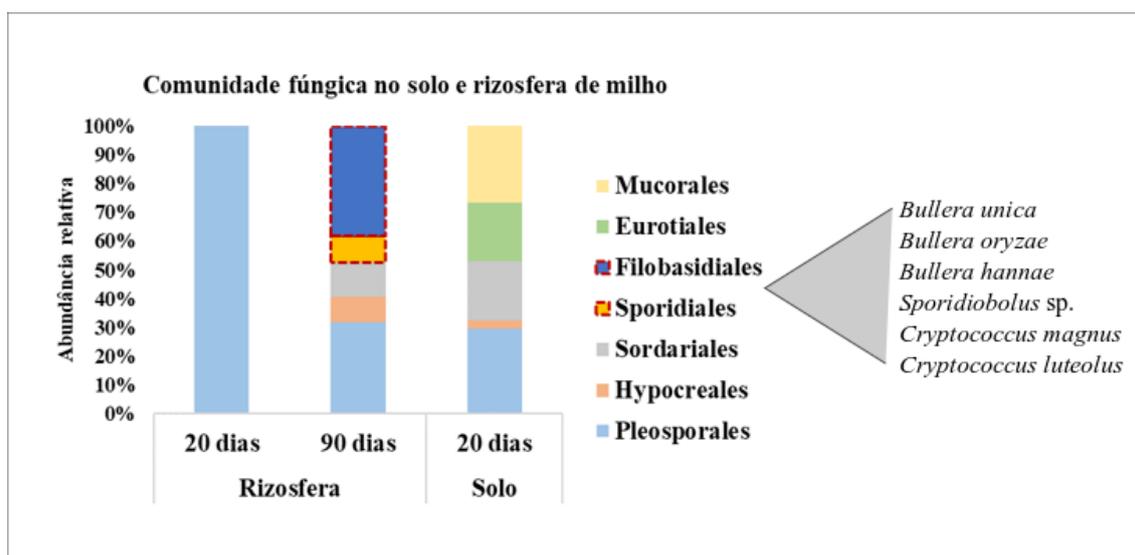
Além disso, a população de leveduras em solos cultivados pode ser significativamente menor do que a encontrada em solos florestais, nos quais o número de células viáveis chega a ser dez vezes menor (Sláviková e Vadkertiová, 2000, 2003a), podendo ter seu tamanho e sua abundância de espécies reduzidos, principalmente como consequência do uso de produtos fitossanitários (Sláviková e Vadkertiová, 2003b).

A composição e a abundância das comunidades de leveduras em solos cultivados e/ou manejados são influenciadas pelas leveduras provenientes de partes aéreas das plantas, as quais entram no solo durante o plantio direto ou com material vegetal em decomposição, dependendo, sobretudo, do conteúdo de matéria orgânica, da disponibilidade de água, do tipo de solo, do regime de manejo e da planta cultivada. O tamanho da população de leveduras varia de poucos a muitos milhares de unidades formadoras de colônias por grama de solo (Quadro 2). A diversidade de leveduras ascomicéticas presentes em solos agrícolas inclui espécies fermentativas, leveduras pedobiontes e fungos dimórficos. Já as leveduras basidiomicéticas são encontradas, principalmente, em espécies relacionadas aos gêneros *Cryptococcus* e *Trichosporon* (Vadkertiová et al., 2017).

O estágio de desenvolvimento da planta cultivada pode influenciar a composição e a abundância das comunidades de leveduras associadas à rizosfera. Em plantações de milho, foi demonstrado que a composição da comunidade de fungos na rizosfera de plantas jovens (20 dias) diferiu consideravelmente daquela de plantas senescentes (90 dias), em que fungos da ordem Pleosporales do filo Ascomycota predominaram em plantas jovens, enquanto leveduras basidiomicéticas, das ordens Filobasidiales e Sporidiales, foram predominantes na rizosfera de plantas senescentes (Figura 2) (Gomes et al., 2003). Já em plantações de cana-de-açúcar, a contagem de leveduras atingiu  $1,5 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup> na fase inicial de crescimento das plantas, chegando a quantidades dez vezes maior no estágio final de crescimento (De Azeredo et al., 1998).

A comunidade de leveduras também se modifica de acordo com o compartimento do solo em que se encontra. Um estudo da comunidade fúngica em

plantações de milho, avaliando quatro compartimentos do solo (0-10 cm, 40-50 cm, 60-70 cm e raiz), revelou alguns táxons de leveduras generalistas, como *Trichosporon*, *Exophiala* e *Candida*, nos compartimentos do solo, e os táxons *Cryptococcus* e *Rhodotorula*, na raiz. Entretanto, a proporção de leveduras foi maior nos compartimentos do solo (13-69%) do que na raiz (4-13%) (Moll et al., 2016). Diferentemente, na rizosfera de plantações de milho, as espécies *Bullera unica*, *B. hanna*, *B. oryzae*, *Cryptococcus magnus*, *Cr. luteolus* e *Sporidiobolus johnsonii* foram predominantes (Figura 2) (Gomes et al., 2003).



**Figura 2. Dinâmica da comunidade fúngica no solo e na rizosfera durante o desenvolvimento de plantas de milho. Em destaque, as ordens e as espécies de leveduras basidiomicéticas detectadas (Gomes et al., 2003).**

As diferenças encontradas estão relacionadas ao tipo de nutriente presente em cada compartimento do solo, indicando que as comunidades fúngicas presentes nos compartimentos superiores (0-10 cm e 40-50 cm) relacionam-se com os resíduos de plantas e os exsudados das raízes, enquanto as comunidades presentes no compartimento inferior (60-70 cm) estão mais distantes desses resíduos vegetais (Moll et al., 2016).

Algumas culturas podem influenciar a comunidade de leveduras do solo. Em solos de vinhedo, as populações de microrganismos foram afetadas pelas flutuações

sazonais, pelo estado fenológico das videiras e pelo tipo de manejo da terra. Porém, apenas a população de levedura foi dependente, principalmente, do efeito sinérgico da temperatura e do estado fenológico da videira, em que a abundância se relacionou com a disponibilidade de açúcares fermentáveis das uvas maduras e com a atividade humana durante a colheita (López-Piñeiro et al., 2013).

Além disso, as leveduras presentes no solo podem ser captadas pelas raízes das videiras e transportadas para o fruto na época de précolheita, contribuindo, assim, para a qualidade do fruto e dos seus produtos fermentáveis, conferindo características regionais derivadas do metabolismo da levedura captada do solo durante a fermentação alcoólica (Mandl et al., 2015). Solos de vinhedos podem apresentar uma alta diversidade de leveduras, principalmente ascomicetos, em razão de sua capacidade fermentativa, embora basidiomicetos, como a espécie *Aureobasidium pullulans*, também sejam abundantes (Kachalkin et al., 2015).

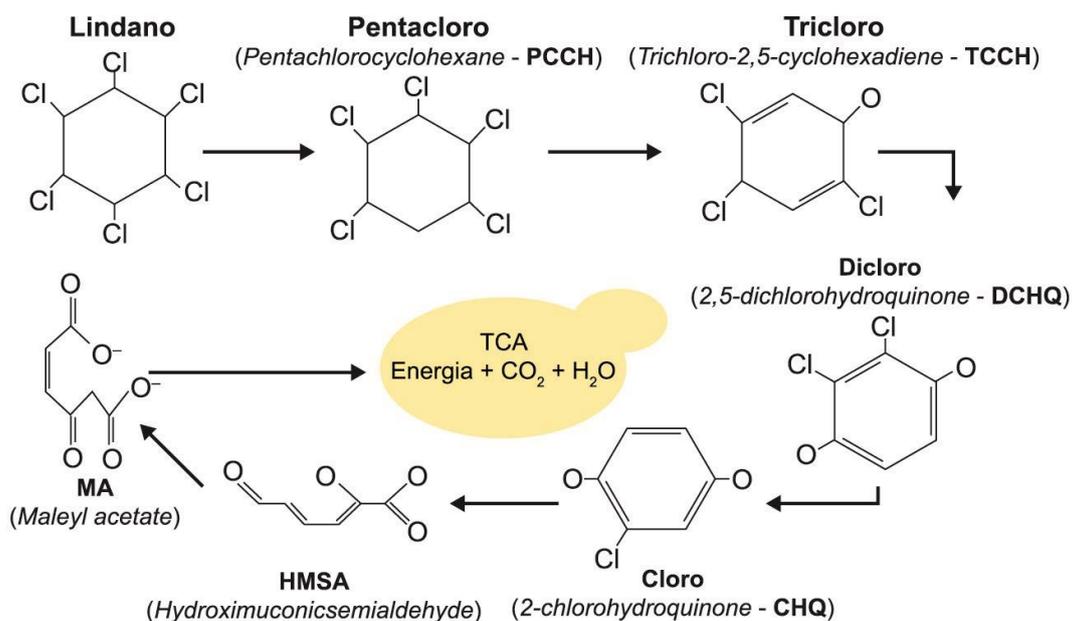
O cultivo de árvores frutíferas proporciona um aumento populacional na comunidade de leveduras durante o período de amadurecimento dos frutos (Quadro 2). Um estudo em pomares de ameixa demonstrou que a contagem de células de leveduras por grama de solo foi de  $2,8 \times 10^5$  CFU g<sup>-1</sup>, na época de amadurecimento dos frutos, para  $1,7 \times 10^5$  CFU g<sup>-1</sup>, um mês após a colheita (Tuszynski e Satora, 2003). Novas espécies têm sido descritas em solos de pomares, tanto para ascomicetos (Chen et al., 2010) como para basidiomicetos (Chen et al., 2012).

Ao contrário dos solos de pomares, solos de pastagens são manejados de forma menos intensa, pois contêm mais matéria orgânica e possuem uma maior riqueza de espécies vegetais utilizadas como forrageiras. As comunidades de leveduras nesse tipo de solo são formadas por espécies tipicamente pedobiontes, por exemplo, *Saitozyma podzolica*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Schwanniomyces capriotti* e *Candida vartiovaarae* (Glushakova et al., 2015, 2016; Vadkertiová et al., 2017).

Leveduras em solos cultivados podem ser resistentes, sensíveis ou neutras à presença de pesticidas e herbicidas. Já as espécies que habitam as partes aéreas de plantas, que são regularmente expostas a pesticidas, entram no solo com o decaimento

do material vegetal e contribuem para o aumento da quantidade de leveduras resistentes a agroquímicos nesse ambiente (Vadkertiová et al., 2017).

Algumas espécies de leveduras são hábeis em degradar pesticidas e herbicidas. *Lipomyces starkeyi*, espécie tipicamente isolada de solo, mostrou habilidade em degradar o herbicida Paraquat *in vitro*, sugerindo que a biodegradação desse herbicida esteja associada com a integridade da parede celular da levedura e que a remoção dessa parede celular resulta em perda completa da sua capacidade de degradação (Carr et al., 1985). *Candida* sp., uma nova espécie isolada de solos cultivados com cana-deaçúcar, apresentou habilidade em utilizar o pesticida lindano como única fonte de carbono, envolvendo um mecanismo enzimático para sua completa degradação (Figura 3) (Salam e Das, 2014). A capacidade de degradar o lindano também foi comprovada em *Rhodotorula* sp., uma nova espécie de levedura isolada de solos cultivados com sorgo (Salam et al., 2013).



**Figura 3. Proposta de via metabólica da degradação do pesticida lindano nas espécies *Candida* sp. e *Rhodotorula* sp. O composto final (Maleyl acetate), obtido por meio da ação de enzimas secretadas pelas leveduras, é assimilado e utilizado no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) para geração de energia na célula (Salam e Das 2014; Salam et al. 2013).**

É proposta uma rota de degradação hipotética, em que as espécies secretam enzimas que irão hidrolisar o lindano até o composto maleilacetato, o qual, por sua vez, é assimilado pela célula e utilizado no ciclo do ácido tricarboxílico para geração de energia (Figura 3) (Salam e Das, 2014; Salam et al., 2013).

Leveduras em solos cultivados também possuem um papel importante na transformação de nitrogênio, fósforo e fontes de carbono. Espécies, como *Aureobasidium pullulans* e *Exophiala* spp., produzem ureases que podem estar envolvidas na mineralização de ureia no solo. Já *Barnettozyma californica* e *Cyberlindnera suaveolens* utilizam nitratos e podem estar envolvidas na desnitrificação de nitrogênio (Vadkertiová et al., 2017). *Debaryomyces hansenii*, isolada de solo rizosférico, demonstrou eficiência na solubilização de fosfato, aumentando a disponibilidade desse nutriente para as plantas (Narsian et al., 2010). Algumas outras espécies possuem capacidade de assimilação de fontes de carbono, semelhante à celobiose e D-xilose, provenientes da degradação de celulose, hemicelulose e lignina (Cadete et al., 2012; Morais et al., 2013; Molnárová et al., 2014).

A diversidade de leveduras também tem sido estudada em solos florestais de distintos biomas do mundo. Diferentemente do que ocorre em solos cultivados, nos quais ascomicetos, em geral, são mais frequentes e abundantes, em solos florestais há a predominância de basidiomicetos, por possuírem a habilidade de utilizar um amplo espectro de fontes de carbono, incluindo compostos complexos. Espécies pertencentes ao gênero *Cryptococcus* estão entre as mais relatadas. Além disso, solos florestais, geralmente, contêm entre  $10^2$  e  $10^3$  células de leveduras por grama de solo (Quadro 2) (Yurkov, 2017, 2018).

Em solos florestais, as espécies de leveduras dependem das propriedades do solo, que, por sua vez, são muito influenciadas pela cobertura vegetal. As informações sobre o tipo de solo, considerando os processos químicos e físicos que ocorreram durante a formação do solo, refletem a história do habitat e dos fatores que moldaram as comunidades de leveduras ali presentes. Dessa forma, informações sobre o tipo de cobertura vegetal, o tipo de solo e suas propriedades físico-químicas são cruciais para entender os fatores que influenciam a comunidade de leveduras (Yurkov, 2017).

Fungos dominam as comunidades microbianas em solos florestais ricos em matéria orgânica, em solos desenvolvidos e que estão em processo final de sucessão e, com frequência, em solos ácidos (van der Heijden et al., 2008). As comunidades de leveduras são predominantes em solos de florestas temperadas e boreais, por serem ricos em matéria orgânica bruta e possuírem um processo de decomposição mais lento, por causa das baixas temperaturas (Yurkov, 2017).

A distribuição das comunidades de leveduras nos horizontes de três diferentes tipos de solo florestal da Rússia foi avaliada, e, em todos eles, a contagem máxima de leveduras foi de  $10^4$  UFC/g na serapilheira, diminuindo drasticamente com a profundidade. No entanto, na profundidade de 120-160 cm, a contagem de leveduras aumentou de maneira significativa em todos os solos (Glushakova et al., 2017).

Uma possível explicação para esse fenômeno seria o transporte passivo das células de leveduras pelos horizontes do solo para serem depositadas no horizonte B, no qual os constituintes solúveis dos horizontes A e E são acumulados. Por outro lado, o material orgânico que é lixiviado do horizonte A e depositado no horizonte B o caracteriza como um habitat rico em húmus, podendo, assim, suportar nutricionalmente uma comunidade de leveduras maior do que aquelas das camadas superiores do solo, cujas condições nutricionais são limitantes. Porém, ainda são necessários mais estudos para investigar se essas leveduras residem de forma passiva ou se propagam de maneira ativa no horizonte B dos solos (Yurkov, 2017).

A composição das espécies dominantes em cada tipo de solo foi significativamente diferente, e a maioria das espécies isoladas eram alóctones do solo, por exemplo, *Cryptococcus magnus*, *Cryptococcus carnescens* e *Rhodotorula mucilaginosa*, amplamente relatadas na filosfera de espécies vegetais florestais. *Saitozyma podzolica* e *Solicoccozyma terricola*, espécies autóctones do solo, foram encontradas em somente um tipo de solo com abundância relativa insignificante. Já *Apiotrichum porosum*, tipicamente isolada de solos e sobretudo associada ao horizonte A, foi encontrada em todos os tipos de solos avaliados (Glushakova et al., 2017).

A distribuição das comunidades de leveduras em florestas de coníferas e florestas decíduas durante o ano é desigual, pois a abundância e a riqueza de espécies

são influenciadas pelas flutuações sazonais. Amostras coletadas durante a primavera continham uma maior abundância de células do que as amostras coletadas no verão, quando provavelmente a intensidade luminosa e o baixo teor de água no solo tenham tido um efeito inibitório sobre as leveduras. A distribuição das leveduras pigmentadas *Rhodotorula* e *Cystofilobasidium* spp. variou de maneira sazonal, sendo amplamente relatadas durante o outono e o inverno (Sláviková e Vadkertiová, 2000). Dessa forma, percebe-se uma correlação entre o estado fenológico das espécies vegetais presentes nas florestas e a abundância e a riqueza das comunidades de leveduras dos solos, o qual se altera de acordo com a estação sazonal.

Parâmetros abióticos possuem pouco efeito sobre a comunidade de leveduras do solo dentro de um mesmo tipo florestal. A quantidade, a diversidade e a estrutura da comunidade de leveduras refletem as propriedades da cobertura vegetal, semelhante à idade e ao estado fenológico das plantas (Yurkov et al., 2012a).

Em florestas do Mediterrâneo, com três diferentes tipos de cobertura vegetal, a diversidade de leveduras não mostrou diferenças dentro do mesmo sistema, apresentando uma mudança gradual à medida que ia modificando o tipo de cobertura vegetal (de florestas úmidas para florestas secas). As florestas com menor nível de precipitação tiveram forte impacto na diversidade de leveduras e na estrutura da comunidade, com um aumento no número de espécies raras e diminuição nos valores de uniformidade. Dessa forma, a estrutura da comunidade de leveduras reflete os fatores ambientais que afetam a cobertura vegetal acima do solo (Yurkov et al., 2015).

A presença de espécies arbóreas dominantes foi o principal fator que explicou a ocorrência e a diversidade de leveduras em florestas boreais da Europa, mais especificamente na Rússia. Dentro de cada tipo florestal, o fator que melhor explicou a ocorrência de leveduras foi o horizonte do solo em que se encontra. Para algumas espécies de leveduras, a abundância foi determinada apenas pelo tipo de substrato (horizonte), independentemente do tipo de floresta. Entretanto, a abundância das espécies dominantes variou também com o tipo de floresta (Maksimova e Chernov, 2004).

Do mesmo modo, na Argentina, um estudo observou diferenças entre a comunidade de leveduras do solo associadas às espécies arbustivas *Bulnesia retama* e *Larrea divaricata*, com o solo associado à *B. retama* apresentando uma maior diversidade de espécies. Além disso, a espécie mais frequente foi a *Diutina catenulata*. Também foi verificado que a maior parte dos gêneros de leveduras isoladas do solo estava presente na parte aérea das plantas. Em contrapartida, em solos não associados a nenhuma das duas plantas, percebeu-se uma maior variedade taxonômica nos isolamentos, podendo, nesse caso, estar relacionada às características físico-químicas do solo (Toro et al., 2005).

Em florestas dominadas por espécies vegetais do gênero *Betula* na Rússia, a distribuição, a riqueza e a abundância de espécies foram determinadas pela região geográfica em que foi feita a coleta de amostras e pelo tipo de substrato avaliado (solo ou filosfera). Várias espécies foram isoladas exclusivamente em um único tipo de substrato, demonstrando que existem diferenças entre a comunidade de leveduras do solo e a da filosfera (Yurkov et al., 2014).

Utilizando abordagem independente de cultivo, Masínová et al. (2017a) descreveram a diversidade das comunidades de leveduras em solos temperados. A proporção de sequências associadas a espécies de leveduras foi significativamente maior no solo do que na serapilheira, indicando a pouca ou nenhuma atuação desse grupo em processos de decomposição da matéria orgânica. Entretanto, tem sido demonstrado que alguns táxons de leveduras atuam na decomposição de celulose, quitina e hemicelulose, enquanto a grande maioria das espécies do solo atua como oportunistas que utilizam os produtos da decomposição fornecidos por outros microrganismos (Masínová et al., 2018).

### **Comunidade de leveduras em solos de ambientes extremos**

Solos de ambientes extremos também são potenciais habitats de leveduras. São consideradas como extremófilas ou extremotolerantes as espécies de leveduras que exigem ou toleram condições extremas para o seu crescimento. Condições ambientais extremas incluem temperaturas extremas, radiação, pressão, dessecação, salinidade, pH, limitação de nutrientes e de oxigênio (Péter et al., 2017).

Dessa forma, podem ser classificadas como: leveduras xerofílicas, que são capazes de crescer em ambientes muito secos; leveduras psicrófilas, que possuem temperaturas ótimas de crescimento abaixo de 15 °C; leveduras halófilas, que possuem a capacidade de crescer em ambientes hipersalinos com concentrações de NaCl até a saturação; leveduras osmófilas, que são capazes de crescer em ambientes ricos em açúcares; leveduras acidofílicas, que crescem com baixos valores de pH. Além dessas classificações, leveduras podem ser encontradas em ambientes alcalinos, com amplas variações de temperatura, ambientes com altas concentrações de metais e ambientes xenobióticos (Raspor e Zupan, 2006).

Em solos localizados no Irã e caracterizados como oligotróficos e extremamente hipersalinos, foram detectados os gêneros de basidiomicetos: *Cystobasidium*, *Holtermanniella*, *Naganishia*, *Rhodotorula*, *Saitozyma*, *Solicoccozyma*, *Tausonia*, *Vanrija* e *Vishniacozyma*. *Solicoccozyma aerea* foi a espécie dominante e é tipicamente relatada em solos. A maior parte dos isolados foi capaz de crescer em altas concentrações de NaCl, demonstrando a sua adaptabilidade a condições osmofílicas e halofílicas extremas (Mokhtarnejad et al., 2016). Já para ascomicetos, foram detectados os gêneros: *Meyerozyma*, *Metschnikowia*, *Debaryomyces*, *Torulaspota* e *Candida* (Mokhtarnejad et al., 2015).

Das 21 espécies de leveduras basidiomicéticas encontradas em solos hipersalinos, apenas quatro mostraram ampla distribuição em todos os pontos amostrados, enquanto 15 foram encontradas exclusivamente em um ponto específico (Mokhtarnejad et al., 2016), confirmando que a distribuição de leveduras em solos se dá de forma desigual, tanto para abundância quanto para a riqueza de espécies.

Estudos utilizando a espécie *Debaryomyces hansenii* relatam que a capacidade de crescer em ambientes hipersalinos se dá pela acumulação de altas concentrações intracelulares de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> (González-Hernández et al., 2004; Almagro et al., 2001). Entretanto, outros mecanismos podem ser ativados, dependendo da espécie, como a via de sinalização de alta osmolaridade de glicerol, que ativa a expressão de genes resultando no acúmulo de glicerol citosólico em *Hortaea werneckii* (Petrovic et al., 2002), ou ainda a saturação lipídica com o aumento do ácido oleico e a diminuição do ácido linoleico em *Zygosaccharomyces rouxii* (Yoshikawa et al., 1995).

Leveduras também são relatadas em solos alcalinos. Alto valor de pH, alto grau de mineralização, flutuação de temperatura, congelamento e descongelamento do solo durante as estações sazonais proporcionam uma composição peculiar da microbiota do solo. Porém, a comunidade de leveduras em solos alcalinos na Ásia não apresentou uma diversidade significativa, com representantes alcalino-tolerantes de leveduras capsulares pertencentes aos gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula*. Nesses solos, não houve a detecção de leveduras ascomicéticas (Lisichkina et al., 2003), mas foi mostrada a capacidade de adaptação de leveduras basidiomicéticas a condições mais extremas. Acredita-se que a habilidade de leveduras basidiomicéticas crescerem e serem abundantes nessas condições extremas esteja relacionada à formação de cápsulas polissacarídicas que envolvem as células e mantêm a sua integridade (Raspor e Zupan, 2006).

Em solos de regiões polares, o pH e a condutividade elétrica do solo foram identificados como preditores da diversidade de leveduras, uma vez que, na região amostrada, não havia nenhum tipo de vegetação. Os gêneros *Cryptococcus* e *Leucosporidium* foram dominantes, com alguns isolados sendo potencialmente novas espécies. Os membros de ambos os gêneros são conhecidos por ser psicrófilos e, portanto, potencialmente ativos nas comunidades em que foram isolados. Além disso, as espécies de leveduras não foram distribuídas de forma randômica pelos sítios amostrados, nos quais algumas espécies foram específicas e não compartilhadas entre os pontos de amostra. As condições ambientais de cada habitat podem restringir a ocorrência de uma espécie a determinado habitat (Connell et al., 2008).

Em ambientes sem ou com pouca vegetação ou ainda dominados por vegetação rasteira, a maior incidência de radiação UV pode ser um fator ecológico importante que afeta a distribuição da comunidade de leveduras no solo, principalmente em regiões polares (Tosi et al., 2005). Dessa forma, fungos que possuem pigmentação, como *Rhodotorula mucilaginosa*, podem ter vantagens seletivas em áreas com alta incidência de luz UV (Connell et al., 2008).

As comunidades de leveduras de ambientes extremos possuem uma alta proporção de leveduras pigmentadas, principalmente dos gêneros *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Sporidiobolus* e *Sporobolomyces*.

Pigmentos carotenoides e melanina, que conferem colorações de marrom a vermelho às colônias, são importantes mecanismos de proteção utilizados pelas células, proporcionando proteção contra a radiação UV, variações de temperatura e dessecação (Raspor e Zupan, 2006).

### **Comunidade de leveduras em solos tropicais**

Como demonstrado, leveduras ocorrem em vários tipos de solo do mundo, tais como solos cultivados (Sláviková e Vadkertiová, 2003a), solos com diferentes regimes de manejo (Yurkov et al., 2012a), solos florestais (Sláviková e Vadkertiová, 2000), solos rizosféricos (Mestre et al., 2011a), solos de ambientes áridos (Toro et al., 2005) e solos de regiões polares (Connell et al., 2008).

Porém, todo o conhecimento acerca das comunidades de leveduras do solo está limitado a regiões temperadas. Na África, na América do Norte e na Ásia, os dados sobre a diversidade de leveduras ainda são escassos; já em regiões subtropicais e tropicais, como a América do Sul, são pouco amostrados e explorados. Estudos sobre a diversidade de leveduras em ambientes tropicais são raros e, quando existentes, são focalizados, sobretudo, em grupos taxonômicos de interesse clínico (Mok et al., 1984; Terçarioli et al., 2007).

Em florestas neotropicais do Panamá, do Equador e da Costa Rica, foi demonstrado que populações de leveduras dominam as comunidades fúngicas do solo, a partir de dados gerados com abordagens independentes de cultivo. Esses achados são atribuídos a condições anóxicas do solo, causadas por alta taxa de precipitação, criando condições ideais para o estabelecimento de fungos unicelulares. A predominância de leveduras indica que a liberação de carbono fixado nas florestas é resultante da fermentação anaeróbica (Dunthorn et al., 2017).

Diferentemente de florestas temperadas, nas quais basidiomicetos dominam a comunidade de leveduras (Masínová et al., 2017a), as florestas neotropicais da América Central e da América do Sul foram dominadas por ascomicetos, pertencentes ao subfilo Saccharomycotina (Dunthorn et al., 2017), cujo crescimento pode ser ajudado pelas condições anóxicas do solo, favorecendo processos fermentativos. Já em regiões

temperadas, em razão do clima frio, a taxa de decomposição é mais lenta, o que limita a disponibilidade de nutrientes e favorece a predominância de basidiomicetos.

No Brasil, foram estudadas regiões com clima tropical no estado do Amazonas, embora o conhecimento ainda seja limitado. Por sua vez, as regiões com clima subtropical seco, principalmente nos estados de Minas Gerais e do Rio de Janeiro, possuem mais relatos e são mais bem caracterizadas.

Os estudos visando à caracterização da comunidade de leveduras em solos brasileiros se iniciaram na década de 1990 com De Azeredo et al. (1998), que descreveram a comunidade de leveduras associadas a folhas, caule e rizosfera de cana-de-açúcar, no estado do Rio de Janeiro. O número de leveduras observadas apresentou um decréscimo nas folhas e um acréscimo na rizosfera durante um ciclo completo de desenvolvimento da planta, demonstrando que existe uma transferência de células microbianas das folhas para o solo mediada pela pluviosidade, resultando em um aumento na quantidade e na diversidade de leveduras nos solos.

Em solos florestais da Amazônia, Vital et al. (2002) descreveram a diversidade da comunidade de leveduras, detectando uma maior proporção de ascomicetos, com espécies do gênero *Candida* entre as dominantes, corroborando outros estudos realizados na América do Sul. No estado de Santa Catarina, Mendes et al. (2017) incluíram amostras de solos na caracterização das comunidades de leveduras em vinhedos, porém detectaram apenas duas espécies (*Saccharomyces cerevisiae* e *Meyerozyma guilliermondii*) associadas a solos. A baixa detecção de leveduras no solo nesse trabalho deve-se ao baixo esforço amostral. Yurkov et al. (2016) demonstraram que o número de espécies de leveduras observadas em amostras de solo aumentava conforme se ampliava a amostragem, até chegar à saturação; assim, fornecia-se um inventário de espécies mais próximo da realidade, potencializando a identificação de possíveis novas espécies.

Análises independentes de cultivo foram utilizadas para avaliar a dinâmica da comunidade fúngica na rizosfera e nos solos de culturas de milho no estado do Rio de Janeiro, observando uma alternância na dominância dos filos, em que ascomicetos

dominaram a comunidade rizosférica de plantas jovens e basidiomicetos foram predominantes em plantas senescentes (Figura 2) (Gomes et al., 2003).

Comunidades de leveduras presentes em solos do Cerrado, em Minas Gerais, foram caracterizadas por Carvalho et al. (2013) durante as estações seca e chuvosa. O estudo recuperou 307 isolados de leveduras identificadas em 10 gêneros, dentro dos quais detectaram espécies tipicamente pedobiontes, como *Papiliotrema laurentii* e *Trichosporon loubieri*. Além disso, alto teor de alumínio e acidez total, características típicas de solos do Cerrado, foram os atributos do solo que mais influenciaram a composição das comunidades.

A diversidade de leveduras também foi descrita em outros ecossistemas, além do Cerrado, por Moreira e Vale (2018), na região do *Quadrilátero Ferrífero*, em Minas Gerais. A dinâmica das comunidades de leveduras em ecossistemas nativos foi comparada a ecossistemas modificados por ação antrópica. Mata Atlântica, Cerrado e Campos Rupestres apresentaram uma composição de espécies similar ao ecossistema reflorestado com eucalipto, enquanto a área recuperada com gramíneas apresentou os maiores valores de riqueza. Esses achados podem indicar um importante papel ecológico das comunidades de leveduras do solo na recuperação e no estabelecimento de nova vegetação em áreas impactadas por ação antrópica, como a mineração, avaliada no estudo.

*Saitozyma podzolica*, que foi a espécie mais abundante nos ecossistemas estudados por Moreira e Vale (2018), foi detectada em diversas pesquisas sobre a diversidade de leveduras em solos florestais e cultivados sob climas tropicais e temperados (Vital et al., 2002; Sláviková e Vadkertiová, 2003a; Yurkov et al., 2012a).

## **MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE**

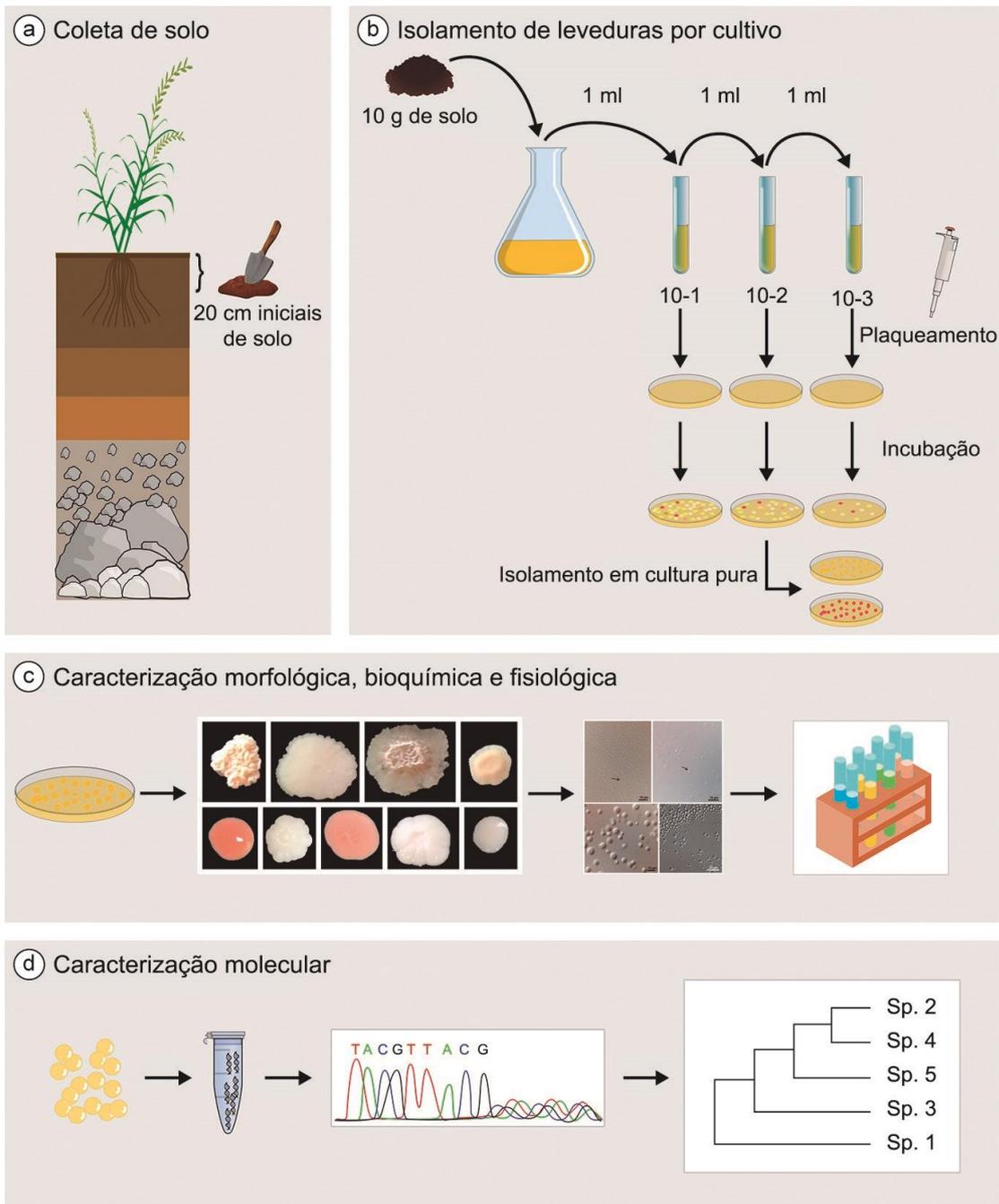
### **Isolamento e cultivo**

O levantamento sobre a diversidade de espécies de leveduras nos ambientes naturais só foi possível graças aos métodos clássicos de microbiologia. Os métodos de cultivo são relativamente baratos e fornecem informações a respeito dos

microrganismos heterotróficos ativos de determinada população, além de fornecer dados quanto à variedade de espécies presentes e aos tipos de substrato que suportam o crescimento de certas espécies. Além disso, os métodos dependentes de cultivo resultaram no isolamento de milhares de culturas puras que podem ser caracterizadas e utilizadas pelas gerações futuras (Boundy-Mills, 2006).

Métodos para cultivo, detecção e isolamento de leveduras do solo foram revisados em 1957, demonstrando que o uso do meio de cultura adequado, o pré-tratamento das amostras e as condições de cultivo favoráveis resultam em contagens de colônias elevadas e uma melhor representação da diversidade e abundância das comunidades (Di Menna, 1957).

O isolamento e a identificação de leveduras presentes em solos têm em comum a maioria das etapas envolvidas na caracterização de microrganismos, sendo elas: amostragem (geralmente os 20 cm iniciais do solo), diluição seriada, plaqueamento, incubação, enumeração, isolamento em culturas puras, identificação fenotípica (características morfológicas, testes bioquímicos e fisiológicos) e identificação molecular (Figura 4) (Dias e Schwan, 2010).



**Figura 4. Etapas da caracterização de leveduras isoladas do solo. A) Coleta dos 20 cm iniciais do solo; B) Diluição seriada das amostras e isolamento por cultivo; C) Caracterização morfológica (macro e microscópica) e testes bioquímicos e fisiológicos; D) Caracterização molecular utilizando sequenciamento de genes marcadores.**

As leveduras, como microrganismos saprófitos, requerem fontes de carbono e nitrogênio para o seu crescimento. Portanto, os meios utilizados para o isolamento e a enumeração de leveduras são geralmente complexos e nutricionalmente ricos. Os ingredientes comuns incluem uma fonte de carbono (glicose, frutose e sacarose), uma

fonte de nitrogênio (peptona e triptona) e um suplemento complexo (extrato de levedura e extrato de malte) (Quadro 3) (Boundy-Mills, 2006).

**Quadro 3. Principais meios de cultura utilizados no isolamento de leveduras do solo, composição química e espécies frequentemente isoladas.**

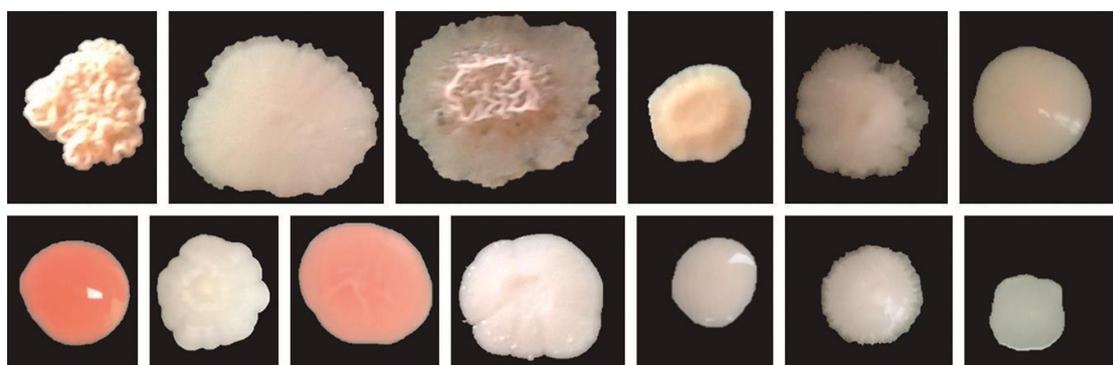
Meio de cultura	Composição	Espécies mais frequentes	Tipo de solo avaliado	Referência
Glucose agar (GA)	glicose 2%, extrato de levedura 0.3%, (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> 0.1%, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.02%, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.01%, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0.02%, NaCl 0.02%, K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.01%, agar 2%	<i>Papiliotrema laurentii</i> , <i>Candida maltosa</i> , <i>Metschnikowia pulcherrima</i> , <i>Sporobolomyces salmonicolor</i> , <i>Cystofilobasidium capitatum</i> , <i>Leucosporidium scottii</i> , <i>Rhodotorula aurantiaca</i> , <i>Trichosporon cutaneum</i>	Florestais e cultivados de clima temperado	Sláviková e Vadkertiová, 2000. Sláviková e Vadkertiová, 2003a.
Yeast Peptone Dextrose (YPD)	extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%, agar 2%	<i>Candida tetrigidarum</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida neerlandica</i> , <i>Torulaspota globosa</i> , <i>Diutina catenulata</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i> , <i>Debaryomyces vanrijiiae</i>	Florestais de clima tropical	Toro et al, 2005. Carvalho et al., 2013.
Glucose Yeast Peptone Agar (GPYA)	glicose 2%, extrato de levedura 0.5%, peptona 1%, agar 2%	<i>Trichosporon dulciturum</i> , <i>Solicoccozyma terricola</i> , <i>Apiotrichum porosum</i> , <i>Kazachstania piceae</i> , <i>Candida vartiovaarae</i> , <i>Schwanniomyces castellii</i> , <i>Cryptococcus saitoi</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Cryptococcus wieringae</i> , <i>Saitozyma podzolica</i> , <i>Solicoccozyma terricola</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Cryptococcus aerius</i> , <i>Kazachstania piceae</i> , <i>Schizoblastosporion starkeyi-henricii</i>	Florestais e cultivados de clima temperado	Yurkov et al., 2012b. Yurkov et al., 2012a. Glushakova et al., 2017.

Yeast Extract-Malt Extract agar (YM)	extrato de malte 0.3%, extrato de levedura 0.3%, peptona 0.5%, glicose 1.0%, agar 2.0%	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Candida etchellsii</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>Saitozyma podzolica</i> , <i>Papiliotrema laurentii</i> , <i>Cryptococcus albidus</i> , <i>Trichosporon cutaneum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i>	Florestais e cultivados de clima tropical	De Azeredo et al, 1998. Vital et al, 2002. Mendes et al., 2017. Moreira e Vale, 2018.
Malt Yeast Peptone agar (MYP)	extrato de malte 0.7%, extrato de levedura 0.05%, peptona 0.25%, agar 1.5%	<i>Saitozyma podzolica</i> , <i>Apiotrichum porosum</i> , <i>Cryptococcus phenolicus</i> , <i>Candida sake</i> , <i>Holtermanniella wattica</i> , <i>Saccharomyces eubayanus</i> , <i>Cystofilobasidium capitatum</i> , <i>Candida sake</i> , <i>Cryptococcus terreus</i> , <i>Candida maritima</i> , <i>Rhodotorula colostri</i> , <i>Candida maritima</i>	Florestais (Patagônia Argentina)	Mestre et al., 2011a. Mestre et al., 2014.

---

A diversidade de leveduras em solos pode ser acessada por meio da utilização de meio de cultivo contendo glicose, peptona, extrato de malte e extrato de levedura, com poucas modificações quanto à acidez e à adição de antibióticos (Sláviková e Vadkertiová, 2000, 2003a; Connell et al., 2008; Stringini et al., 2008; Pimenta et al., 2009; Yurkov et al., 2012a; Mestre et al., 2014; Moreira, 2015; Yurkov et al., 2016). Esse é um meio nutricionalmente rico que atende às necessidades nutricionais da maior parte das espécies de leveduras.

A identificação convencional de leveduras é fundamentada, principalmente, em métodos que utilizam caracteres morfológicos (aparência macroscópica das colônias, aparência microscópica da célula e modo de reprodução sexual, entre outros), testes bioquímicos e fisiológicos que incluem fermentação de diferentes fontes de açúcares, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, crescimento em diferentes temperaturas, entre outros (Kurtzman et al., 2011). Caracteres morfológicos das colônias, como aspecto, cor, forma e tamanho, são utilizados para classificar os isolados em morfotipos (Figura 5) (Dias e Schwan, 2010).



**Figura 5. Diferentes morfotipos de colônias puras de leveduras isoladas de amostras de solo.**

A morfologia celular também é analisada por meio da observação de caracteres, como a forma e o tamanho da célula; a formação ou não de pseudo-hifas (Dias e Schwan, 2010); o modo de reprodução vegetativa por brotamento (multilateral, bipolar ou unipolar), fissão ou formação de filamentos; e a forma, a estrutura e o modo de formação dos esporos sexuais (ascósporos ou teliósporos), quando presentes (Barnett et al., 2000).

Testes bioquímicos e fisiológicos envolvidos na identificação de leveduras avaliam características do metabolismo com relação à capacidade fermentativa de diversas fontes de carboidratos (mono, di e oligossacarídeos), à assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio, ao requerimento de vitaminas e outros fatores de crescimento, à resistência à ciclo-heximida e outros compostos e à produção/secreção de metabólitos (ácido acético, amido e enzimas) (Dias e Schwan, 2010).

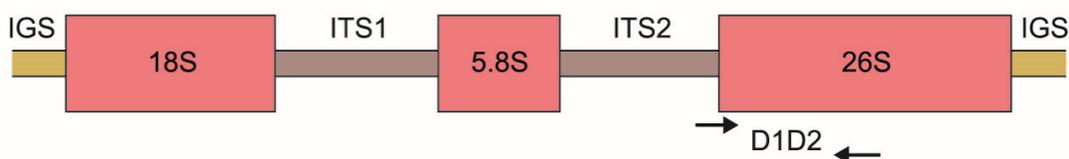
Tradicionalmente, as características fisiológicas utilizadas na taxonomia de leveduras são: a capacidade fermentativa de certos açúcares; a assimilação de diversas fontes de carbono e de nitrogênio; o crescimento sem suplementação exógena de certas vitaminas; o crescimento na presença de 50-60% de glicose; o crescimento em diferentes temperaturas; a resistência à ciclo-heximida; a produção de lipídeos; a produção de polissacarídeos; a hidrólise de ureia; e a formação de ácidos. O conjunto de características semelhantes é utilizado, principalmente, para distinção entre espécies, porém alguns gêneros também podem ser separados por alguma característica fisiológica em particular, por exemplo, as espécies do gênero *Saccharomyces* são conhecidas pela sua habilidade em fermentar D-glicose (Barnett et al., 2000).

Trabalhos recentes sobre diversidade de leveduras em ambientes naturais fizeram a identificação molecular das culturas puras isoladas a partir de amostras ambientais (Sláviková e Vadkertiová, 2000, 2003a; Connell et al., 2008; Stringini et al., 2008; Pimenta et al., 2009; Yurkov et al., 2012a; Mestre et al., 2014; Moreira, 2015; Yurkov et al., 2016). Nos casos em que há a detecção de possíveis novas espécies, as propriedades morfológicas e fisiológicas são determinadas de acordo com métodos convencionais para a identificação polifásica de espécies de leveduras (Kurtzman et al., 2011).

A identificação molecular de leveduras é feita com base no RNA ribossomal. Esse material genético tem sido bastante utilizado em estudos taxonômicos pelo fato de ser universal, ou seja, presente em todos os organismos que evoluíram de um ancestral em comum, ter várias cópias e apresentar regiões codificantes e não codificantes. Genes nucleares ou regiões diferentes do RNA ribossomal raramente são utilizados na taxonomia molecular de leveduras (Valente et al., 1999). No entanto, em alguns casos, como na separação de espécies dentro do complexo *Aureobasidium pullulans*, é

necessário o sequenciamento de genes fora do RNA ribossomal, como o gene para  $\beta$ -tubulina (TUB), o fator de elongação (EF 1 $\alpha$ ) e a elongase (ELO) (Zalar et. al., 2008).

Em leveduras, os genes ribossomais estão organizados em *clusters*, possuindo os seguimentos 18S, 5.8S e 26S, além das regiões não codantes ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e IGS (*Intergenic Spacer*), e estão presentes em várias cópias no genoma (Figura 6). Os espaços internos transcritos (ITS) se intercalam entre esses genes e são denominados ITS1 e ITS2 (Barnett et al., 2000). O gene 26S tem sido utilizado para discriminar em níveis de gênero e espécie, enquanto a região ITS tem sido utilizada para separar espécies próximas e/ou subespécies; por fim, a região IGS discrimina subespécies e até estirpes quando combinada com análises utilizando enzimas de restrição (Valente et al., 1999).



**Figura 6. Esquematização da estrutura e da organização dos genes e dos espaços internos e intergênicos do RNA ribossomal de leveduras.**

A sequência de nucleotídeos do domínio D1/D2 do gene 26S do RNA ribossomal (Figura 6) possui variação suficiente para identificar quase todas as espécies conhecidas de leveduras ascomicéticas e basidiomicéticas (Kurtzman e Robenett, 1998), embora, para algumas espécies basidiomicéticas, seja necessário sequenciar também as regiões ITS do RNA ribossomal (Fell et al., 2000). Em geral, estirpes da mesma espécie apresentam no máximo três nucleotídeos diferentes (de 0 a 0,05%) nas sequências do 26S, enquanto espécies diferentes apresentam seis ou mais substituições em bases nucleotídicas (1%), exceto em alguns grupos de leveduras basidiomicéticas (Kurtzman e Fell, 2006), o que auxilia na identificação de novas espécies em amostras ambientais.

Entretanto, os métodos dependentes de cultivo têm limitações. Muitas espécies de leveduras possuem colônias morfológicamente indistinguíveis ou uma mesma espécie pode exibir dois ou mais tipos morfológicos, dependendo das condições de cultivo, o que pode levar a erros na determinação da abundância relativa de espécies.

Além disso, os meios de cultura não fornecem as condições de crescimento ideais para todas as espécies de leveduras presentes na amostra, e o crescimento em placa favorece as espécies que crescem mais rapidamente. Em conjunto, essas limitações podem influenciar a aparente diversidade da comunidade microbiana que está sendo analisada (Boundy-Mills, 2006). Portanto, para tentar alcançar a diversidade real em determinada amostra, faz-se necessário acoplar diferentes métodos de acesso à diversidade.

### **Abordagens independentes de cultivo**

Grande parte do conhecimento sobre a ecologia de leveduras foi adquirida por meio de métodos de enumeração e detecção dependentes de cultivo. Contudo, as restrições inerentes aos métodos dependentes de cultivo limitam o seu progresso à compreensão da ecologia de leveduras em ambientes naturais. Técnicas independentes de cultivo podem fornecer novos *insights* a respeito da distribuição e da ecologia de leveduras (Boundy-Mills, 2006). A análise genômica de amostras ambientais complexas, fundamentadas nas novas tecnologias de sequenciamento, está se tornando uma ferramenta importante para a compreensão da história evolutiva e da biodiversidade funcional e ecológica.

A maioria desses estudos procura responder a questões sobre alterações em determinado ambiente. Por meio do uso de quantidades maciças de dados de sequências produzidos pelas plataformas de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS), tem sido possível observar as ligeiras mudanças na estrutura das comunidades microbianas que ocorrem por causa das modificações antrópicas ou naturais do ambiente (Shokralla et al., 2012).

A análise do DNA proveniente de amostras ambientais, por meio do uso de marcadores genéticos específicos (*DNA barcode*), é uma das possíveis aplicações das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) em pesquisas de ecologia microbiana (Shokralla et al., 2012).

O marcador genético ideal para estudos da comunidade fúngica em ambientes naturais deve ser compartilhado por todas ou pela maior parte das espécies de fungos; gerar um fragmento com tamanho adequado para amplificação e sequenciamento eficientes; ter alta variação interespecífica e baixa variação intraespecífica; e gerar

sequências passíveis de alinhamento para todas as espécies. Porém, nenhum marcador conhecido atende a todos esses requisitos. No entanto, os genes e os espaçadores do RNA ribossomal vêm sendo os marcadores genéticos mais utilizados para a identificação taxonômica e as análises filogenéticas de microrganismos (Lindahl et al., 2013).

Alguns marcadores genéticos e plataformas de sequenciamento são empregados na análise da biodiversidade de diferentes grupos de microrganismo em amostras ambientais, como a região V3-V4 do gene 16S para bactérias e arqueias, a região ITS2 para fungos com a plataforma Illumina MiSeq (Frey et al., 2016; Hong et al., 2016) e a região ITS1 com a plataforma 454 Roche (Buée et al., 2014).

Para fungos, o espaço interno transcrito (ITS), região localizada entre os genes ribossômicos 18S e 28S, é amplamente aceito como DNA *barcode*, pois é aplicável para a identificação de uma ampla gama de fungos, sendo bem-sucedido em discriminar espécies por causa da variação inter e intraespecífica e da boa resolução como marcador filogenético (Schoch et al., 2012). A região ITS é composta de dois espaçadores altamente variáveis, ITS1 e ITS2, que intercalam o gene 5.8S. Esse conjunto de genes do RNA ribossomal está presente em muitas cópias no genoma, facilitando a amplificação efetiva dessa região (Lindahl et al., 2013).

Muitos trabalhos vêm desenhando iniciadores específicos para amplificação da região ITS em fungos a partir do DNA total de amostras ambientais, buscando alcançar uma maior resolução nos dados gerados e diminuir erros relacionados à amplificação por PCR (reação em cadeia de polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), o que pode refletir na análise de diversidade (Martin e Rygiewicz, 2005; Ihrmark et al., 2012; Toju et al., 2012; Bokulich e Mills, 2013), bem como buscando desenvolver iniciadores para quantificar a abundância de fungos nos solos a partir do DNA total utilizando PCR em tempo real (Prévost-Bouré et al., 2011).

Entre as plataformas atualmente utilizadas para sequenciamento de fragmentos gerados a partir do DNA total de amostras ambientais, a Illumina vem se destacando nas análises das comunidades fúngicas, com plataformas, como o MiSeq, que permitem

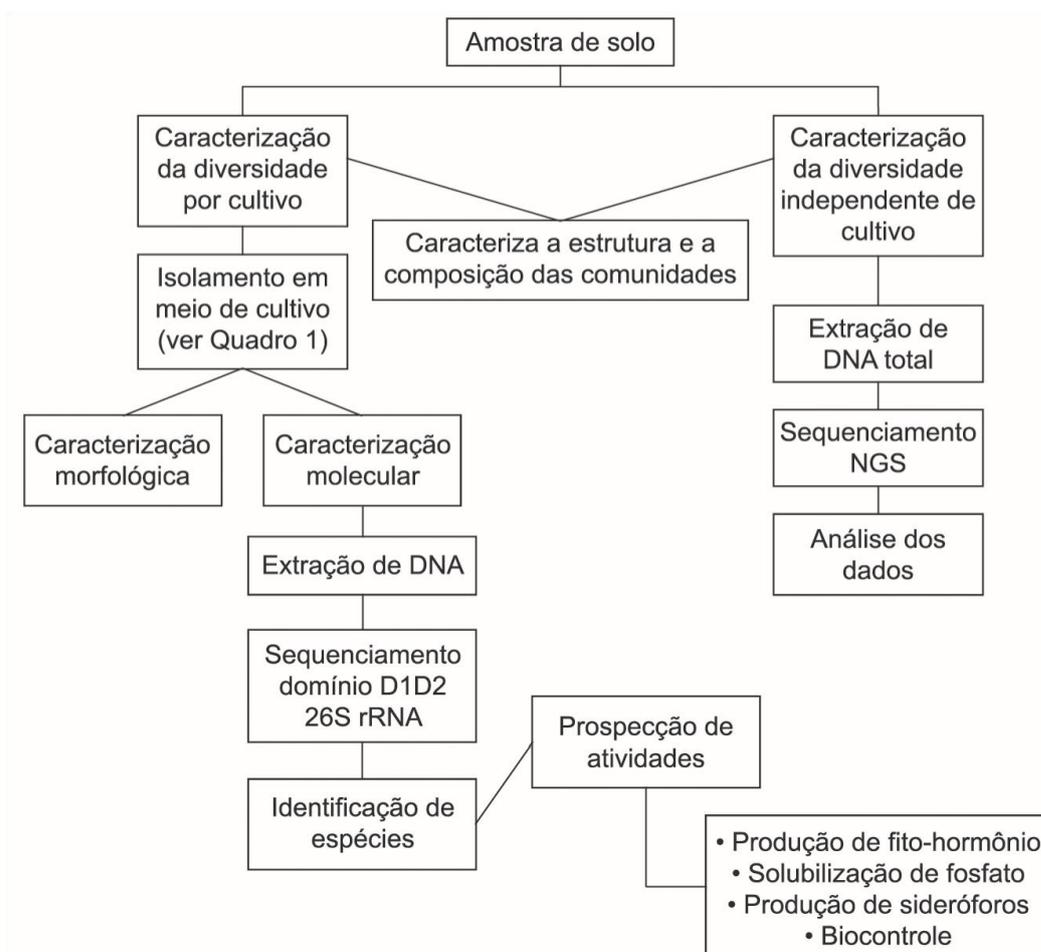
sequenciar fragmentos maiores, ideais para a identificação de fungos (Lindahl et al., 2013).

Utilizando a plataforma de sequenciamento Illumina MiSeq e PCR em tempo real, Siles e Margesin (2016) avaliaram a diversidade e a abundância das comunidades de bactérias, arqueias e fungos em um gradiente altitudinal de solos florestais. Uma quantidade massiva de dados foi gerada, permitindo concluir que a variação de espécies predominantes nesses grupos foi resultado das condições ambientais somadas às características físico-químicas dos solos de cada ponto coletado. Além disso, a estrutura da comunidade fúngica foi positiva e significativamente correlacionada com todos os fatores ambientais e atributos dos solos avaliados, sendo que os atributos que mais determinaram a variação nessa comunidade foram a razão C/N, a altitude e a média anual da temperatura do ar e do solo (Siles e Margesin, 2016).

Por meio da técnica de pirosequenciamento pela plataforma 454 da Roche, Buée et al. (2014) avaliaram a diversidade de fungos em solos florestais utilizando o marcador genético ITS1, o que permitiu a detecção das espécies de leveduras *Saitozyma podzolica* e *Solicoccozyma terricola* como as predominantes entre as espécies de fungos. Porém, estudos focalizando apenas a diversidade de leveduras, dentro do reino Fungi, nos solos ainda são escassos.

Recentemente, Masínová et al. (2017a) publicaram o primeiro trabalho com foco apenas nos fatores que determinam a composição da comunidade de leveduras em solos florestais na Europa, empregando o sequenciamento de fragmentos pela plataforma Illumina MiSeq. Com base nas análises dos dados gerados pelo sequenciamento utilizando a região ITS2, Masínová et al. (2017a) demonstraram que as leveduras representam uma proporção da comunidade fúngica dos solos, variando de 0,4 a 14,3% de sequências representativas de leveduras dentro da comunidade fúngica. Além disso, as leveduras basidiomicéticas dominaram sobre as ascomicéticas, o que corrobora dados encontrados em trabalhos que utilizaram apenas métodos de cultivo, como o de Yurkov et al. (2012b). Os fatores que moldam a composição da comunidade de leveduras nos solos são complexos e compreendem os efeitos das condições ambientais associados às características da vegetação e dos solos.

O uso de ferramentas de NGS, associado ao isolamento de leveduras por cultivo, pode ajudar a esclarecer como essa comunidade de microrganismos se comporta nos solos e como os fatores ambientais influenciam a sua distribuição. A Figura 7 mostra uma proposta de fluxograma de trabalho realizado no Laboratório de Micologia, do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília (UnB), para uma completa caracterização da comunidade de leveduras nos solos, unindo as duas metodologias mencionadas.



**Figura 7. Fluxograma de trabalho para a caracterização das comunidades de leveduras, utilizado no Laboratório de Micologia da Universidade de Brasília.**

## LEVEDURAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE

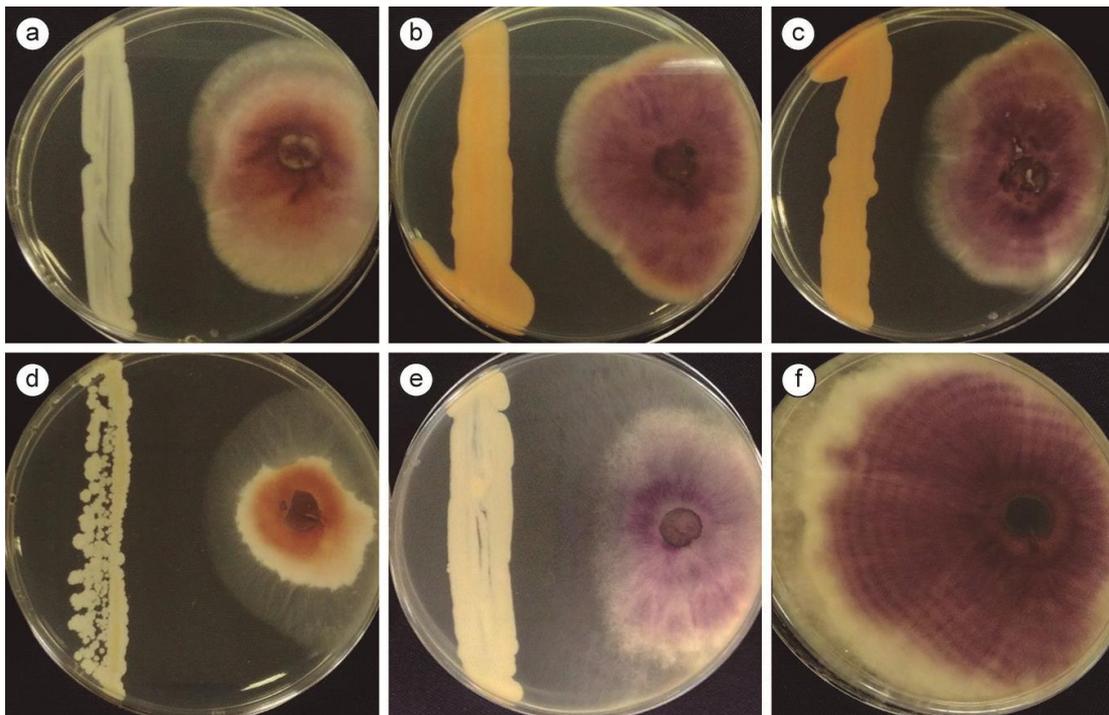
Entre os microrganismos, as leveduras do solo têm recebido pouca atenção como agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos em comparação aos já reconhecidos

pela atividade antagônica, como bactérias, actinomicetos e fungos filamentosos. A habilidade de certas taxas de leveduras em se multiplicar rapidamente, produzir antibióticos e enzimas que degradam a parede celular, induzir a resistência de tecidos hospedeiros e produzir reguladores do crescimento vegetal indica o seu potencial a ser explorado como agentes de biocontrole e promotoras do crescimento vegetal (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006).

Os métodos de controle biológicos constituem alternativas viáveis em relação aos químicos tradicionais, principalmente por não deixarem resíduos químicos nos alimentos (Gasperini et al., 2011). Leveduras do solo, especialmente aquelas provenientes de solos cultivados e de solos rizosféricos, são capazes de produzir substâncias que promovem o crescimento de fungos micorrízicos e de plantas, bem como compostos que protegem plantas contra doenças causadas por fungos patogênicos (Vadkertiová et al., 2017).

Os principais mecanismos de controle biológico, inclusive por leveduras, incluem a antibiose; o micoparasitismo; a indução de resistência a espaço e nutrientes e a competição por eles (Janisiewicz et al., 2000); a produção de enzimas que degradam a parede celular, como a  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase (Urquhart e Punja, 2002); a produção de substâncias antifúngicas e metabólitos voláteis (Masih et al., 2001); e a produção de substâncias extracelulares, conhecidas por seu caráter *killer* (Gasperini et al., 2011).

A detecção de atividade antagônica pode ser feita por meio do pareamento de colônias em placas com ágar utilizando diferentes substratos e medindo as zonas de inibição (Figura 8); mediante triagem dos filtrados de cultura para inibição do crescimento vegetativo e germinação de esporos de patógenos fúngicos *in vitro*; ou ainda por intermédio de utilização de frutos e/ou folhas artificialmente feridos e coinoculados com os antagonistas e os patógenos (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006).



**Figura 8. Inibição in vitro do crescimento do patógeno do solo *Fusarium oxysporum*, causador de doenças em raízes de plantas, por meio do uso de estirpes de leveduras em placas com meio BDA crescidas durante sete dias. A) *Candida glabrata*; B) e C) *Rhodotorula mucilaginosa*; D) *Wickerhamomyces anomalus*; E) *Papiliotrema laurentii*; F) Controle.**

A importância das leveduras no controle biológico fundamenta-se nas características atóxicas, cuja utilização direta em produtos alimentícios não traria riscos à saúde dos consumidores. As leveduras em geral possuem exigências nutritivas simples e podem colonizar superfícies secas por períodos longos. Utilizam rapidamente nutrientes disponíveis, sendo capazes de crescer em várias fontes de carbono, além de fornecer grande quantidade de biomassa em tempo muito pequeno (Gasparini et al., 2011). Ao contrário dos fungos filamentosos, leveduras não produzem esporos alergênicos ou micotoxinas, reforçando suas características vantajosas para uso, principalmente, no controle de patógenos de pós-colheita (Aloui et al., 2015).

Entretanto, o sucesso da levedura como agente de biocontrole depende não somente do mecanismo de ação utilizado, mas também da sua habilidade em competir e persistir no ambiente em que foi aplicado. A sua capacidade metabólica e as suas necessidades nutricionais podem afetar fortemente o resultado das interações

antagônicas mediadoras do controle biológico de fungos patogênicos de plantas (Gross et al., 2018).

Leveduras isoladas de diversos habitats, incluindo o solo, têm sido testadas quanto à sua capacidade de controlar doenças causadas por fungos fitopatogênicos, principalmente patógenos de pós-colheita. Linhagens de *Aureobasidium* sp., isoladas de folhas e frutos de plantas nativas do Cerrado, foram eficientes no controle do bolor verde dos citros, causado por *Penicillium digitatum* (Sperandio et al., 2015). A aplicação em conjunto das leveduras antagonistas *Candida guilliermondii* e *Pichia membranifaciens* se mostrou eficiente no controle do patógeno *Botrytis cinerea* em frutos de tomate, em casos de infecções pós-colheita (Zong et al., 2010).

Um trabalho experimental realizado por Piccinin et al. (2005) demonstrou que aplicações semanais da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em campo de sorgo (*Sorghum bicolor*) reduziram a velocidade de progresso da antracnose em magnitude semelhante ao tratamento com fungicida, comprovando que o uso de leveduras no biocontrole de fungos fitopatogênicos pode ser uma alternativa ao uso de fungicidas ou ainda contribuir para o controle integrado de doenças de plantas.

A capacidade de leveduras isoladas de uvas em controlar o crescimento do fitopatógeno *Botrytis cinerea* foi avaliada por Nally et al. (2012), encontrando potencial antagônico em cepas das espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* nos testes *in vivo*. A competição por nutrientes foi o principal mecanismo utilizado por *Kloeckera apiculata* para controlar o crescimento do fungo *Penicillium italicum*, agente causal do mofo azul em citros (Liu et al., 2013).

O sucesso no uso de leveduras para o biocontrole de patógenos de pós-colheita muitas vezes é atribuído ao fato de que a comunidade de leveduras é predominante na superfície de folhas e em outras partes aéreas das plantas, o que as torna efetivas no biocontrole por já estarem naturalmente adaptadas àquele nicho ecológico. Dessa forma, são mais hábeis em crescer e colonizar rapidamente o substrato e podem competir de forma eficiente por espaço e nutrientes (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006).

A competição por espaço e nutrientes foi o principal mecanismo utilizado por isolados de *Metschnikowia pulcherrima* contra os patógenos de pós-colheita *Botrytis*

*cinerea* e *Penicillium expansum* (Spadaro et al., 2002), em razão do rápido crescimento e da colonização do fruto. Utilizando a solução de leveduras contra os patógenos, a solução de leveduras filtrada (sem as células de leveduras) e a solução de leveduras autoclavada (células mortas), Spadaro et al. (2002) demonstraram a necessidade das células vivas para garantir o antagonismo e o controle do crescimento fúngico, uma vez que apenas o tratamento com a solução de leveduras vivas apresentou eficiência no controle dos patógenos. A atividade antagônica de *M. pulcherrima* também foi dependente da concentração do antagonista: quando aplicada a solução de leveduras a  $10^6$  células/ml, a levedura não apresentou níveis satisfatórios de controle do patógeno.

Algumas espécies de leveduras, principalmente aqueles presentes em frutos e superfície foliar, podem utilizar a antibiose como mecanismo de controle do crescimento de patógenos por meio da produção de antibióticos e antifúngicos (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006). Compostos antimicrobianos produzidos por leveduras, conhecidos por “*killer toxins*”, têm demonstrado potencial de inibição do crescimento de patógenos. Estudos focalizando o isolamento, a caracterização e a purificação dessas toxinas podem se tornar um dos mais promissores ramos de pesquisa no controle biológico de fungos patógenos (Mehlomakulu et al., 2014).

Leveduras que exibem o fenótipo “*killer*”, como a espécie *Wickerhamomyces anomalus*, são hábeis no controle de doenças pós-colheita em frutos por causa de sua habilidade de secretar toxinas proteicas extracelulares. Essas proteínas inibem o crescimento de outras espécies de leveduras, fungos filamentosos e bactérias patogênicas, utilizando diferentes mecanismos, como a hidrólise da parede celular e/ou a inibição da síntese de DNA (Aloui et al., 2015).

Na última década, diversos trabalhos têm demonstrado a eficácia de leveduras, as quais apresentam o fenótipo *killer*, como agentes de biocontrole de patógenos. *Debaryomyces hansenii* e *Wickerhamomyces anomalus* demonstraram atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* contra os patógenos *Monilinia fructigena* e *M. fructicola*, nos quais a produção de enzimas hidrolíticas, de toxinas *killer* e de compostos orgânicos voláteis foram os principais mecanismos utilizados (Grzegorzcyk et al., 2017). *Torulaspota globosa* e *Candida intermedia*, isoladas da rizosfera de culturas de milho e cana-de-açúcar, apresentaram atividade antagônica contra os patógenos *Colletotrichum*

*sublineolum* e *C. graminicola*, por meio da produção de toxinas *killer* (Rosa-Magri et al., 2011). Diversas espécies de leveduras isoladas de diferentes microambientes apresentaram atividade antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides*, utilizando como mecanismos de ação a competitividade por espaço e nutrientes, a sobreposição de nicho, a dominância sobre o patógeno, a redução do crescimento do fungo e a produção de metabólitos antifúngicos (Pesce et al., 2018).

Leveduras que produzem toxinas *killer* também são aplicadas com o objetivo de inibir o crescimento de outras espécies de leveduras que causam a deterioração de vinhos. Toxinas *killer* isoladas de *Candida pyralidae* mostraram potencial para controlar a população de várias estirpes de *Brettanomyces bruxellensis* em condições similares às aquelas encontradas durante o processo de vinificação, em que as toxinas não foram afetadas por parâmetros semelhantes, como baixo pH, temperatura abaixo de 25 °C e altas concentrações de açúcar e etanol (Mehlomakulu et al., 2014). *Wickerhamomyces anomalus* também apresentou potencial como agente de biocontrole em processos de vinificação contra diversas espécies de leveduras que causam a deterioração do vinho, como *Pichia guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *Brettanomyces bruxellensis* e *Dekkera anomala* (Fernández-Ullivarri et al., 2018).

Leveduras também têm sido aplicadas no biocontrole de doenças bacterianas em plantas. Estirpes de *Pichia anomala* mostraram potencial de biocontrole sobre a bactéria *Acidovorax avenae*, causadora da mancha bacteriana de frutos, doença grave que acomete frutos de melão, agindo na redução da incidência e na severidade da doença por meio da produção de compostos ácidos que diminuem o pH do meio e aumentam a atividade antibiótica e a eficácia do biocontrole (Wang et al., 2009).

Outro mecanismo de ação utilizado por bactérias e recentemente detectado em leveduras, especialmente em espécies do gênero *Rhodotorula*, fundamenta-se na produção de sideróforos, que são compostos orgânicos que atuam como agentes quelantes de alta afinidade e baixo peso molecular, com o objetivo de solubilizar o ferro do ambiente e transportá-lo para o interior da célula (Ahmed e Holmström, 2014). Sideróforos produzidos por estirpes de *Rhodotorula* aumentaram a eficácia antagônica contra o patógeno *Botrytis cinerea*, sequestrando o ferro e, assim, inibindo a germinação

do esporo, o crescimento do micélio e/ou a sua atividade metabólica (Calvente et al., 2001a).

Produção de enzimas que degradam a parede celular de patógenos também é um importante mecanismo utilizado por leveduras. A produção de quitinases e de  $\beta$ -1,3-glucanases tem sido relatada nas espécies *Pichia anomala*, *P. membranifaciens*, *Rhodotorula glutinis*, *Papiliotrema laurentii*, *Aureobasidium pullulans*, *Tilletiopsis albescens* e *T. pallescens* (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006). O micoparasitismo, por meio da adesão tenaz e da fixação de células de leveduras a esporos e hifas de patógenos fúngicos, também tem sido observado como mecanismo de ação no biocontrole (Spadaro et al., 2002).

A ativação de resistência do hospedeiro tem sido recentemente relatada em algumas espécies de leveduras. Aplicações de *Candida oleophila* induz a resistência de plantas contra *Penicillium digitatum*, o principal patógeno de pós-colheita de citros, por meio do aumento da biossíntese de etileno, da atividade de fenilalanina amônia-liase, do acúmulo de fitoalexinas e do aumento dos níveis das enzimas quitinase e  $\beta$ -1,3-endoglucanase (Droby et al., 2002). *Yarrowia lipolytica* induziu a resistência em frutos de uva contra o patógeno de pós-colheita *Penicillium rubens*, por meio do aumento da produção de enzimas relacionadas aos mecanismos de defesa da planta, como *polifenoloxidase*, *peroxidase*, *catalase*, *fenilalanina amônia-liase*, *ascorbato peroxidase* e  $\beta$ -1,3-glucanase (Wang et al., 2018).

A espécie *Meyerozyma caribbica* mostrou um alto potencial antagônico *in vivo* com significativa inibição da antracnose em manga, causada pelo patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. A competição por nutrientes, semelhante à sacarose e à frutose, foi um dos principais mecanismos utilizados pela levedura, embora também tenha mostrado competição por espaço, parasitismo e produção de enzimas hidrolíticas parecidas com quitinases, N-acetil- $\beta$ D-glucosaminidases e  $\beta$ -1,3-glucanases (Bautista-Rosales et al., 2013). A combinação de diferentes mecanismos de ação utilizados pela espécie de levedura aumenta a sua capacidade de controlar o patógeno.

Embora haja muitos trabalhos sobre a aplicação de leveduras para o controle biológico de fungos patogênicos, a grande maioria deles é voltada ao controle de

patógenos de pós-colheita em frutos e vegetais ou ao controle de doenças foliares. Até o momento, são poucos os estudos testando e/ou aplicando leveduras para o controle de patógenos de plantas do solo.

Isolados de *Candida valida*, *Rhodotorula glutinis* e *Trichosporon asahii* foram capazes de colonizar raízes de beterraba, promover o crescimento e proteger as plântulas e as plantas maduras contra o patógeno *Rhizoctonia solani*, agente causal da podridão radicular (El-Tarabily, 2004). As espécies de levedura mostraram diferentes mecanismos no combate ao patógeno: *Candida valida* mostrou habilidade de produzir a enzima  $\beta$ -1,3-glucanase; *Rhodotorula glutinis* produziu compostos inibitórios voláteis; e *Trichosporon asahii* produziu metabólitos antifúngicos capazes de inibir o crescimento de *Rhizoctonia solani*. A aplicação combinada das três leveduras resultou em um significativo aumento no controle do patógeno e na promoção do crescimento de plântulas de beterraba (El-Tarabily, 2004).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi testada quanto à sua capacidade de controlar o fungo *Fusarium oxysporum* e de promover o crescimento vegetal de beterraba, verificando-se um aumento na taxa de germinação de até 85% nas sementes tratadas com a levedura e uma atividade antifúngica de até 58% contra o fitopatógeno *F. oxysporum* (Shalaby e El-Nady, 2008).

Duas espécies de leveduras isoladas da rizosfera, *Saccharomyces unispora* e *Candida steatolytica*, tiveram efeito antagonista e inibitório contra o fungo patógeno do solo *Fusarium oxysporum*, reduzindo significativamente a incidência do murchamento do feijão, causada por esse fungo, por meio da produção de metabólitos antifúngicos (El-Mehalawy et al., 2004). *Candida glabrata*, *C. maltosa*, *C. slooffii*, *Trichosporon cutaneum* e *Rhodotorula rubra*, isoladas da rizosfera de milho, reduziram, de maneira significativa, o crescimento do patógeno *Cephalosporium maydis*, agente causal da murcha tardia do milho, por meio da produção de metabólitos antifúngicos e de enzimas que degradam a parede celular, incluindo quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase (El-Mehalawy et al., 2004). A espécie *Cyberlindnera sargentensis*, isolada do solo, demonstrou uma maior competitividade e eficácia antagônica contra patógenos de plantas em solos, quando aplicada em uma mistura de várias espécies de leveduras, caracterizando-a como promissora para formulações em biofertilizantes (Gross et al., 2018).

A aplicação de uma mistura de antagonistas aumenta a eficácia do biocontrole em comparação com a aplicação de antagonistas isolados. Essas misturas de antagonistas aumentam o espectro de ação, a eficácia e a confiabilidade da supressão da doença sem a necessidade de melhoramento genético das cepas utilizadas (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006). Os modos de ação e as capacidades metabólicas de diferentes espécies podem complementar-se mutuamente e, assim, de forma sinérgica, levar a uma melhor eficácia do controle biológico, quando utilizados conjuntamente em comparação com isolados individuais (Gross et al., 2018).

Esses trabalhos são alguns dos poucos relatos do uso e da eficiência de leveduras, isoladas da rizosfera, como agentes de biocontrole contra fungos patogênicos causadores de doenças radiculares no solo. Eles demonstram a lacuna existente e a gama de possibilidades a ser exploradas com leveduras isoladas de solos em habitats naturais e a consequente triagem das suas capacidades ecológicas e aplicações como agentes de biocontrole e em formulações de biofertilizantes, em razão de suas capacidades como promotoras do crescimento vegetal.

## **LEVEDURAS COMO AGENTES DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL**

A rizosfera pode ser definida como a zona do solo ao redor das raízes das plantas, em que as propriedades do solo são influenciadas pela presença e pela atividade da raiz. Alterações nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo rizosférico têm influência significativa no crescimento e na saúde das plantas. Além disso, as raízes interagem com diversas populações de microrganismos do solo que trazem implicações significativas para o seu crescimento e sua nutrição (Richardson et al., 2009).

A rizosfera das plantas é habitat para uma enorme diversidade de microrganismos, muitos dos quais interagem mutualisticamente com as raízes (Amprayn et al., 2012). Entre esses organismos mutualísticos estão os microrganismos capazes de promover o crescimento de plantas por mecanismos diretos, como a suplementação nutricional, a fixação de nitrogênio e a produção de fito-hormônios (auxinas e giberelinas), e por mecanismos indiretos, como a produção de metabólitos

semelhantes aos sideróforos e a atividade antifúngica, o que leva ao crescimento da planta por diminuir a atividade de patógenos ou microrganismos deletérios (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006; Nutaratat et al., 2014).

As interações entre raízes de plantas e microrganismos do solo estão onipresentes em vários níveis tróficos e são um componente essencial da função do ecossistema. As interações microbianas com raízes podem envolver microrganismos endofíticos ou de vida livre e podem ser de natureza simbiótica, associativa ou casual. As associações microbianas com raízes são complexas e podem aumentar a capacidade das plantas de adquirir nutrientes do solo por meio de vários mecanismos (Richardson et al., 2009).

Muitos estudos têm mostrado que os microrganismos podem estimular significativamente o crescimento, o desenvolvimento e o metabolismo de plantas. Isso se deve à sua capacidade de produzir substâncias estimulantes do crescimento e substâncias com ação de antibiose contra patógenos, levando à imunização das plantas e aumentando a absorção de nutrientes pelas raízes (Ignatova et al., 2013). Muitos trabalhos envolvendo espécies de leveduras do solo e de outras fontes de isolamento demonstram a capacidade delas como promotoras do crescimento vegetal (*Plant Growth Promoters* - PGP) (Quadro 4). Os microrganismos PGP representam uma ampla diversidade de bactérias e fungos que tipicamente colonizam a rizosfera e são capazes de estimular o crescimento das plantas por meio de um efeito “biofertilizante” (direto) ou por mecanismos de “biocontrole” (efeito indireto) (Richardson et al., 2009).

**Quadro 4. Principais espécies de leveduras que apresentam características de promotoras do crescimento vegetal (*Plant Growth Promoters* - PGP).**

Atividades de PGP	Espécies	Referência
Produção de AIA	<i>Candida maltosa</i>	
	<i>Candida parapsilosis</i>	
	<i>Candida glabrata</i>	
	<i>Candida middelhoveniana</i>	
	<i>Candida rugosa</i>	
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Nassar et al., 2005.
	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Xin et al., 2009.
	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Limtong e
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	Koowadjanakul,
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2012.
	<i>Rhodotorula graminis</i>	Amprayn et al.,
	<i>Williopsis saturnus</i>	2012.
	<i>Candida tropicalis</i>	Mukherjee e Sen,
	<i>Cyberlindnera subsufficiens</i>	2014.
	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	Nutaratat et al.,
	<i>Hannaella sinensis</i>	2014.
	<i>Cryptococcus flavu</i>	Morsy, 2016.
	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	Jaiboon et al., 2016.
	<i>Torulaspora globosa</i>	Fu et al., 2016.
<i>Aureobasidium pullulans</i>		
<i>Hanseniaspora uvarum</i>		
<i>Barnettozyma californica</i>		
<i>Pseudozyma aphidis</i>		
Solubilização de fosfato	<i>Candida middelhoveniana</i>	
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Al-Falih, 2005.
	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Amprayn et al.,
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2012.
	<i>Candida tropicalis</i>	Nakayan, 2013.
	<i>Geotrichum capitatum</i>	Mukherjee, 2014.
	<i>Geotrichum candidum</i>	Nutaratat et al.,
	<i>Rhodotorula minuta</i>	2014.
	<i>Rhodotorula rubra</i>	Morsy, 2016.
	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	Fu et al., 2016.
<i>Torulaspora globosa</i>	Sarabia et al., 2017.	
<i>Candida railenensis</i>		

Biocontrole de patógenos de plantas	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	El-Tarabily, 2004.
	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Liu et al., 2013.
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Vero et al., 2011.
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Papon et al., 2013.
	<i>Leucosporidium scottii</i>	Bautista-Rosales et al., 2013.
	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	Nutaratat et al., 2014.
	<i>Torulaspora globosa</i>	Nutaratat et al., 2014.
	<i>Candida valida</i>	Fu et al., 2016.
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Corbaçi e Uçar, 2017.
	<i>Barnettozyma californica</i>	2017.
Produção de proteases	<i>Schwanniomyces polymorphus</i>	Santos, 2015.
Atividade ACC deaminase	<i>Candida tropicalis</i>	Amprayn et al., 2012.
Síntese de poliaminas	<i>Candida tropicalis</i>	Cloete et al., 2009.
	<i>Torulaspora globosa</i>	Amprayn et al., 2012.
	<i>Pseudozyma rugulosa</i>	Nutaratat et al., 2014.
	<i>Pseudozyma antarctica</i>	2014.
Solubilização de Zinco	<i>Candida tropicalis</i>	Mukherjee e Sen, 2014.
	<i>Torulaspora globosa</i>	Nutaratat et al., 2014.
Produção de sideróforos	<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	
	<i>Pseudozyma rugulosa</i>	
	<i>Pseudozyma antarctica</i>	Nutaratat et al., 2014.
	<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	2014.
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Fu et al., 2016.
	<i>Pseudozyma aphidis</i>	
	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	

Estudos pioneiros sugeriram que as leveduras do solo poderiam ser utilizadas como inoculantes para estimular processos benéficos semelhantes à oxidação de enxofre e à solubilização de fosfatos nos solos (Falih e Wainwright, 1995; El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006). Por exemplo, solos inoculados com a levedura *Yarrowia lipolytica* aumentaram em número e taxa de colonização de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (Medina et al., 2004).

Uma das principais vias utilizadas por espécies de leveduras para promover o crescimento vegetal é por intermédio da produção de hormônios vegetais, como auxinas, giberelinas, citocininas e etileno. Esses hormônios podem ser sintetizados pelas plantas e também pelos microrganismos associados a elas (Berg, 2009). As auxinas são uma classe de hormônios vegetais conhecida por estimular respostas rápidas e a longo

prazo nas plantas, por exemplo, aumento na alongação celular, na divisão e na diferenciação celular (Nassar et al., 2005).

Diversos microrganismos do solo são capazes de produzir quantidades fisiologicamente ativas de auxinas, as quais têm efeitos pronunciados sobre o crescimento e o desenvolvimento de plantas, utilizando o aminoácido L-triptofano (L-TRP) como precursor fisiológico da biossíntese (Nassar et al., 2005). A espécie *Candida tropicalis* HY (CtHY), isolada do solo, foi capaz de promover o crescimento de plântulas de arroz, aumentando seu crescimento em até 35%, quando comparada com plântulas não inoculadas, por causa da capacidade da levedura em produzir ácido indol acético (AIA), um hormônio vegetal da classe das auxinas (Amprayn et al., 2012).

Leveduras isoladas da filosfera de *Drosera indica* produziram AIA, em concentrações variando de 32,6 a 147,4 µg/ml, quando cultivadas em meio de cultura suplementado com 0,1% de L-triptofano. Algumas espécies apresentaram uma via de produção de AIA independente de L-triptofano como precursor, ao realizar ensaios na ausência desse aminoácido. Além disso, estirpes de uma mesma espécie exibiram diferentes capacidades de produção de AIA, indicando que a produção desse fitohormônio em leveduras é estirpe dependente (Sun et al., 2014).

Estirpes de *Candida maltosa*, isoladas do filoplano de várias espécies de plantas da Tailândia, produziram altas concentrações de AIA (até 314,3 mg/l), quando cultivadas em meio de cultura suplementado com 0,1% de L-triptofano (Limtong e Koowadjanakul, 2012), sendo mais alto do que o já detectado em outras espécies, como *Williopsis saturnus* (22,5 mg/l) (Nassar et al., 2005). Já a inoculação de solo com as espécies *Candida valida*, *Rhodotorula glutinis* e *Trichosporon asahii*, em combinação ou isoladas, promoveu o crescimento de beterraba, comprovado pelo aumento da raiz e do caule por meio da produção de AIA, giberelinas e outras substâncias promotoras do crescimento vegetal (El-Tarabily, 2004).

A espécie *Williopsis saturnus*, endofítica em raízes de milho, mostrou habilidade em produzir AIA e ácido indol pirúvico (IPYA) *in vitro*. Sua introdução em mudas de milho aumentou significativamente o crescimento de plantas adultas cultivadas em solos com e sem L-triptofano, evidenciado pelo aumento do peso seco, pelo comprimento das

raízes e da parte aérea da planta e pelo aumento dos níveis de AIA e IPYA nas plantas (Nassar et al., 2005).

Vários outros trabalhos têm verificado a habilidade de leveduras isoladas de habitats naturais em produzir AIA, como leveduras isoladas de turfa em florestas tropicais (Jaiboon et al., 2016), leveduras isoladas de caules de árvores do gênero *Populus* (Xin et al., 2009), leveduras isoladas da filosfera e rizosfera de *Drosera spatulata* (Fu et al., 2016) e leveduras isoladas de folhas de arroz e cana-de-açúcar (Nutaratat et al., 2014). Entre as espécies detectadas como boas produtoras de AIA, destacam-se as espécies comumente relatadas em solo: *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula glutinis*, *R. mucilaginosa*, *Torulaspota globosa* e *Cryptococcus flavus*.

Outra estratégia utilizada por microrganismos PGP para aumentar o crescimento de plantas é a solubilização de nutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas, como o fósforo (P). O P é um dos principais nutrientes limitantes para o crescimento das plantas por causa de sua química de adsorção e formação de complexos minerais com diferentes elementos, como cálcio (Ca), alumínio (Al) e ferro (Fe), tornando-o imobilizado no solo (Sarabia et al., 2017). Os microrganismos solubilizadores de fosfato (formas indisponíveis de P) são caracterizados por sua capacidade de solubilizar formas precipitadas de P quando cultivados em meios laboratoriais e incluem uma vasta gama de organismos simbióticos e não simbióticos (Richardson et al., 2009). Muitas espécies de leveduras têm demonstrado essa capacidade *in vitro*. Espécies isoladas da rizosfera de milho, como *Candida railenensis*, *Clavispora lusitaniae*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Symmetrospora coprosmae*, foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) *in vitro* e promover o crescimento de plântulas de milho, por meio do aumento do peso seco da raiz e da parte aérea das plantas (Sarabia et al., 2018). *Candida tropicalis*, *Geotrichum candidum*, *G. capitatum*, *Rhodotorula minuta* e *R. rubra*, isoladas de solos arenosos, também apresentaram capacidade de solubilizar fosfato de cálcio *in vitro*, com a espécie *G. capitatum* disponibilizando uma grande quantidade de fosfato solúvel (45  $\mu\text{g/ml}$ ) (Al-Falih, 2005), indicando que essas leveduras têm possível papel ecológico nos ciclos de transformação desses nutrientes no solo.

A espécie *Meyerozyma guilliermondii* tem sido descrita como potencialmente solubilizadora de fosfato. Em ensaios utilizando meio líquido contendo fosfato de

cálcio, uma estirpe de *Meyerozyma guilliermondii* mostrou maior capacidade de solubilização de fosfato (190,8 mg l<sup>-1</sup>), seguida pela espécie *M. caribbica* (170,4 mg l<sup>-1</sup>) e *Rhodotorula mucilaginosa* (97,7 mg l<sup>-1</sup>). Além disso, *M. guilliermondii* aumentou a absorção e o conteúdo de fósforo, nitrogênio, ferro, potássio, zinco e manganês na parte aérea de plantas de milho, bem como aumentou em até 41% a altura da planta e o peso seco da parte aérea (Nakayan et al., 2013).

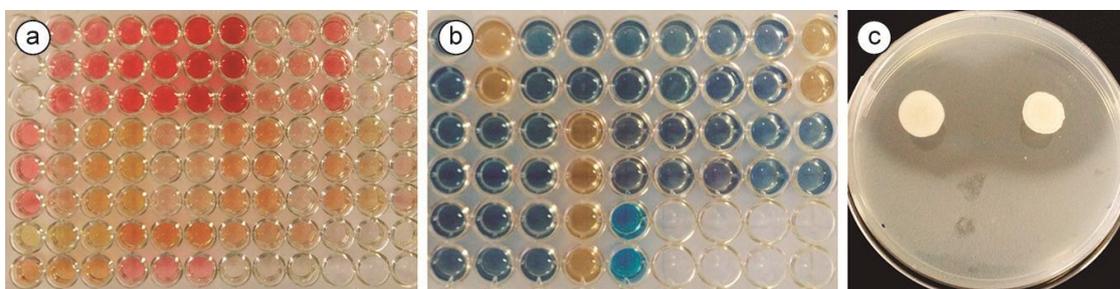
Algumas espécies de leveduras solubilizadoras de fosfato podem associar-se a fungos micorrízicos arbusculares no solo rizosférico para aumentar a absorção de fósforo pela planta (Sarabia et al., 2017). A inoculação combinada das espécies *Cryptococcus flavus* e *Candida railenensis* com o fungo micorrízico *Rhizophagus irregularis* promoveu o crescimento de plântulas de milho, aumentando o comprimento das raízes e o conteúdo de P nas partes aéreas da planta. Além disso, as espécies foram capazes de aumentar a capacidade de absorção de fósforo pelo fungo micorrízico (Sarabia et al., 2017).

Outros mecanismos já detectados em espécies de leveduras, porém ainda com pouco relatados, para promover o crescimento vegetal são: produção de NH<sub>3</sub> e sideróforos por *Rhodosporidium paludigenum* (Nutaratat et al., 2014); atividade de ACC deaminase; produção de poliaminas e fitase por *Candida tropicalis* (Amprayn et al., 2012); produção de poliaminas, como cadaverina e espermina, por *Papiliotrema laurentii* (Cloete et al., 2009); solubilização de fosfato e zinco por *Candida tropicalis* (Mukherjee e Sen, 2014); e diversas características de PGP, como produção de AIA, solubilização de fosfato e zinco, produção de NH<sub>3</sub>, sideróforos, catalases e enzimas que degradam a parede celular, além de atividade antagônica a patógenos, por diversas espécies isoladas da rizosfera e da filosfera de *Drosera spatulata* (Fu et al., 2016).

Essas características promotoras do crescimento vegetal podem ser triadas em laboratório, com estirpes isoladas do solo, utilizando protocolos rápidos, fáceis e reproduzíveis que fornecem resultados robustos e confiáveis (Figura 9). Por exemplo, a produção de AIA pode ser quantificada por meio de metodologia colorimétrica utilizando o reagente de Salkowski (Gordon e Weber, 1950; Fu et al., 2016); a detecção de sideróforos pode se dar mediante a utilização do corante *Chrome Azurol S* e a alteração de coloração do meio utilizado, quando há a produção das moléculas (Pérez-

Miranda et al., 2007); e a solubilização de fosfato e de zinco pode ser observada de forma qualitativa por intermédio da formação de halos de solubilização em meio Pikovskaya ágar (Amprayn et al., 2012).

A produção de AIA pode ser verificada pelo cultivo da estirpe em meio de cultura suplementado com L-triptofano, e a quantificação é feita utilizando método colorimétrico. Uma coloração rosa se desenvolve em estirpes produtoras logo após a adição do reagente de Salkowski, com a intensidade da cor sendo diretamente proporcional à quantidade de AIA produzido pela estirpe (Gordon e Weber, 1950; Fu et al., 2016).



**Figura 9. Representações de metodologias utilizadas para verificação de características de PGP em leveduras. A) Produção de AIA utilizando reagente de Salkowski; B) Detecção de sideróforos utilizando Chrome Azurol S; C) Solubilização de fosfato de cálcio utilizando Chrome Azurol S; C) Solubilização de fosfato de cálcio utilizando meio Pikovskaya ágar.**

O ensaio para detecção de sideróforos é fundamentado na competição por ferro entre o complexo férrico do corante indicador (*Chrome Azurol S*) e o quelante (sideróforo) produzido pelo microrganismo, utilizando condições de cultivo em que esse nutriente é limitante. O ensaio depende apenas da capacidade do composto de se ligar ao ferro com uma afinidade relativamente alta, modificando, assim, a coloração do meio com o sequestro do ferro pelo complexo férrico produzido pelo microrganismo (Calvente et al., 2001b).

A seleção de leveduras solubilizadoras de fosfato é rotineiramente fundamentada na solubilização de fosfato de forma qualitativa por meio da observação de formação de halos de solubilização em placas. São utilizados como fonte o fosfato de cálcio

( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), os fosfatos de rocha ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  e  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ) e os fosfatos de ferro ( $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e de alumínio ( $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). A quantidade de P solubilizada é altamente dependente da fonte (solubilidade) do P, sendo também influenciada em grande parte pelas condições de cultivo (Richardson et al., 2009).

Outras características também são facilmente identificadas em laboratório: a produção de  $\text{NH}_3$  pode ser detectada por meio do desenvolvimento de uma coloração marrom ao adicionar o reagente de Nessler (Cappuccino e Welsh, 2017); a produção de poliaminas é constatada mediante o cultivo da levedura em meio *Long Ashton Decarboxylase* (LAD) e a formação de halos vermelhos, que indicam a descarboxilação de arginina pela estirpe (Amprayn et al., 2012); a presença da atividade de ACC deaminase pode ser verificada cultivando a estirpe em meio de cultura com a ACC como única fonte de nitrogênio (Dell'Amico et al., 2005); e a produção de enzimas degradadoras da parede celular é avaliada cultivando a estirpe em meio de cultura contendo o substrato específico para cada atividade enzimática, com consequente formação de halo quando há atividade (Fu et al., 2016).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Leveduras são um grupo de microrganismos cosmopolitas e amplamente distribuídos no mundo. Apesar disso, são poucos os estudos a respeito das comunidades de leveduras em solo, principalmente em solos tropicais, embora a importância ecológica delas nos solos e os potenciais de sua aplicação prioritariamente no setor agrícola já venham sendo comprovados.

As atividades humanas, o manejo do solo e as mudanças climáticas têm grande impacto na biologia do solo. Esse fato torna urgente a necessidade de explorar a diversidade das comunidades de leveduras para compreender o seu papel funcional e ecológico, bem como a composição e a distribuição de espécies nos diversos tipos de solo, especialmente nas regiões ainda pouco investigadas, como o Brasil.

Já é conhecido que as comunidades de leveduras do solo participam de processos ecológicos importantes, tais como a ciclagem de nutrientes, a formação de agregados, a

manutenção da estrutura do solo, a dissipação de carbono e energia por meio do ecossistema solo, entre outros. Além disso, o papel das leveduras como agentes de biocontrole e promotoras do crescimento vegetal tem sido esclarecido e comprovado por inúmeros trabalhos, bem como a atuação desse grupo na recuperação de ambientes impactados por atividades antrópicas.

Os fatores ecológicos que afetam as comunidades de leveduras nos solos também estão começando a ser desvendados. Embora já se tenham muitas correlações entre os parâmetros ambientais e a dinâmica das comunidades, muito esforço amostral ainda será necessário para se obter respostas mais robustas quanto à influência dos parâmetros ambientais na composição e na moldagem dessas comunidades. E, mais uma vez, muito do que já se tem relatado vem de dados de diversidade e ecologia das comunidades relacionadas ao clima temperado e seus tipos de solo. Alguns estudos em climas tropicais e subtropicais mostram fortes diferenças entre essas comunidades de leveduras, principalmente quanto ao filo dominante e à composição de espécies em cada tipo climático.

As comunidades de leveduras, em sua grande maioria, correlacionam-se mais fortemente com as propriedades da comunidade vegetal existente do que com os atributos do solo, embora os mecanismos subjacentes a esse efeito permaneçam ainda desconhecidos. Por causa dessa característica, essas comunidades podem ser ameaçadas pela perda de habitat causada pelo desflorestamento e pela fragmentação das florestas, como consequência das atividades antrópicas. Esses fatos devem ser levados em consideração para que um esforço seja feito para focalizar e direcionar futuros estudos em ecossistemas naturais, sobretudo nas condições tropicais brasileiras.

Trabalhos que objetivam descrever a diversidade dessas comunidades em biomas naturais e comparar essas comunidades entre os biomas se tornam interessantes. Visto que as leveduras representam um grupo facilmente cultivável se comparado a outros grupos de microrganismos, o uso de amostragens e as condições de cultivo adequadas podem ser utilizados para esse tipo de abordagem.

## LITERATURA CITADA

- Ahmed E, Holmström SJM. Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb Biotechnol.* 2014;7:196-208.
- Al-Falih AM. Phosphate solubilization in vitro by some soil yeasts. *Qatar Univ Sci J.* 2005;25:119-25.
- Almagro A, Prista C, Benito B, Loureiro-Dias MC, Ramos J. Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J Bacteriol.* 2001;83:3251-5.
- Aloui H, Licciardello F, Khwaldia K, Hamdi M, Restuccia C. Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. *Int J Food Microbiol.* 2015;200:22-30.
- Amprayn K, Rose MT, Kecskés M, Pereg L, Nguyen HT, Kennedy IR. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. *Appl Soil Ecol.* 2012;61:295-9.
- Ba AS, Phillips SA, Anderson JT. Yeasts in mound soil of the red imported fire ant. *Mycol Res.* 2000;104:969-73.
- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. Yeast, characteristics and Identification. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2000.
- Bautista-Rosales PU, Calderon-Santoyo M, Servín-Villegas R, Ochoa-Álvarez NA, Ragazzo-Sánchez JA. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biol Control.* 2013;65:293-301.
- Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biot.* 2009;84:11-8.
- Blackwell M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot* 2011;98:426-38.
- Bokulich NA, Mills DA. Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities. *Appl Environ Microb.* 2013;79:2519-26.
- Botha A. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biol Biochem.* 2011;43:1-8.
- Botha A. Yeasts in soil. In: Rosa C, Péter G, editors. Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Berlin: Springer; 2006. p. 221-40.
- Boundy-Mills K. Methods for investigating yeast biodiversity. In: Rosa C, Péter G, editors. Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Berlin: Springer; 2006. p. 67-100.

- Buée AM, Reich M, Murat C, Morin E, Nilsson RH, Uroz S, Martin F. 454 pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytol.* 2014;184:449-56.
- Buzzini P, Lachance M-A, Yurkov A. *Yeasts in natural ecosystems: ecology.* New York: Springer International Publishing; 2017.
- Cadete RM, Melo MA, Dussán KJ, Rodrigues RCLB, Silva SS, Zilli JE, Vital MJS, Gomes FCO, Lachance M-A, Rosa CA. Diversity and physiological characterization of D-xylosefermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. *PLoS ONE.* 2012;7:e43135.
- Calvente V, Orellano ME, Sansone G, Benuzzi D, Sanz De Tosetti MI. Effect of nitrogen source and pH on siderophore production by *Rhodotorula* strains and their application to biocontrol of phytopathogenic moulds. *J Ind Microbiol Biot.* 2001a;26:226-9.
- Calvente V, Orellano ME, Sansone G, Benuzzi D, Sanz De Tosetti MI. A simple agar plate assay for screening siderophore producer yeasts. *J Microbiol Meth.* 2001b;47:273-9.
- Cappuccino JG, Welsh C. *Microbiology: a laboratory manual.* 11th ed. Londres: Pearson; 2017.
- Carr RJG, Bilton RF, Atkinson T. Mechanism of biodegradation of paraquat by *Lipomyces starkeyi*. *Appl Environ Microb.* 1985;49:1290-4.
- Carvalho FP, Souza AC, Magalhães-Guedes KT, Dias DR, Silva CF, Schwan RF. Yeasts diversity in Brazilian Cerrado soils: study of the enzymatic activities. *Afr J Microbiol Res.* 2013;7:4176-90.
- Chen R, Jiang Y, Wei S, Wang Q. *Kwoniella shandongensis* sp. nov., a basidiomycetous yeast isolated from soil and bark from an apple orchard. *Int J Syst Evol Micr.* 2012;62:2774-7.
- Chen R, Wei S, Jiang Y, Wang Q, Bai F. *Kazachstania taianensis* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species from orchard soil. *Int J Syst Evol Micr.* 2010;60:1473-6.
- Cloete KJ, Valentine AJ, Stander MA, Blomerus LM, Botha A. Evidence of symbiosis between the soil yeast *Papiliotrema laurentii* and a sclerophyllous medicinal shrub, *Agathosma betulina* (berg.) pillans. *Microb Ecol.* 2009;57:624-32.
- Connell L, Redman R, Craig S, Scorzetti G, Iszard M, Rodriguez R. Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microb Ecol.* 2008;56:448-59.
- Çorbacı C, Uçar FB. Production and optimization of killer toxin in *Debaryomyces hansenii* strains. *Braz Arch Biol Techn.* 2017;60:e17160339.

De Azeredo LAI, Gomes EAT, Mendonca-Hagler LC, Hagler AN. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. *Int Microbiol.* 1998;1:205-8.

Dell'Amico E, Cavalca L, Andreoni V. Analysis of rhizobacterial communities in perennial Gramineae from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS Microbiol Ecol.* 2005;52:153-62.

Di Menna ME. Yeasts in New Zealand soils. *New Zeal J Bot.* 1965;3:194-203.

Di Menna ME. The isolation of yeasts from soil. *J Gen Microbiol.* 1957;17:678-88.

Dias DR, Schwan RF. Isolamento e identificação de leveduras. In: Moreira FMS, Huising EJ, Bignell DE, editores. *Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade.* Lavras: Editora UFLA; 2010. p. 145-8.

Droby S, Vinokur V, Weiss B, Cohen L, Daus A, Goldschmidt E, Porat R. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathology.* 2002;92:393-9.

Dunthorn M, Kauserud H, Bass D, Mayor J, Mahé F. Yeasts dominate soil fungal communities in three lowland Neotropical rainforests. *Environ Microbiol Rep.* 2017;9:668-75.

El-Mehalawy AA, Hassanein NM, Khater HM, El-Din E-ZAK, Youssef YA. Influence of maize root colonization by the rhizosphere actinomycetes and yeast fungi on plant growth and on the biological control of late wilt disease. *Int J Agric Biol.* 2004;6:599-605.

El-Tarabily KA, Sivasithamparam K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience.* 2006;47:25-35.

El-Tarabily KA. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. *J Appl Microbiol.* 2004;96:69-75.

Falih AM, Wainwright M. Nitrification, S-oxidation and P-solubilization by the soil yeast *Williopsis californica* and by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycol Res.* 1995;99:200-4.

Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Micr.* 2000;50:1351-71.

Fernández-Ullivarri M, Mendoza LM, Raya RR. Characterization of the killer toxin KTCf20 from *Wickerhamomyces anomalus*, a potential biocontrol agent against wine spoilage yeasts. *Biol Control.* 2018;121:223-8.

- França L, Sannino C, Turchetti B, Buzzini P, Margesin R. Seasonal and altitudinal changes of culturable bacterial and yeast diversity in Alpine forest soils. *Extremophiles*. 2016;20:855-73.
- Frey B, Rime T, Phillips M, Stierli B, Hajdas I, Widmer F, Hartmann M. Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers. *FEMS Microbiol Ecol*. 2016;92:1-17.
- Fu S-F, Sun P-F, Lu H-Y, Wei J-Y, Xiao H-S, Fang W-T, Cheng B-Y, Chou J-Y. Plant growthpromoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera*. *Fungal Biol*. 2016;120:433-48.
- Gasperini AM, Hashimoto EH, Coelho AR, Hirooka EY. Leveduras killer visando o biocontrole de *Fusarium verticillioides* micotoxigênico para a qualidade de milho. In: III Encontro Paranaense de Engenharia de Alimentos; 2011; Guarapuava. Guarapuava: Deali/Unicentro; 2011.
- Glushakova AM, Kachalkin AV, Chernov IY. The influence of *Aster x salignus* Willd. Invasion on the diversity of soil yeast communities. *Eurasian Soil Sci*. 2016;49:792-5.
- Glushakova AM, Kachalkin AV, Chernov IY. Effect of invasive herb species on the structure of soil yeast complexes in mixed forests exemplified by *Impatiens parviflora* DC. *Microbiology*. 2015;84:717-21.
- Glushakova AM, Kachalkin AV, Tiunov AV, Chernov IY. Distribution of yeast complexes in the profiles of different soil types. *Eurasian Soil Sci*. 2017;50:820-5.
- Golubtsova YV, Glushakova AM, Chernov IY. The seasonal dynamics of yeast communities in the rhizosphere of soddy-podzolic soils. *Eurasian Soil Science*, 2007;40:875-9.
- Gomes NCM, Fagbola O, Costa R, Rumjanek NG, Buchner A, Mendona-hagler L, Smalla K. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Appl Environ Microb*. 2003;69:3758-66.
- González-Hernández JC, Cárdenas-Monroy CA, Peña A. Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*. 2004;21:403-12.
- Gordon SA, Weber RP. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol*. 1950;26:192-5.
- Gross S, Kunz L, Müller DC, Kron AS, Freimoser FM. Characterization of antagonistic yeasts for biocontrol applications on apples or in soil by quantitative analyses of synthetic yeast communities. *Yeast*. 2018:559-66.
- Grzegorzcyk M, Zarowska B, Restuccia C, Cirvilleri G. Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food Microbiol*. 2017;61:93-101.

Hill GT, Mitkowski NA, Aldrich-Wolfe L, Emele LR, Jurkonie DD, Ficke A, Maldonado-Ramirez S, Lynch ST, Nelson EB. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Appl Soil Ecol.* 2000;15:25-36.

Hong X, Chen J, Liu L, Wu H, Tan H, Xie G, Xu Q, Zou H, Yu W, Wang L, Qin N. Metagenomic sequencing reveals the relationship between microbiota composition and quality of Chinese Rice Wine. *Sci Rep.* 2016;6:1-11.

Ignatova LV, Brazhnikova YV, Mukasheva TD, Omirbekova AA, Berzhanova RZh, Sydykbekova RK, Karpenyuk TA, Goncharova AV. Biodiversity of micromycetes isolated from soils of different agricultures in kazakhstan and their plant growth promoting potential. *Int J Agric Biosyst Eng.* 2013;7:372-7.

Ihrmark K, Bodeker ITM, Cruz-Martinez K, Friberg H, Kubartova A, Schenck J, Strid Y, Stenlid J, Brandstrom-Durling M, Clemmensen KE, Lindahl BD. New primers to amplify the fungal ITS2 region - evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiol Ecol.* 2012;82:666-77.

Jaiboon K, Lertwattanasakul N, Limtong P, Limtong S. Yeasts from peat in a tropical peat swamp forest in Thailand and their ability to produce ethanol, indole-3-acetic acid and extracellular enzymes. *Mycol Prog.* 2016;15:755-70.

Janisiewicz WJ, Tworkoski TJ, Sharer C. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology.* 2000;90:1196-200.

Kachalkin AV, Abdullabekova DA, Magomedova ES, Magomedov GG. Yeasts of the vineyards in dagestan and other regions. 2015;84:425-32.

Kurtzman CP, Fell JW. Yeast systematics and phylogeny - implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: Rosa CA, Péter G, editors. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts.* New York: Springer; 2006. p. 11-30.

Kurtzman CP, Fell JW. *The Yeasts, a taxonomic study.* 4th ed. London: Elsevier; 1998.

Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. *The yeast: a taxonomic study.* 5th ed. London: Elsevier; 2011.

Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Anton Leeuw.* 1998;73:331-71.

Lachance M-A. Yeast biodiversity: how many and how much? In: Rosa C, Péter G, editors. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts.* New York: Springer; 2006. p. 1-9.

Lee C, Liu Y, Young S, Chang K. *Debaryomyces renaii* sp. nov., an ascomycetous yeast species isolated from soil in Taiwan. *Bot Stud.* 2009;50:325-9.

- Limtong S, Koowadjanakul N. Yeasts from phylloplane and their capability to produce indole3-acetic acid. *World J Microb Biot.* 2012;28:3323-35.
- Lindahl B, Nilsson RH, Tedersoo L, Abarenkov K, Carlsen T, Pennanen T, Stenlid J. Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers - a user's guide. *New Phytol.* 2013;199:288-99.
- Lisichkina GA, Bab IP, Sorokin DY. Alkalitolerant yeasts from natural biotopes. *Microbiology.* 2003;72:618-20.
- Liu P, Luo L, Long C-A. Characterization of competition for nutrients in the biocontrol of *Penicillium italicum* by *Kloeckera apiculata*. *Biol Control.* 2013;67:157-62.
- Liu XZ, Wang QM, Theelen B, Groenewald M, Bai FY, Boekhout T. Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses. *Stud Mycol.* 2015;81:1-26.
- López-Piñeiro A, Muñoz A, Zamora E, Ramírez M. Influence of the management regime and phenological state of the vines on the physicochemical properties and the seasonal fluctuations of the microorganisms in a vineyard soil under semi-arid conditions. *Soil Till Res.* 2013;126:119-26.
- Maksimova IA, Chernov IY. Community structure of yeast fungi in forest biogeocenoses. *Microbiology.* 2004;73:474-81.
- Mandl K, Schieck J, Silhavy-Richter K, Prange A, Schneider V, Schmidt H-P. Vines take up yeasts from soil and transport them through the vine to the stem and skins of grapes. *Ithaka J.* 2015;349-55.
- Martin KJ, Rygiewicz PT. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol.* 2005;5:28.
- Masih EI, Slezack-Deschaumes S, Marmaras I, Barka EA, Vernet G. Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;202:227-32.
- Masínová T, Bahnmann BD, Vetrovský T, Tomšovský M, Merunková K, Baldrian P. Drivers of yeast community composition in the litter and soil of a temperate forest. *FEMS Microbiol Ecol.* 2017a;93:1-10.
- Masínová T, Pontes A, Carvalho C, Sampaio JP, Baldrian P. *Libkindia masarykiana* gen. et sp. nov., *Yurkovia mendeliana* gen. et sp. nov. and *Leucosporidium krtinense* f.a. sp. nov., isolated from temperate forest soils. *Int J Syst Evol Micr.* 2017b;67:902-8.
- Masínová T, Yurkov A, Baldrian P. Forest soil yeasts: Decomposition potential and the utilization of carbon sources. *Fungal Biol.* 2018;34:10-9.

- Medina A, Vassilev N, Alguacil MM, Roldan A, Azcon R. Increased plant growth, nutrient uptake, and soil enzymatic activities in a desertified Mediterranean soil amended with treated residues and inoculated with native mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting yeast. *Soil Sci.* 2004;169:260-70.
- Mehlomakulu NN, Setati ME, Divol B. Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *Int J Food Microbiol.* 2014;188:83-91.
- Mendes SDC, Ramírez-Castrillón M, Feldberg NP, Bertoldi FC, Valente P. Environmental yeast communities in vineyards in the mountains of Santa Catarina State, Brazil. *World J Microb Biot.* 2017;33:128.
- Mestre MC, Fontenla S, Rosa CA. Ecology of cultivable yeasts in pristine forests in northern Patagonia (Argentina) influenced by different environmental factors. *Can J Microbiol.* 2014;60:371-82.
- Mestre MC, Rosa CA, Fontenla SB. *Lindnera rhizosphaerae* sp. nov., a yeast species isolated from rhizospheric soil. *Int J Syst Evol Micr.* 2011b;61:985-8.
- Mestre MC, Rosa CA, Safar SVB, Libkind D, Fontenla SB. Yeast communities associated with the bulk-soil, rhizosphere and ectomycorrhizosphere of a *Nothofagus pumilio* forest in northwestern Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiol Ecol.* 2011a;78:531-41.
- Middelhoven WJ, Scorzetti G, Fell JW. *Apiotrichum porosum* comb. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast inhabiting soil, related to the loubieri/laibachii group of species that assimilate hemicelluloses and phenolic compounds. *FEMS Yeast Res.* 2001;1:15-22.
- Mok WY, Luizão RCC, Silva MSB, Teixeira MFS, Muniz EG. Ecology of pathogenic yeasts in amazonian soil. *Appl Environ Microb.* 1984;47:390-4.
- Mokhtarnejad L, Arzanlou M, Babai-Ahari A. Molecular and phenotypic characterization of ascomycetous yeasts in hypersaline soils of Urmia Lake basin (NW Iran). *Rostaniha.* 2015;16:174-85.
- Mokhtarnejad L, Arzanlou M, Babai-Ahari A, Di Mauro S, Onofri A, Buzzini P, Turchetti B. Characterization of basidiomycetous yeasts in hypersaline soils of the Urmia Lake National Park, Iran. *Extremophiles.* 2016;20:915-28.
- Moll J, Hoppe B, König S, Wubet T, Buscot F. Spatial distribution of fungal communities in an arable soil. *PLoS ONE.* 2016;11:e0154290.
- Molnárová J, Vadkertiová R, Stratilová E. Extracellular enzymatic activities and physiological profiles of yeasts colonizing fruit trees. *J Basic Microb.* 2014;54:S74-84.

Morais CG, Cadete RM, Uetanabaro APT, Rosa LH, Lachance M-A, Rosa CA. D-xylosefermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. *Fungal Genet Biol.* 2013;60:19-28.

Moreira GAM. Diversidade genética e funcional de leveduras presentes em solos de mineração e áreas do entorno [dissertação]. Brasília, DF: Universidade de Brasília; 2015.

Moreira GAM, Vale HMM. Occurrence of yeast species in soils under native and modified vegetation in an iron mining area. *Rev Bras Cienc do Solo.* 2018;42:e0170375.

Morsy E. Efficiency of free and encapsulated yeast strains as pgrs producers on faba bean plants. *Middle East J Appl Sci.* 2016;5:534-42.

Motaung TE, Albertyn J, Kock JLF, Lee C-F, Suh S-O, Blackwell M, Pohl CH. *Trichosporon vanderwaltii* sp. nov., an asexual basidiomycetous yeast isolated from soil and beetles. *Anton Leeuw.* 2013;103:313-9.

Mukherjee S, Sen SK. Exploration of novel rhizospheric yeast isolate as fertilizing soil inoculant for improvement of maize cultivation. *J Sci Food Agric.* 2014;95:1491-9.

Nakayan P, Hameed A, Singh S, Young L Sen, Hung MH, Young CC. Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. *Plant Soil.* 2013;373:301-15.

Nally MC, Pesce VM, Maturano YP, Munoz CJ, Combina M, Toro ME, Castellanos-Figueroa LI, Vazquez F. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biol Tec.* 2012;64:40-8.

Narsian V, Samaha AA, Patel HH. Rock phosphate dissolution by specific yeast. *Indian J Microbiol.* 2010;50:57-62.

Nassar AH, El-Tarabily KA, Sivasithamparam K. Promotion of plant growth by an auxinproducing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biol Fert Soils.* 2005;42:97-108.

Nouri H, Moghimi H, Vaghei MG, Nasr S. *Blastobotrys persicus* sp. nov., an ascomycetous yeast species isolated from cave soil. *Anton Leeuw.* 2018;111:517-24.

Nutaratat P, Srisuk N, Arunrattiyakorn P, Limtong S. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. *Fungal Biol.* 2014;118:683-94.

Papon N, Savini V, Lanoue A, Joe AJS, Creche J, Giglioli-Guivarc'h N, Clastre M, Courdavault V, Sibirny AA. *Candida guilliermondii*: biotechnological applications ,

perspectives for biological control , emerging clinical importance and recent advances in genetics. *Curr Genet.* 2013;59:73-90.

Pérez-Miranda S, Cabirol N, George-Téllez R, Zamudio-Rivera LS, Fernández FJ. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J Microbiol Meth.* 2007;70:127-31.

Pesce VM, Nally MC, Carrizo GP, Rojo C, Pérez BA, Toro ME, Castellanos-Figueroa LI, Vazquez F. Antifungal activity of native yeasts from different microenvironments against *Colletotrichum gloeosporioides* on ripe olive fruits. *Biol Control.* 2018;120:43-51.

Péter G, Takashima M, Cadez N. Yeast habitats: different but global. In: Buzzini P, editor. *Yeasts in natural ecosystems: ecology.* New York: Springer International Publishing; 2017. p. 39-71.

Petrovic U, Gunde-Cimerman N, Plemenitas A. Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Mol Microbiol.* 2002;45:665-72.

Phaff HJ, Starmer WT. Yeasts associated with plants, insects and soil. In: Rose AH, Harrison JS, editors. *The yeasts: biology of yeasts.* London: Academic; 1987.

Piccinin E, Di Piero RM, Pascholati SF. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. *Fitopatol Bras.* 2005;30:5-9.

Pimenta RS, Alves PDD, Almeida GMF, Silva JF, Morais PB, Corrêa A, Rosa CA. Yeast communities in two Atlantic rain Forest fragments in Southeast Brazil. *Braz J Microbiol.* 2009;40:90-5.

Prévost-Bouré NC, Christen R, Dequiedt S, Mougel C, Lelièvre M, Jolivet C, Shahbazkia HR, Guillou L, Arrouays D, Ranjard L. Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PLoS ONE.* 2011;6:e24166.

Raspor P, Zupan J. Yeasts in extreme environments. In: Rosa CA, Péter G, editors. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts.* New York: Springer International Publishing; 2006. p. 371-418.

Ribeiro JRA, Carvalho PMB, Cabral AS, Macrae A, Mendonça-Hagler LCS, Berbara RLL, Hagler AN. *Candida middelhoveniana* sp. nov., a new yeast species found on the rhizoplane of organically cultivated sugarcane. *Anton Leeuw.* 2011;100:341-7.

Ribeiro JRA, Robert V, Hagler AN. Ecology of soil yeasts. In: Araújo ASF, Figueiredo MVB, editors. *Microbial ecology of tropical soils.* Nova York: Nova Science Pub Inc; 2010. p. 21-30.

- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil*. 2009;321:305-39.
- Rosa-magri MM, Tauk-tornisiello SM, Ceccato- SR. Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic molds. *Braz Arch Biol Techn*. 2011;54:1-5.
- Salam JA, Das N. Lindane degradation by *Candida* VITJzN04, a newly isolated yeast strain from contaminated soil: kinetic study, enzyme analysis and biodegradation pathway. *World J Microb Biot*. 2014;30:1301-13.
- Salam JA, Lakshmi V, Das D, Das N. Biodegradation of lindane using a novel yeast strain, *Rhodotorula* sp. VITJzN03 isolated from agricultural soil. *World J Microb Biot*. 2013;29:475-87.
- Santos AF, Junior CFFM, Melo DLFM, Junior AMB, Fernandes RPM. Effects of pH and temperature on the production and activity of *Schwanniomyces polymorphus* extracellular proteases in fermentation medium. *Afr J Microbiol Res*. 2015;9:1044-52.
- Sarabia M, Cazares S, González-rodríguez A, Mora F. Rhizosphere plant growth promotion traits of rhizosphere yeasts and their response to soil characteristics and crop cycle in maize agroecosystems. *Rhizosphere*. 2018;6:67-73.
- Sarabia M, Jakobsen I, Grønlund M, Carreon-Abud Y, Larsen J. Rhizosphere yeasts improve P uptake of a maize arbuscular mycorrhizal association. *Appl Soil Ecol*. 2017;125:18-25.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *P Natl Acad Sci USA*. 2012;109:6241-6.
- Scorzetti G, Fell JW, Fonseca A, Statzell-Tallman A. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res*. 2002;2:495-517.
- Shalaby ME-S, El-Nady MF. Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent against *Fusarium* infection of sugar beet plants. *Acta Biol Szeged*. 2008;52:271-5.
- Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol*. 2012;21:1794-805.
- Siles JA, Margesin R. Abundance and diversity of bacterial, archaeal, and fungal communities along an altitudinal gradient in alpine forest soils: what are the driving factors? *Microb Ecol*. 2016;72:207-20.
- Sláviková E, Vadkertiová R. The diversity of yeasts in the agricultural soil. *Jf Basic Microb*. 2003a;43:430-6.

- Sláviková E, Vadkertiová R. Effects of pesticides on yeasts isolated from agricultural soil. *Z Naturforsch C*. 2003b;58:855-9.
- Sláviková E, Vadkertiová R. The occurrence of yeasts in the forest soils. *J Basic Microb*. 2000;40:207-12.
- Spadaro D, Vola R, Piano S, Gullino ML. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biol Tec*. 2002;24:123-34.
- Spencer JFT, Spencer DM. Ecology: where yeasts live? In: Spencer JFT, Spencer DM, editors. *Yeasts in natural and artificial habitats*. New York: Springer; 1997. p. 33-58.
- Sperandio EM, Vale HMM, Moreira GAM. Yeasts from native Brazilian Cerrado plants: occurrence, diversity and use in the biocontrol of citrus green mould. *Fungal Biol*. 2015;119:984-93.
- Starmer WT, Lachance M-A. Yeast ecology. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. *The yeast: a taxonomic study*. 5th ed. London: Elsevier; 2011. p. 65-83.
- Stringini M, Comitini F, Taccari M, Ciani M. Yeast diversity in crop-growing environments in Cameroon. *Int J Food Microbiol*. 2008;127:184-9.
- Sugita T, Takashima M, Nakase T, Ichikawa T, Shinoda T, Nishikawa A. A basidiomycetous anamorphic yeast, *Trichosporon terricola* sp. nov., isolated from soil. *J Gen Appl Microbiol*. 2002;48:293-7.
- Sun P, Fang W, Shin L-Y, Wei J, Fu S-F, Chou J. Indole-3-acetic acid-producing yeasts in the phyllosphere of the carnivorous plant *Drosera indica* L. *PLoS ONE*. 2014;9:e114196.
- Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco SMG, Macoris SAG, Richini-Pereira VB. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol*. 2007;7:92.
- Toju H, Tanabe AS, Yamamoto S, Sato H. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS ONE*. 2012;7:e40863.
- Toro ME, Oro NP, Vega AD, Maturano YP, Nally MC. Diversidad de levaduras en canopias y suelos asociados con *Bulnesia retama* y *Larrea divaricata*. *Rev Argent Microbiol*. 2005;37:209-13.
- Tosi S, Onofri S, Brusoni M, Zucconi L, Vishniac H. Response of Antarctic soil fungal assemblages to experimental warming and reduction of UV radiation. *Polar Biol*. 2005;28:470-82.
- Tuszynski T, Satora P. Microbiological characteristics of the węgierka zwykła plum orchard in submontane region. *Pol J Food Nutr Sci*. 2003;12:1-15.

Urquhart EJ, Punja ZK. Hydrolytic enzymes and antifungal compounds produced by *Tilletiopsis* species, phyllosphere yeasts that are antagonists of powdery mildew fungi. *Can J Microbiol.* 2002;48:219-29.

Vadkertiová R, Dudášová H, Balascáková M. Yeasts in agricultural and managed soils. In: Buzzini P, editor. *Yeasts in natural ecosystems: diversity*. New York: Springer International Publishing; 2017. p. 117-44.

Valente P, Boekhout T, Landell MF, Crestani J, Pagnocca FC, Sette LD, Passarini MRZ, Rosa CA, Brandão LR, Pimenta RS, Ribeiro JR, Garcia KM, Lee C-F, Suh S-O, Péter G, Dlačny D, Fell JW, Scorzetti G, Theelan B, Vainstein MH. *Bandoniozyma* gen. nov., a genus of fermentative and non-fermentative *Tremellaceous* yeast species. *PLoS ONE.* 2012;7:e46060.

Valente P, Ramos JP, Leoncini O. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. *Can J Microbiol.* 1999;45:949-58.

van der Heijden MGA, Bardgett RD, Van Straalen NM. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett.* 2008;11:296-310.

Vero S, Garmendia G, Garat MF, De Aurrecoechea I, Wisniewski M. *Cystofilobasidium infirmominiatum* as a biocontrol agent of postharvest diseases on apples and citrus. *Acta Hort.* 2011;905:169-80.

Vishniac HS. A multivariate analysis of soil yeasts isolated from a latitudinal gradient. *Microb Ecol.* 2006;52:90-103.

Vital M, Abranches J, Hagler A, Mendonça-Hagler L. Mycocinogenic yeasts isolated from amazon soils of the maracá ecological station, Roraima-Brazil. *Braz J Microbiol.* 2002;33:230-5.

Vreulink J-M, Esterhuyse A, Jacobs K, Botha A. Soil properties that impact yeast and actinomycete numbers in sandy low nutrient soils. *Can J Microbiol.* 2007;53:1369-74.

Wang M, Zhao L, Zhang X, Dhanasekaran S, Abdelhai MH, Yang Q, Jiang Z, Zhang H. Study on biocontrol of postharvest decay of table grapes caused by *Penicillium rubens* and the possible resistance mechanisms by *Yarrowia lipolytica*. *Biol Control.* 2018;130:110-7.

Wang X, Li G, Jiang D, Huang HC. Screening of plant epiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of hami melon. *Biol Control.* 2009;50:164-71.

Xin G, Glawe D, Doty SL. Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid-producing yeasts occurring in *Populus* trees. *Mycol Res.* 2009;113:973-80.

Yarwood SA, Bottomley PJ, Myrold DD. Soil microbial communities associated with douglas-fir and red alder stands at high- and low-productivity forest sites in oregon, USA. *Microb Ecol.* 2010;60:606-17.

Yoshikawa S, Mitsui N, Chikara K-I, Hashimoto H, Shimosaka M, Okazaki M. Effect of salt stress on plasma membrane permeability lipid saturation in the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii rouxii*. *J Ferment Bioeng.* 1995;80:131-5.

Yurkov A. Yeasts in forest soils. In: Buzzini P, editor. *Yeasts in natural ecosystems: diversity*. New York: Springer International Publishing; 2017. p. 87-116.

Yurkov A, Inácio J, Chernov IY, Fonseca Á. Yeast biogeography and the effects of species recognition approaches: the case study of widespread basidiomycetous species from birch forests in Russia. *Curr Microbiol.* 2014;70:587-601.

Yurkov A, Kemler M, Begerow D. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal Ecology.* 2012a;5:24-35.

Yurkov A, Wehde T, Kahl T, Begerow D. Aboveground deadwood deposition supports development of soil yeasts. *Diversity.* 2012b;4:453-74.

Yurkov AM, Chernov IY, Tiunov AV. Influence of *Lumbricus terrestris* earthworms on the structure of the yeast community of forest litter. *Microbiology.* 2008;77:107-11.

Yurkov AM, Kemler M, Begerow D. Species accumulation curves and incidence-based species richness estimators to appraise the diversity of cultivable yeasts from beech forest soils. *PLoS ONE.* 2011;6:e23671.

Yurkov AM, Rohl O, Pontes A, Carvalho C, Maldonado C, Sampaio JP. Local climatic conditions constrain soil yeast diversity patterns in mediterranean forests, woodlands and scrub biome. *FEMS Yeast Res.* 2015;16:1-11.

Yurkov AM, Wehde T, Federici J, Schafer AM, Ebinghaus M, Lotze-Engelhard S, Mittelbach M, Prior R, Richter C, Rohl O, Begerow D. Yeast diversity and species recovery rates from beech forest soils. *Mycol Prog.* 2016;15:845-59.

Yurkov AM. Yeasts of the soil - obscure but precious. *Yeast.* 2018;35:369-78.

Zalar P, Gostinčar C, Hoog GS, Uršič V, Sudhadham M, Gunde-Cimerman N. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Stud Mycol.* 2008;61:21-38.

Zong Y, Liu J, Li B, Qin G, Tian S. Effects of yeast antagonists in combination with hot water treatment on postharvest diseases of tomato fruit. *Biol Control.* 2010;54:316-21.

## **CAPÍTULO 2 – Yeast communities differing along an altitudinal gradient in the Brazilian Atlantic Forest**

*Manuscrito submetido para a revista Fungal Biology, Qualis Capes B2 para CBIII.*

Geisianny Augusta Monteiro Moreira <sup>a</sup>, Érica Mangaravite <sup>b</sup>, Nívea Moreira Vieira <sup>c</sup>,  
Fernando Augusto da Silveira <sup>c</sup>, Wendel Batista da Silveira <sup>c</sup>, Helson Mario Martins do  
Vale <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Fitopatologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília – UnB, Campus Darcy Ribeiro, 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brazil.*

<sup>b</sup> *Centro universitário UNIFAMINAS, Muriaé, Minas Gerais, Brazil*

<sup>c</sup> *Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, Departamento de Microbiologia/Bioagro, Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brazil*

\*Corresponding author

Helson Mario Martins do Vale, Departamento de Fitopatologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília – UnB, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília/ DF, Brazil. CEP: 70910-900. Phone.: (+55) 61 31073060, Fax: (+55) 61 31072931, e-mail: helson@unb.br

## Abstract

The Brazilian Atlantic Forest is one of the main biodiversity hotspots in the world. To the best of our knowledge, the effect of both altitudinal gradient and soil physical-chemical characteristics on the distribution patterns of yeast communities across Atlantic forest ecosystems has not yet been addressed. In this study, we investigated the occurrence, diversity and distribution of yeasts in soils, along an altitude gradient with four sampling sites (404; 1,016; 1,658; and 2,124 m above the sea level) of Serra dos Órgãos National Park (PARNASO). This park, which has a remarkable degree altitudinal, is located at Serra do Mar mountain chain. Yeast communities were described using a culture-based method and species identification was performed using the fungal barcode locus, the D1/D2 region of 26S rRNA. We isolated and identified a total of 76 yeasts including 10 species belonging to 8 genera. Basidiomycetes predominated over ascomycetes and *Saitozyma podzolica* and *Meyerozyma guilliermondii* were isolated in all altitudes. The principal component analysis showed that 88% of samples distribution is explained by soil characteristics. For *S. podzolica* the gene genealogy suggested that intraspecific diversity is likely related to similar altitudes. Overall, the species composition and soil characteristics were modified as altitude was increasing, being more heterogeneous and diverse in high altitude.

**Keywords:** Ecology, unicellular fungi, Serra do Mar, montane forest, haplotype network, local scale.

## Introduction

The Brazilian Atlantic forest (BAF) is a Neotropical forest and supports one of the highest numbers of richness and endemic species on the planet (Myers et al. 2000; Ribeiro et al. 2009). Originally, it covered around 1,500,000 km<sup>2</sup> (Ribeiro et al. 2009), however, it is currently restricted to 98,800 km<sup>2</sup> of remnants forest, that is about 7% of its original extension (Morellato and Haddad 2000). The State of Rio de Janeiro is entirely included in the BAF biome and presents important remnants of the northern portion of Serra do Mar mountain chain (Ayres et al. 2005). This mountain chain includes some important protected areas of the BAF, such as Serra dos Órgãos National Park (PARNASO) (Aguiar et al. 2003). The PARNASO exhibits an area from 200 m to 2,263 m above the sea level, with a super-humid climate. Its average annual temperature ranges from 13°C to 23°C, nevertheless, in higher altitudes temperatures can reach negative values. The predominant vegetation type is the montane rain forest, such as submontane, ranging from 300 to 700 m; lower montane, from 700 to 1,100 m; and upper montane, higher than 1,100 m above the sea level (Oliveira-Filho and Fontes 2000). Additionally, the ecosystem *Campos de Altitude* (high-altitude grasslands), which has altitudes higher than 1,800 m (Safford 1999), is also part of the PARNASO highland vegetation.

Ecological factors are considered as the main determinants of soil microbial community composition (Yurkov 2017). The heterogeneous environmental conditions and geographical characteristics, like in PARNASO, favor a high diversity, endemism and occurrence of many species that require scientific description (Ribeiro et al. 2009), especially for the soil fungal communities. On a regional scale, the composition of plant community, geographic distance and abiotic factors are the main determinants of fungal distribution in the soil (Chen et al. 2017). On the other hand, the altitudinal variation on a local scale determines the pattern of fungal species distribution in soils (Jain and Pandey 2016). It is important to point out that these authors focused only on soil filamentous fungi. Beyond fungi, yeast communities play an important ecological role (Botha 2011), and a ubiquitous distribution in soils (Sarabia et al. 2018; França et al. 2016; Glushakova et al. 2015; Yurkov et al. 2012; Mestre et al. 2011; Stringini et al. 2008). Nevertheless, the knowledge about soil yeasts is biased towards temperate and boreal forests. Data from Africa, Americas and Asia is scarce and the forest soils in the

Southern hemisphere are strongly under sampled (Yurkov 2018). Indeed, there are few studies focused on evaluating soil yeasts populations of Southern Hemisphere (e.g., Mestre et al. 2014). To the best of our knowledge, there is only one study in Brazil showing the yeast occurrence in soils with natural vegetation of Atlantic Forest (Moreira and Vale 2018). With regard to the effect of altitude on yeast diversity, França et al. (2016) observed that the yeast communities altered along an altitude gradient in Alpine forest soils during the spring season. For instance, the altitude-specific effects on yeast communities in soils of the BAF are not well-known.

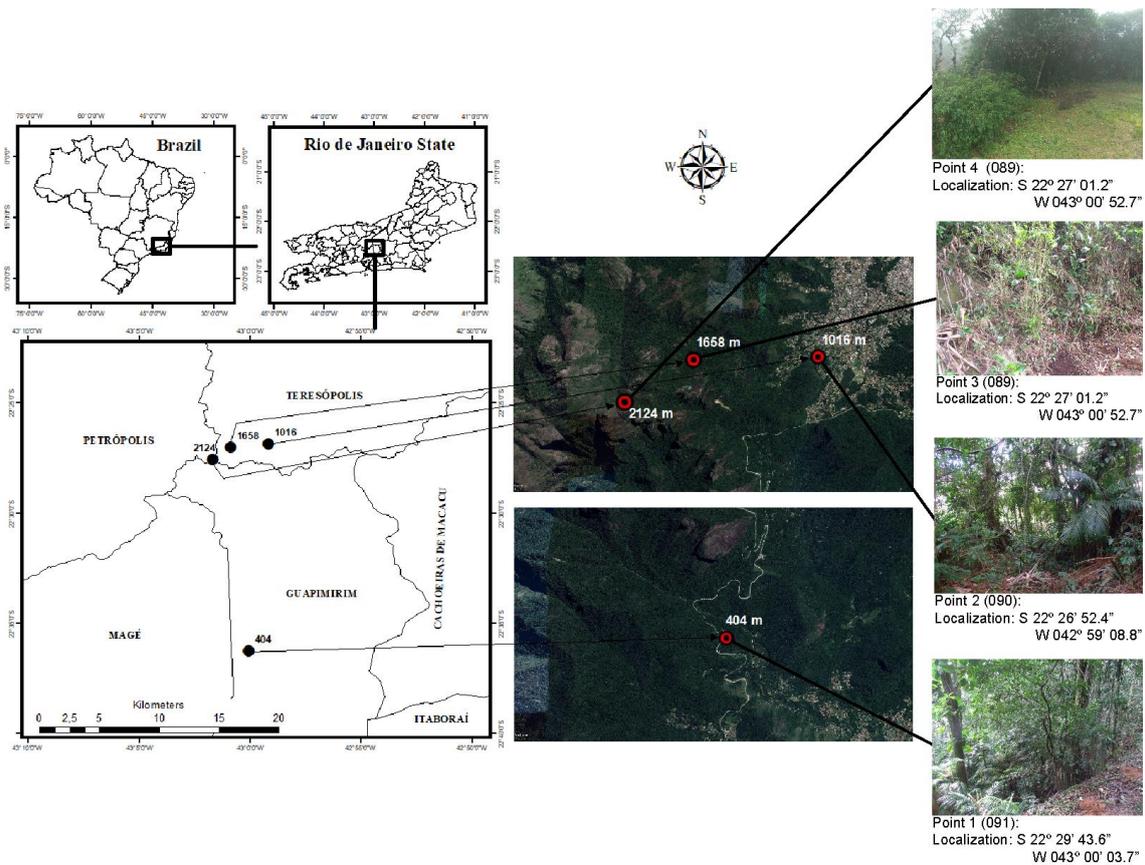
Beyond community-diversity studies, the gene genealogies have been a useful tool to investigate the genetic diversity of fungi and associate to species distribution. The D1/D2 domain of the large-subunit rDNA in yeast species is the barcode region commonly used to species identification (Kurtzman and Robnett 1998) and is unusually polymorphic (Lachance et al. 2003). The polymorphism in D1/D2 regions is useful for identify variations and heterogeneity within species allowing to evaluate the genetic diversity, species distribution pattern, phylogeny and evolutionary relationship (Lachance et al. 2003; Matute et al. 2006; García et al. 2015).

In this context, we access the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene sequence to study the yeast community diversity along different altitudes from soils at the endangered BAF. In addition, we inferred the gene genealogy of this genomic region to approach the matting relation among the altitudes. We addressed the following questions: (1) Which altitude exhibited higher community diversity? (2) Is there any relationship among the yeast communities and the vegetation type and soil physicochemical properties? (3) Is there any relationship among the altitudes within species according to the gene genealogy?

## **Materials and methods**

### **Sampling strategy**

The study area belongs to the eastern coast of the BAF, in Serra do Mar mountain chain. The sampling was performed at the PARNASO in the State of Rio de Janeiro. Four points were sampled at each altitude: at 404; 1,016; 1,658; and 2,124 m above the sea level (Figure 10). For each collected point, three simple samples (0-20 cm deep) were collected to form a composite sample, totaling 16 samples. Soil samples were placed in sterile paper bags and transferred to the Mycology laboratory at the Universidade de Brasilia (UnB) for further analyses.



**Figura 10. Geographical location of the PARNASO in the Rio de Janeiro State, Brazil; and the four collected points in altitudes ranging from 404 to 2,124 m.**

### Soil characterization

The physicochemical analysis of the samples was performed in the Laboratory of Soil Analysis, Vegetable Tissue and Fertilizer at the Universidade Federal de Viçosa (UFV), according to recommendations from Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (Donagema et al. 2011). The phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), aluminum (Al), exchangeable acidity (H + Al), organic

matter (OM), sand, silt and clay were evaluated in that analysis. These results were used to calculate the following parameters: sum of exchangeable bases (SB), cation exchange capacity at pH 7.0 (T), capacity of effective cation exchange (t), aluminum saturation index (m) and base saturation index (V) (Donagema et al. 2011).

### **Yeast isolation and identification**

From each soil samples, ten grams were homogenized in 90 ml of 0.1% peptone water (w/v). The suspension was vortexed using a shaker for 1 hour at 200 rpm. All soil samples were analyzed in three replicates and each of them was used to produce three 10-fold dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  and  $10^{-3}$ ). Then, the dilutions were plated onto YM medium [0.3% (w/v) malt extract, 0.3% (w/v) yeast extract, 0.5% (w/v) peptone, 1% (w/v) glucose, 2% (w/v) agar]. Chloramphenicol (34 mg/mL) and 0.25% sodium propionate (w/v) were added in the culture medium to inhibit bacterial and filamentous fungi growth, respectively. The Petri dishes were incubated at 28°C for 2–5 days.

The yeast colonies grown were divided into morphological types and each colony type was isolated in pure cultures. The pure cultures were morphologically characterized as described by Dias and Schwan (2010). These cultures were stored in glycerol 25% in a freezer at -80 °C, and then deposited in Yeast Culture Collection of the Department of Plant Pathology at the Universidade de Brasília (UnB).

The genomic DNA extraction was performed from the cell precipitate obtained by centrifugation of yeast culture grown in YM medium liquid. Cells were lysed using extraction buffer (200 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8, 0.5 % SDS, Triton X-100). Proteins were precipitated with chloroform: isoamyl alcohol (24:1) and subsequently centrifuged for 10 min at 16,000 g. The DNA was precipitated with isopropanol for 1 hour at -20°C. The DNA samples were centrifuged and washed with 70 % ethanol (Kurtzmann and Fell 1998). The DNA was then suspended in 30 µL of milli-Q water and stored at -20 °C.

The D1/D2 domain of the LSU rRNA gene was amplified by PCR using the following universal primers: NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') and NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') to identify ascomycetes and basidiomycetes (Kurtzmann and Robnett 1998; Fell et al. 2000). PCR reactions were

performed for a total volume of 25 µl, containing 1X PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) (Sigma), 0.2 mM dNTPs (Invitrogen), 0.4 µM primers (Invitrogen), 1.25 U Taq DNA polymerase (Sigma), and 1 µl of genomic DNA. Amplification reactions were carried out in a Thermal Cycler (BioRad) with the PCR conditions: initial denaturation at 94 °C for three minutes; followed by 33 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 56 °C for 45 s and extension at 72 °C for a 2 min; and final extension at 72 °C for 7 min. The PCR products were purified using a USB® ExoSAP-IT® Kit (Affymetrix®) according to the manufacturer's instructions.

The purified PCR products were sequenced at the Universidade Católica de Brasília (UCB, Brasilia, Brazil), using the sequencer ABI 3130xl Applied Bio systems, according to Sanger methodology (Sanger et al. 1997). We used the program Sequencher 4.8 (Gene Codes Corporation, [www.genecodes.com](http://www.genecodes.com)) to edit the sequences. For species identification, the nucleotide sequences were compared with data deposited in the NCBI ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) using the BLAST(n) algorithm (Altschul et al. 1990). The sequences of the isolates were deposited in GenBank ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)), with the access codes: MK626569 - MK626644.

### **Multivariate and haplotype network analyses**

The physical-chemical attributes of the soils were submitted to analysis of variance and the means were compared by the Scott-Knott test at 5% probability using the Assisat 7.7 statistical program (Silva and Azevedo 2016).

Principal Component Analysis (PCA) was performed using a correlation matrix in which the values of soil physical-chemical composition were used to identify similarities between the samples that were collected at different altitudes. The Venn diagram was constructed to analyze the similarity of the yeast communities between the altitudes. The two analyzes were performed in the R software (R Core Team 2017), using the 'FactoMineR' package (Lê et al. 2008) and 'VennDiagram' package (Chen and Broutos 2011).

In order to infer the gene genealogy among the four altitudes, we used the sequences from the species *Saitozyma podzolica* that was the most abundant in all altitudes (Table 1). The species *Meyerozyma guilliermondii*, although occurred in all

altitudes, exhibited no polymorphic site. The alignment was performed using the Geneious Alignment tool available in the Geneious Prime 2019.0.4 program (www.geneious.com). The DnaSP 5.10 program (Librado and Rozas 2009) determined the haplotypes in the alignment and inferred the diversity of the sequences. Based on coalescent theory, the NETWORK 4.5.1.6 program (www.fluxus-technology.com) inferred the gene genealogy using the Median Joining haplotype network (Bandelt et al. 1999).

## Results

### Yeast inventory and community analysis

We isolated 76 isolates in the present study, which represent 10 yeast species (Table 1). We did not count the Colonies Forming Units (CFUs) due to the low number of yeast colonies per plate seeded (<15). This low number seems to be related to the type of soil, which was collected away from rhizosphere. Indeed, larger yeast populations usually occur in the rhizosphere (Sarabia et al. 2018; Glushakova et al. 2017; Mushtaq and Hashmi 2004). We did not identify the isolate belonging to the genus *Apiotrichum* at the level of species using only the D1/D2 domain.

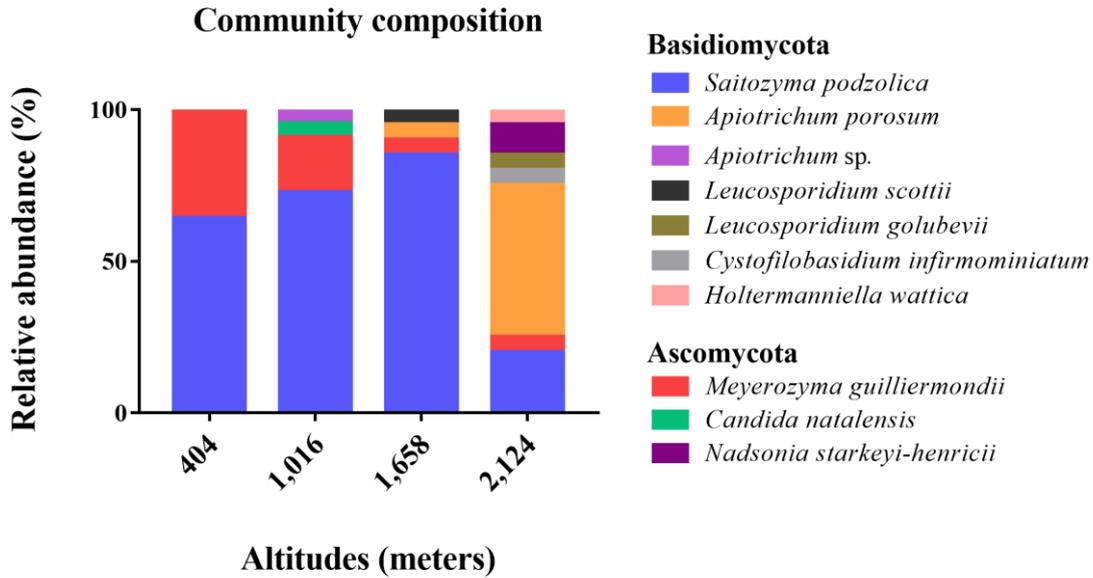
**Tabela 1. Inventory and abundance of yeast taxa isolated at four altitudes of the PARNASO.**

Yeast taxa	GenBank closest	Total nº of isolates	Number of isolates			
			404 m	1,016 m	1,658 m	2,124 m
<b>Basidiomycota</b>						
Tremellales						
		46				
<i>Saitozyma podzolica</i>	KU316780	(60.53%)	9	16	17	4
Trichosporonales						
		11				
<i>Apiotrichum porosum</i>	AB726863	(14.47%)			1	10
<i>Apiotrichum</i> sp.	EF653947	1 (1.32%)		1		
Leucosporidiales						
<i>Leucosporidium scottii</i>	AB726968	1 (1.32%)			1	
<i>Leucosporidium golubevii</i>	AY212997	1 (1.32%)				1
Cystofilobasidiales						
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	DQ645523	1 (1.32%)				1
Holtermanniales						
<i>Holtermanniella wattica</i>	FN428959	1 (1.32%)				1
<b>Ascomycota</b>						

Saccharomycetales		11				
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	AB773379	(14.47%)	5	4	1	1
<i>Candida natalensis</i>	AB436394	1 (1.32%)		1		
<i>Nadsonia starkeyi-henricii</i>	FR716592	2 (2.63%)				2
<b>Total</b>			<b>76</b>	<b>14</b>	<b>22</b>	<b>20</b>

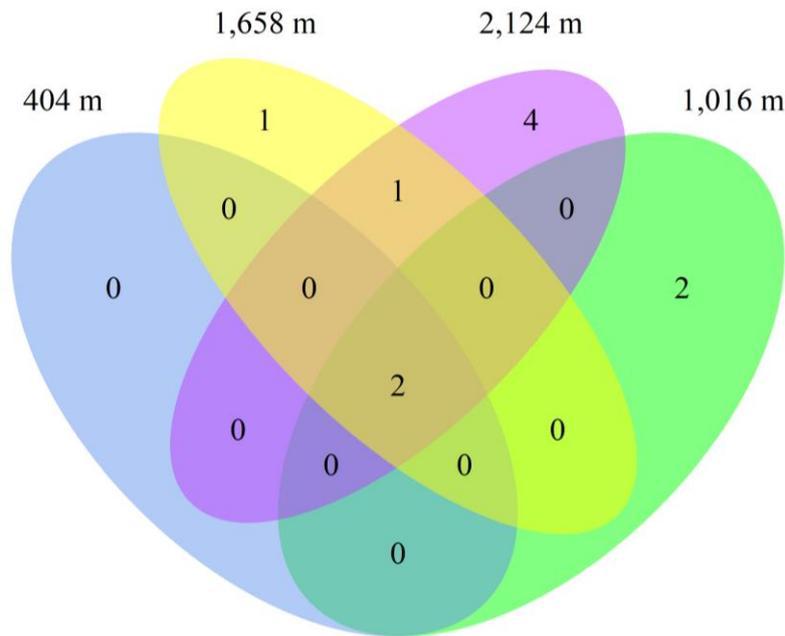
We obtained a higher number of basidiomycetous species (7 species, 81.5% of isolates) than the number of ascomycetous species (3 species). The order Tremellales represented the largest number of strains (46 strains), followed by Trichosporonales (11 strains) and Leucosporidiales (2 strains). All ascomycetous species belonged to the order Saccharomycetales and represent 18.5% of the total of yeasts isolated (Table 1). Within the phylum Basidiomycota the species *Saitozyma podzolica*, *Apiotrichum* sp., *A. porosum*, *Leucosporidium scottii*, *L. golubevii*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *Holtermanniella wattica* were isolated. Whereas the phylum Ascomycota, the species *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida natalensis* and *Nadsonia starkeyi-henricii* were obtained. *Saitozyma podzolica* was the most frequently recovered species, representing 60.53% of the isolates, followed by *M. guilliermondii* and *A. porosum*, each one represented by 14.47% of the isolates. The other species represented less than 2% of the total isolates each.

The altitude 1 (404 m) and altitude 2 (1,016) showed similar community composition, sharing two species between them. The yeast community in the altitude 3 (1,658 m) represented a transition among the altitudes, sharing species either from altitude 2 or from altitude 4. The altitude 4 (2,124 m) was the most diverse community, harboring seven species with four unique species for this altitude (Figure 11).



**Figure 11. Relative abundance and taxonomic composition of soil yeast communities at four altitudes (404; 1,016; 1,658; and 2,124 m) of the PARNASO.**

*Saitozyma podzolica* and *M. guilliermondii* were isolated in all altitudes indicating their wide distribution. *Apiotrichum porosum* was isolated in the highest altitudes, i.e., 1,658 and 2,124 m. Some yeast species were isolated only in one of the altitudes. Out of them, four species (*L. golubevii*, *C. infirmominiatum*, *H. wattica* and *N. starkeyi-henricii*) were recovered solely at 2,124 m, two species (*Apiotrichum sp.* and *C. natalensis*) at 1,016 m and one species (*L. scottii*) at 1,658 m (Figure 12).



**Figura 12.** A Venn diagram showing yeast species distributions from PARNASO soils sampled at 404; 1,016; 1,658; and 2,124 m. The number of shared species in those altitudes are represented. The different circles represent each sampled altitude and the intersections between them highlight the yeast species that coexisted in the aforementioned altitudes.

### *3.2 Soil characterization*

The samples soils of altitudes 1, 2 and 4 (404; 1,016; and 2,124 m) analyzed in this study were sandy clay while the one from altitude 3 (1,658 m) was sandy/ sandy clay according to the textural classification of the Brazilian Soil Science Society (SBCS). All four soils samples had the same clay content. There were no statistical differences between the content of soil particles (Table 2).

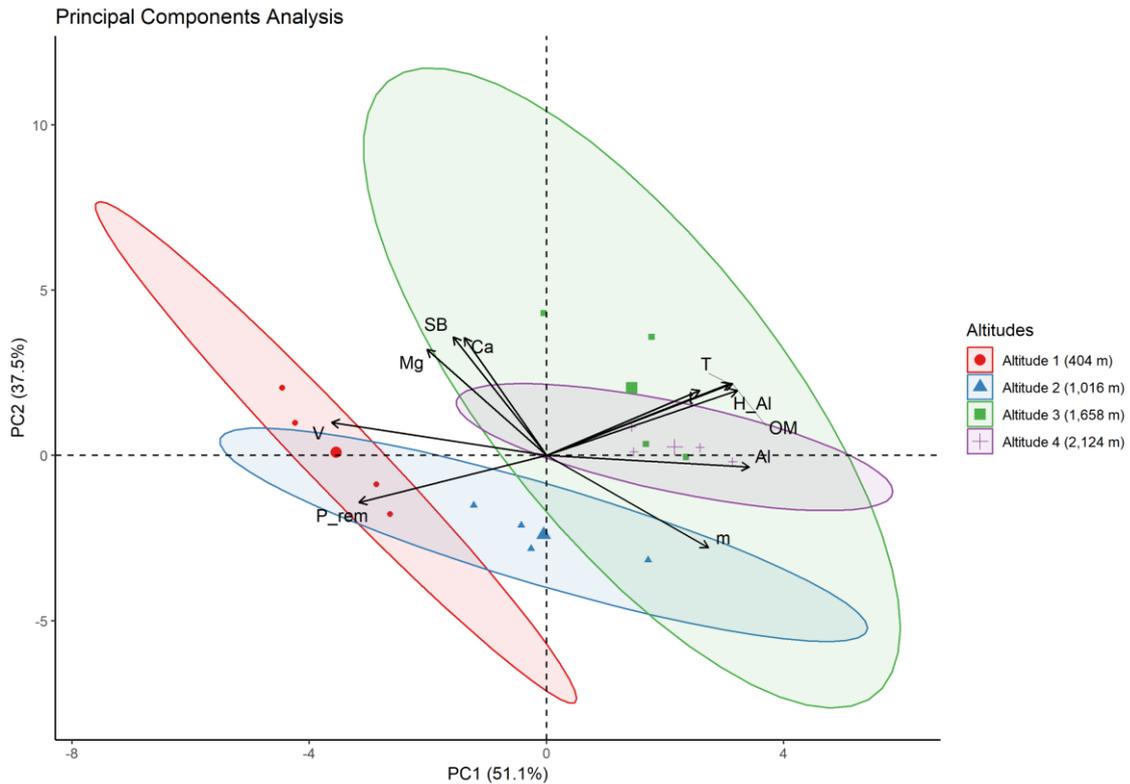
**Tabela 2. Mean values of the chemical and physical properties of the soils at 404; 1,016; 1,658; and 2,124 m the of the PARNASO.**

Property <sup>a</sup>	404 m	1,016 m	1,658 m	2,124 m
pH (H <sub>2</sub> O)	4.54	4.61	4.58	4.67
P (mg dm <sup>-3</sup> )	2.02 b	4.07 ab	8.07 ab	31.80 a
K (mg dm <sup>-3</sup> )	48.75 a	39.50 a	51.25 a	42.75 a
Ca <sup>2+</sup> (cmol dm <sup>-3</sup> )	0.45 a	0.23 a	0.45 a	0.35 a
Mg <sup>2+</sup> (cmol dm <sup>-3</sup> )	0.16 a	0.08 b	0.15 a	0.10 ab
Al <sup>3+</sup> (cmol dm <sup>-3</sup> )	1.30 b	1.70 ab	1.70 ab	2.05 a
H+Al (cmol dm <sup>-3</sup> )	5.30 c	7.40 b	13.02 a	11.47 a
SB (cmol dm <sup>-3</sup> )	0.73 a	0.41 a	0.73 a	0.57 a
t (cmol dm <sup>-3</sup> )	2.03 b	2.11 b	2.43 ab	2.62 a
T (cmol dm <sup>-3</sup> )	6.03 b	7.81 b	13.76 a	12.04 a
V (%)	12.10 a	5.35 b	5.27 b	4.90 b
m (%)	64.12 b	80.12 a	70.10 ab	78.07 a
OM (kg dag <sup>-1</sup> )	1.88 b	3.19 b	8.33 a	8.48 a
P-rem (mg L <sup>-1</sup> )	25.87 a	21.92 ab	10.02 c	16.37 bc
Coarse sand (g kg <sup>-1</sup> )	0.43 a	0.46 a	0.44 a	0.45 a
Thin sand (g kg <sup>-1</sup> )	0.14 a	0.13 a	0.17 a	0.14 a
Silt (g kg <sup>-1</sup> )	0.13 a	0.13 a	0.14 a	0.14 a
Clay (g kg <sup>-1</sup> )	0.28 a	0.25 a	0.23 a	0.24 a

<sup>a</sup> pH in water, KCl and CaCl<sub>2</sub>; soil:solution 1:2.5; Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Al<sup>3+</sup>: extractor 1 mol L<sup>-1</sup> KCl; H+Al: extractor SMP; SB: sum of bases; T: cation exchange capacity at pH 7.0; t: effective cation exchange capacity; V: bases saturation; m: aluminum saturation; Rem-P: remaining phosphorus; OM: organic matter, oxidation Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 4N + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N; P, K, Fe, Zn, Mn, Cu: Mehlich-1 extractor; S: extractor Monocalcium Phosphate Acetic Acid; B: hot water extractor.

In addition, all soils samples were slightly acid and had similar nutrient contents for K and Ca, that is, there are no statistical differences between the samples. On the other hand, Mg and Al contents were statistically different among the samples at 404 m and at 2,124 m. The P contents had the highest values at 2,124 m. The soil parameters OM, t, T, V, m and H + Al had relative statistical differences among the four altitudes.

Principal component analysis showed the association of environmental characteristics and distribution of soil samples at each site, with axes 1 and 2 explaining 88.6% of the effects of these variables (Figure 13).

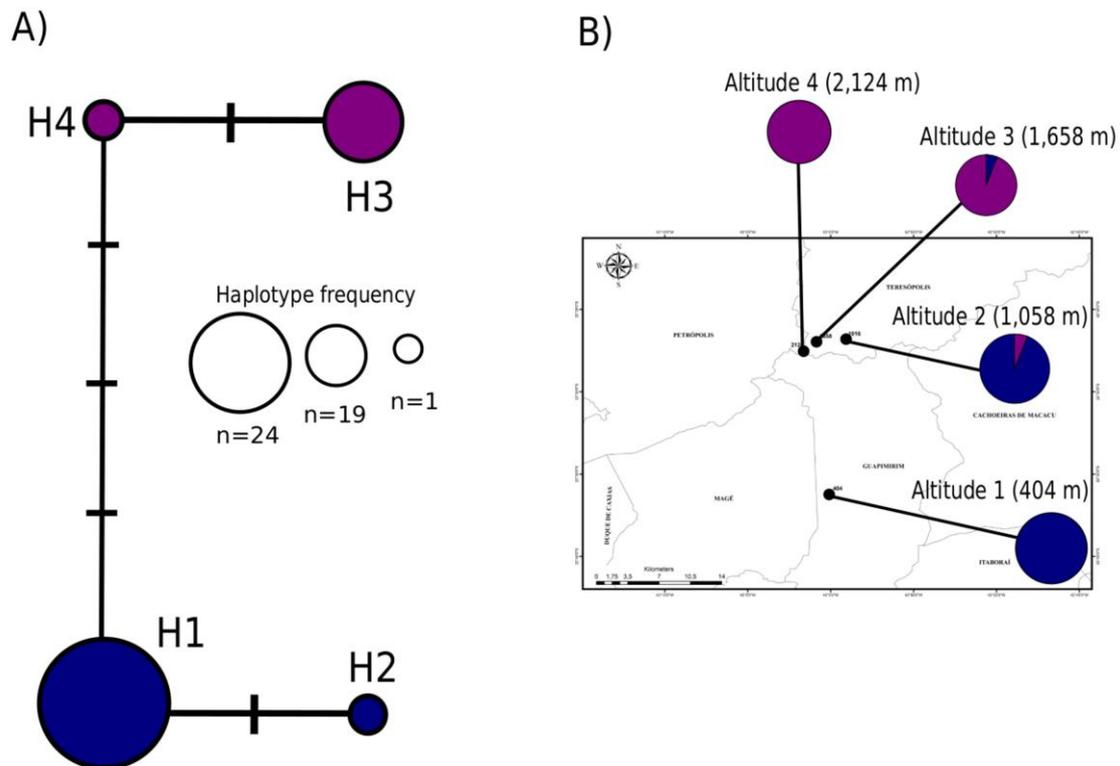


**Figure 13. Principal component analysis using data for physicochemical soil characteristics in four different altitudes of the PARNASO.**

Principal component 1 (PC1) explained most of the variability of the data (51.1%), distributing the samples in four groups. We verified a sample distribution pattern and the influence of each variable. Altitude 2 overlaps Altitude 1 and 3 and are positively correlated with m, V and P-rem attributes. Altitude 4 overlaps only with altitude 3 and it is positively correlated with attributes t, T, OM, H + Al and Al.

## Gene genealogy

The alignment of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene sized 540 bp of 45 sequences of *S. podzolica*. One sequence from altitude 1 was removed from the analysis due to its shorter size (513 bp). For the analysis, we did not consider missing data and neither sites with gaps. We observed five substitutions, three transitions and two transversions. Out of 45 isolates, four haplotypes were obtained and they were subdivided into two genealogical lineages separated by four mutation steps (Figure 14A). One lineage, depicted in blue, occurred in the first three altitudes (1, 2, and 3), but specially in the lower altitudes 1 and 2 (Figure 14B). The second lineage, depicted in purple, appeared in altitudes 2, 3, and 4, and contrarily to the first lineage, its frequency was greater in the higher altitudes (3 and 4). Interestingly, this admixture takes place in the middle altitudes. The haplotype H1 was the most frequent (n=24) and it occurred in altitudes 1, 2 and 3, while H2 (n=1) only in altitude 2. The haplotype H3 was the second more frequent (n=19) and appeared in altitudes 3 and 4, while the H4 (n=1) only in altitude 4. The D1/D2 domain gene genealogy indicated the diversity is likely related to similar altitudes.



**Figura 14. Median-joining network of the four haplotypes of *Saitozyma podzolica*. A) The four haplotypes (H1, H2, H3 and H4) belong to two genealogical lineages, one depicted in blue and another one depicted in purple. The circle sizes are proportional to the relative frequencies, major circle (n=24), medium circle (n=19) and small circles (n=1). The number of mutation steps are indicated with small bars when more than one step occurs. B) The distribution of the haplotypes along the altitudinal gradient (altitudes 1, 2, 3, and 4).**

## Discussion

The yeast community composition differed along the altitude gradient in soil. The taxonomic analyses revealed that the Basidiomycota Phylum was more predominant than the Ascomycota, which is in agreement with other studies on soil yeast communities (Sláviková and Vadkertiová 2000; Sláviková and Vadkertiová 2003; Connell et al. 2008; Stringini et al. 2008; Pimenta et al. 2009; Yurkov et al. 2012; Mestre et al. 2014; Yurkov et al. 2016; Moreira and Vale 2018). Indeed, basidiomycetes are dominant in forest soils because some genera produce polysaccharide capsules, which play an important role in the competition with other soil microorganisms (Vishniac 2006). In addition, they are able to better use the nutrients available in oligotrophic systems (Connell et al. 2008).

A complex set of environmental factors affects the composition and structure of the yeast community, including the altitudinal gradient (Mestre et al. 2014). Even within the same geographic region, these factors may vary considerably, suggesting that yeast populations in altitudinal gradient are affected by soil characteristics and environmental factors such as temperature, UV radiation and climatic change.

Altitude 4 (2,124 m) exhibited the higher community diversity. This altitude is characterized as dry appearance vegetation, shallow soil, intense solar radiation, and low temperatures (Safford 1999). This set of conditions may favor the emergence of yeast species adapted to this environment, thus forming a unique and diverse community (Figure 11). Remarkably, four species were isolated only at this altitude (Figure 12). Interestingly, *S. podzolica* and *M. guilliermondii*, the most abundant species at other altitudes, displayed low relative abundance at altitude 4. This altitude has a phytophysiology known as Campos de Altitude, whose vegetation is characterized as a mosaic of shrubs and small copses of short trees that often develops on rocky outcrops (Safford 1999; Cronenberger and Viveiros-de-Castro 2007). It is completely different from the vegetation types found at other altitudes. Due to the low vegetation in altitude 4, microorganisms are more exposed to UV radiation. Notably, *C. infirmominiatum*, a species identified herein, is part of the group of yeasts species known as pigmented (reddish-pink yeasts). The presence of carotenoid pigments has been associated with tolerance to UV radiation (Fonseca and Inácio 2006), thus they could act as photoprotective compounds due to its antioxidant properties (Libkind et al. 2009).

Low temperature in highlands is another environmental factor that may have influenced the diversification of the yeast community. The average annual temperature in the park varies from 13 to 23 °C and may reach 5 °C negative in the highest sites (Oliveira-Filho and Fontes 2000). Thus, the occurrence of the psychrophilic species *L. scottii* and *L. golubevii* only in higher altitudes seems to be related to those conditions (Deak 2006). Moreover, *H. wattica* (García et al. 2007; Branda et al. 2010), *C. infirmominiatum* and *A. porosum* (Mestre et al. 2014), which have often been related to low temperature environments, were isolated only at altitude 4.

The soil collected at altitude 4 displayed high levels of phosphorus (Table 2), indeed the rocks are one of the main reservoirs of this macronutrient (Bini and Lopez 2016). Some yeast species are able to grow under rocks, contributing to weathering processes, soil formation, and solubilization of insoluble nutrients to the soil microbial community (Botha 2006). Indeed, we identified the species *M. guilliermondii* at altitude 4, which is described as phosphate-solubilizing soil yeast (Nakayan et al. 2013; Sarabia et al. 2018). It is noteworthy that *A. porosum* was the species with the highest relative abundance at altitude 4. Consistent with our results, Mestre et al. (2014) reported that *A. porosum* was one of the species with highest relative abundance in samples of Patagonian forest soils, whose annual average temperature is 10 °C, reaching values up to -20 °C. This yeast is a typical soil species able to degrade hemicellulose and phenolic compounds. In addition, it is able to assimilate typical plant compounds by actively participating in the mineralization of plant material on soils with relatively low temperatures (Middelhoven et al. 2001).

The *S. podzolica* species, which belong to the Basidiomycota Phylum, was the most abundant species along all four altitudes and occurred with a high frequency of isolation, making it suitable to analyze the gene genealogy. This species is a typical inhabitant of soils characterized by high organic matter content, aluminum, iron oxides and acid soils (Buzzini et al. 2017; Yurkov 2018). The haplotype network evidenced a relationship between the altitude within the species. Genetically closer haplotypes belonged to similar altitudes. Herein, altitudes 1 and 2 were genetically closer, such as in altitudes 3 and 4. The genetic differences associated with altitudinal gradient and its features such as temperature, soil properties, vegetation may be likely due to selection pressure that the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene has undergone. Indeed, the soil characteristics from altitude 3 and 4 were different from those at altitudes 1 and 2. Overall habitats with similar properties harbor a similar yeast community (Yurkov 2017). Additionally, altitude 3 exhibited a genetic admixture in the *S. podzolica* sequences, which corroborates with the transition feature of the yeast community observed in Figure 11. In both analyses, the sharing was between altitude 2 and 4.

Although it is a preliminary description of the occurrence and diversity of yeasts, this is the first study that evaluated the influence of an altitudinal gradient in yeast communities in the Brazilian Atlantic forest soils. Thus, further studies are needed with

a greater sample effort in order to understand the distribution of these species in Brazilian soils and their ecological role. Since yeasts play an important ecological role in soil as in nutrient cycling (e.g. phosphate solubilization) (Botha 2011), studies should be performed to evaluate possible ecological traits present in the strains found.

Taken together, our results highlight the importance of studies to characterize yeast communities, as well as to elucidate their distribution in areas of extreme biological importance, once it contains one of the largest remnants of the Atlantic Rainforest, such as this National Park.

In conclusion, our data reveal that the yeast communities from the higher altitude exhibited greater diversity, with an increased diversification from lowland to highland. This diversity is likely related to changes in the type of vegetation (lower Montane Rain Forest to high-altitude grasslands). Also, the gene genealogy of *Saitozyma podzolica* suggests the genetic proximity among closer altitudes, which seems to be related to the soil physicochemical properties.

## References

- Aguiar A.P., Chiarello A.G., Mendes S.L., Matos E.N., 2003. The Central and Serra do Mar Corridors in the Brazilian Atlantic Forest, in: Galindo-Leal C. and Câmara I.G. (Eds.), *The Atlantic Forest of South America: Biodiversity status, threats and outlook*. Island Press, pp. 118-132.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215, 403-410.
- Ayres J.M., Fonseca G.A.B., Rylands A.B., Queiroz H.L., Pinto L.P., Masterson D., Cavalcanti R.B., 2005. *Os Corredores Ecológicos das Florestas Tropicais do Brasil*, Belém: Sociedade Civil Mamirauá.
- Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution.* 16, 37–48.
- Bini D., Lopez M.V., 2016. Transformações microbianas do fósforo. In: Cardoso, E.J.B.N. & Andreote, F.D. *Microbiologia do Solo*. Piracicaba: ESALQ. 221p.
- Botha A., 2006. Yeasts in soil, in: Rosa C.A., Péter G. (Eds). *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Heidelberg: Springer; 221-240.
- Botha A., 2011. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology and Biochemistry.* 43(1), 1–8.
- Branda E., Turchetti B., Diolaiuti G., Pecci M., Smiraglia C., Buzzini P., 2010. Yeast and yeast-like diversity in the southernmost glacier of Europe (Calderone Glacier, Apennines, Italy). *FEMS Microbiol. Ecol.* 72, 354-369.
- Buzzini P., Yurkov L.A., 2017. *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology*. Switzerland.
- Chen Y.L., Xu, T.L., Veresoglou S.D., Hu H.W., Hao Z.P., Hu Y.J., Liu L., Ye Deng Y., Rillig M.C., Chen B.D., 2017. Plant diversity represents the prevalent determinant of soil fungal community structure across temperate grasslands in northern China. *Soil Biology & Biochemistry.* 110, 12-21.
- Chen H., Boutros P.C., 2011. VennDiagram: a package for the generation of highly customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics*, 12(35).
- Connell L., Redman R., Craig S., Scorzetti G., Iszard M., Rodriguez R., 2008. Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microb Ecol.* 56, 448-459.
- Cronenberger C., Viveiros-de-Castro E., 2007. *Ciência e conservação na Serra dos Órgãos*. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília. 296p.
- Deak T., 2006. Environmental factors influencing yeasts, in: Rosa C.A., Peter G. (Eds) *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer-Verlag, Berlin, pp 155–174.
- Dias D.R., Schwan R.F., 2010. Isolamento e identificação de leveduras, in: Moreira

F.M.S., Huising E.J., Bignell D.E., (Eds). Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade. Lavras: Editora UFLA, 227-277.

Donagema G.K., Campos D.V.B., Calderano S.B., Teixeira W.G., Viana J.H.M., 2011. Manual de métodos de análise do solo. 2. ed. rev. Rio de Janeiro: Embrapa Solos.

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

Fonseca A, Inácio J., 2006. Phylloplane yeasts, in: Rosa C., Péter G. (Eds). Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Heidelberg: Springer, 263-302.

França L., Sannino C., Turchetti B., Buzzini P., Margesin R., 2016. Seasonal and altitudinal changes of culturable bacterial and yeast diversity in Alpine forest soils. *Extremophiles*. doi:10.1007/s00792-016-0874-2

García V., Coelho M.A, Maia T.M., Rosa L.H., Vaz A.M., Rosa C.A., Sampaio J.P., Gonçalves P., van Broock M., Libkind D., 2015. Sex in the Cold: Taxonomic Reorganization of Psychrotolerant Yeasts in the Order Leucosporidiales. *FEMS Yeast Research*. 15 (4), 1–12.

García V., Brizzio S., Libkind D., Buzzini P., van Broock M., 2007. Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59, 331- 341.

Glushakova A.M., Kachalkin A.V., Tiunov A.V., Chernov I.Y., 2017. Distribution of Yeast Complexes in the Profiles of Different Soil Types. *Eurasian Soil Science*. 50(7), 820–825.

Glushakova A.M., Kachalkin A.V., Chernov I.Y., 2015. Effect of invasive herb species on the structure of soil yeast complexes in mixed forests exemplified by *Impatiens parviflora* DC. *Microbiology*. 84(5), 717–721.

Jain R., Pandey A., 2016. Soil enzymes and microbial endophytes as indicators of climate variation along an altitudinal gradient with respect to wheat rhizosphere under mountain ecosystem. *Rhizosphere*. 2, 75–84.

Kurtzman C.P., Fell J.W., 1998. The yeasts: a taxonomic study. Fourth Revised and Enlarged Edition. Elsevier, Amsterdam.

Kurtzman C.P., Robnett C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73(4), 331–371.

Lachance M.A, Daniel H.M., Meyer W., Prasad G.S., Gautam S.P., Boundy-mills K., 2003. The D1/D2 Domain of the Large-Subunit RDNA of the Yeast Species *Clavispora lusitanae* Is Unusually Polymorphic. *FEMS Yeast Research*. 4, 253–58.

Lê S., Josse J., Husson F., 2008. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis.

*Journal of Statistical Software*. 25(1), 1-18.

Libkind D., Moliné M., Sampaio J.P., van Broock M., 2009. Yeasts from high-altitude lakes: influence of UV radiation. *FEMS Microbiology Ecology*. 69, 353–362.

Librado P., Rozas J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25, 1451-1452.

Matute D.R., McEwen J.G., Puccia R., Montes B.A., San-blas G., Bagagli E., Rauscher J.T., Restrepo A., Morais F., Niño-Vega G., Taylor J.W., 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Molecular Biology and Evolution*. 23 (1), 65–73.

Mestre M.C., Rosa C.A., Safar S.V.B., Libkind D., Fontenla S.B., 2011. Yeast communities associated with the bulk-soil, rhizosphere and ectomycorrhizosphere of a *Nothofagus pumilio* forest in northwestern Patagonia, Argentina. *FEMS microbiology ecology*. 78(3), 531–41.

Mestre M.C., Fontenla S., Rosa C.A., 2014. Ecology of cultivable yeasts in pristine forests in northern Patagonia (Argentina) influenced by different environmental factors. *Canadian journal of microbiology*. 60(6), 371–82.

Middelhoven W.J., Scorzetti G., Fell J.W., 2001. *Trichosporon porosum* comb. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast inhabiting soil, related to the *loubieri/laibachii* group of species that assimilate hemicelluloses and phenolic compounds. *FEMS Yeast Res*. 1(1), 15–22.

Morellato L.P.C., Haddad C.F.B., 2000. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica*. 32(4), 786–792.

Moreira G.A.M., Vale H.M.M., 2018. Occurrence of yeast species in soils of the *Quadrilátero Ferrífero* Region in Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Cienc Solo*. 42.

Mushtaq M., Hashmi M.H., 2004. Isolation and identification of yeast flora from soil of karachi. *Pakistan*. 36(1), 173–180.

Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., Fonseca G.A., Kent J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403, 853–858.

Nakayan P., Hameed A., Singh S., Young L.S., Hung M.H., Young C.C., 2013. Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. *Plant Soil*. 373, 301–315.

Oliveira-Filho A.T., Fontes M.A.L., 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica*. 32, 793–810.

Pimenta R.S., Alves P.D.D., Almeida G.M.F., Silva J.F., Morais P.B., Corrêa A., Rosa C.A., 2009. Yeast communities in two Atlantic rain Forest fragments in Southeast

Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40(1), 90–95.

R Development Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org>.

Ribeiro C.M., Metzger J.P., Martensen A.C., Ponzoni F.J., Hirota M.M., 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*. 142(6), 1141–1153.

Safford H.D., 1999. Brazilian Páramos I. An introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. *Journal of Biogeography*. 26, 693–712.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., 1997. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 74, 5463-5467.

Sarabia M., Cazares S., González-Rodríguez A., Mora F., Carreón-Abud Y., Larsen J., 2018. Plant growth promotion traits of rhizosphere yeasts and their response to soil characteristics and crop cycle in maize agroecosystems. *Rhizosphere*. 6, 67–73.

Silva F.A.S., Azevedo C.A.V., 2016. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *Afr J Agr Res*. 11, 3733-3740.

Sláviková E., Vadkertiová R., 2000. The occurrence of yeasts in the forest soils. *J Basic Microbiol*. 40, 207-212.

Sláviková E., Vadkertiová R., 2003. The diversity of yeasts in the agricultural soil. *J Basic Microbiol*. 43, 430-436.

Stringini M., Comitini F., Taccari M., Ciani M., 2008. Yeast diversity in crop-growing environments in Cameroon. *International Journal of Food Microbiology*. 127, 184–189.

Vishniac H.S., 2006. A multivariate analysis of soil yeasts isolated from a latitudinal gradient. *Microbial ecology*. 52(1), 90–103.

Yurkov A.M., 2018. Yeasts of the soil – obscure but precious. *Yeast*. 35, 369–378.

Yurkov A., 2017. Temporal and Geographic Patterns in Yeast Distribution, in: P. Buzzini, M. Lachance, A. Yurkov (Eds.). *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology*. Springer International Publishing, pp. 299.

Yurkov A.M., Wehde T., Federici J., Schafer A.M., Ebinghaus M., Lotze-Engelhard S., Mittelbach M., Prior R., Richter C., Rohl O., Begerow D., 2016. Yeast diversity and species recovery rates from beech forest soils. *Mycol Prog*. 15(8), 845–859.

Yurkov A.M., Kemler M., Begerow D., 2012. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal Ecology*. 5(1), 24–35.

### **CAPÍTULO 3 – Soil yeast community in revegetated iron-mining site is more diverse than in adjacent native areas**

*Manuscrito submetido para a revista Applied Soil Ecology, Qualis Capes B1 para CBIII.*

Geisianny Augusta Monteiro Moreira<sup>1</sup>, Helson Mario Martins do Vale<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900, Brasília/ DF, Brazil. gamm.bio@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Fitopatologia, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900, Brasília/ DF, Brazil. helson@unb.br

\*Corresponding author

Helson Mario Martins do Vale, Departamento de Fitopatologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília – UnB, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília/ DF, Brazil. CEP: 70910-900. Phone.: (+55) 61 31073060, Fax: (+55) 61 31072931, E-mail: helson@unb.br

## **Abstract**

Mining industry has strong ties to the state of Minas Gerais due to its rich mineral deposits. Mining activities have caused abrupt land-use changes that affect soil microbiomes. This study aimed to evaluate the soil yeast communities in a mining site under revegetation and pristine ecosystems, in dry and rainy season. Yeast communities were described with ecological indices and species accumulation curves, and their association with soil attributes and season was assessed using multivariate analysis. We isolated and identified 295 soil yeasts, representing 37 species which describe 84% of the estimated richness by Chao2. Ascomycetous yeasts dominated over basidiomycetous species. *Candida maltosa* represented the most frequent species. Revegetated area showed the greatest richness of taxon. The soil attributes affecting yeast communities comprised soil texture and micronutrients, such as Mg, B and P-rem. Overall, each ecosystem showed a particular assemblage of species as a result of local environmental characteristics.

**Keywords:** Soil ecology, Land use, Brazilian soils, Iron mining, Yeast diversity, Neotropical savannas.

## Introduction

Yeasts are characterized as a taxonomically heterogeneous group of unicellular fungi, and are widely distributed in various habitats (Péter et al. 2017). In soils, yeast distribution and abundance is heterogeneous (Botha 2011), and influenced by several environmental factors (Golubtsova et al. 2007; Yurkov et al. 2012; Mestre et al. 2014; Glushakova et al. 2017), including anthropogenic modification (Moreira and Vale 2018).

Due to its rich mineral deposits the Minas Gerais state has strong ties to the mining industry. A portion of the state known as the Iron quadrangle (*Quadrilátero Ferrífero*) region, about 7200 km<sup>2</sup>, is attractive to the mining industry due to its significant mineral resources, particularly gold and iron (Azevedo et al. 2011; Skirycz et al. 2014). Iron mining is responsible for 5 to 6% of the Brazilian gross domestic product (Skirycz et al. 2014; Vieira et al. 2018a). However, iron mining has a severe environmental impact, including the modification of soil structure, reduction of organic matter and nutrient availability, which results in damage to vegetation and soil microbiota (Mendes Filho et al. 2010).

The recovery of degraded areas is fundamental to minimize environmental impacts on biological processes of the whole ecosystem, such as community dynamics, nutrient cycling and energy flow (Gastauer et al. 2018). However, for the rehabilitation of degraded areas the establishment of a communities of plants is necessary, which is dependent on a diverse and functional microbial community (Klauber-Filho et al. 2002). Thus, knowledge about the diversity and function of the microbial community in these environments is important, mainly because of its crucial role in ecological processes such as cycling and bioavailability of nutrients.

A great effort has been undertaken to describe the soil microbiota diversity in the Iron quadrangle region, in order to compare pristine and disturbed ecosystems in iron-mining site. The richest bacterial diversity was found in ecosystems that have suffered anthropogenic action, with Proteobacteria as the most predominant phylum (Fernandes et al. 2018). Also, the highest genetic diversity of nitrogen-fixing bacteria was found in the rehabilitated area revegetated with grass (Castro et al. 2017). Arbuscular mycorrhizal fungi communities was more diverse in revegetated sites than pristine

adjacent ecosystems (Vieira et al. 2017; Teixeira et al. 2017). The soil microbiome in a mining site determined by metabarcoding approach revealed the highest values of alpha and beta diversities in revegetated sites (Vieira et al. 2018b).

These studies suggest that strategies for natural bioremediation in mining areas or adjacent areas under regeneration process in iron-mining areas can be explored. In addition to a greater diversity and richness of different functional groups of the soil, the revegetation area also exhibited greater specific enzymatic activity, indicating that the revegetation process with grasses favors the activity of the microbial community (Silva et al. 2018).

To the best of our knowledge, there is only one study in Brazil showing the yeast occurrence in soils with pristine and disturbed ecosystems in iron-mining site of the Iron quadrangle region (Moreira and Vale 2018). The yeast community was composed of six genera, with *Saitozyma podzolica*, a typical pedobiont species, predominating in all areas. Interestingly, the yeast community had high richness in the area with greater anthropogenic modification, rehabilitated with the use of non-native vegetation.

It is important to point that yeast communities participating in soil-related processes, including nutrient transformations, solubilize macronutrients such, as P and Ca, making them available for plants, ability to IAA synthesis, and as potential antagonists of soil-borne plant pathogens. Indeed, this finding may indicate a considerable ecological importance of the yeast communities in the recovery of degraded areas.

We hypothesized that the composition and structure of the yeast community in soils will be different according to the change in vegetation type between ecosystems, and more diverse in the ecosystem changed by mining due the ecological disturbance by the removal of natural vegetation cover. The aim is to describe the diversity of yeasts in different ecosystems (a); evaluate the community dynamics between two seasons (b); and to identify the relationship among the yeast communities and the vegetation type and soil physicochemical properties (c).

## Material and Methods

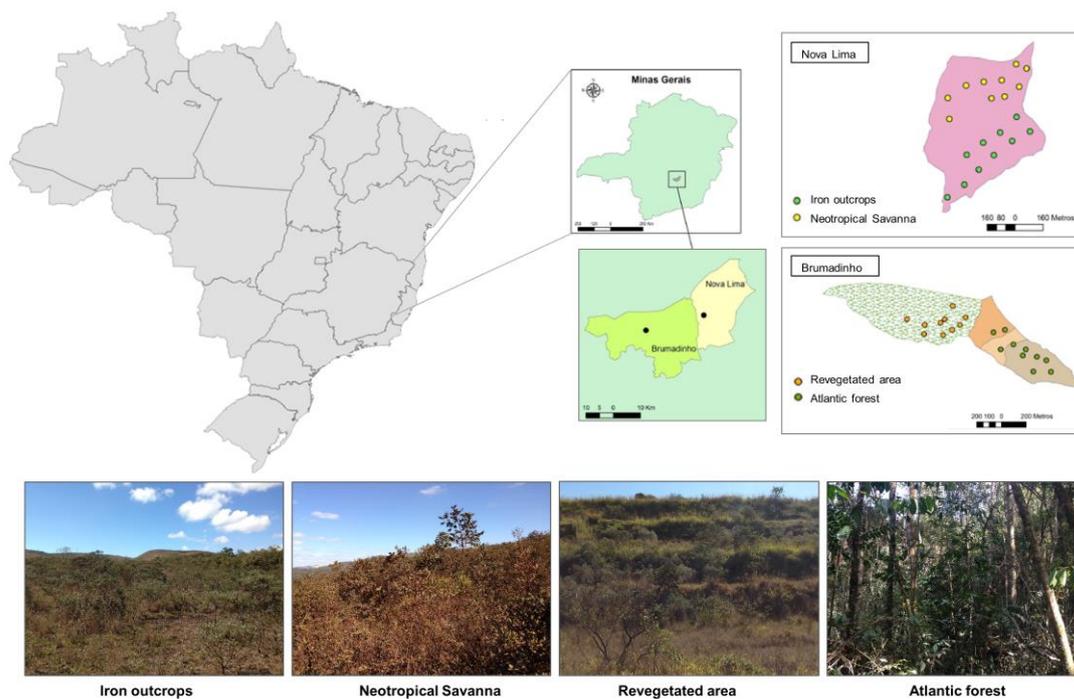
### Study area

The study areas were located near the cities Brumadinho and Nova Lima, both in the Iron quadrangle region, in the state of Minas Gerais, Brazil (Figure 15). This region has a warm temperate climate with two well-defined seasons: dry season (May to September) and rainy season (October to April). The mean annual temperature varies between 17 to 27°C and the mean precipitation is around 1600 mm per year (Table 3).

**Tabela 3. Geographical characteristics of ecosystems sampled in the Iron quadrangle region, Minas Gerais, Brazil.**

Geographical characteristics	Ecosystems			
	Neotropical savanna	Iron outcrops	Atlantic forest	Revegetated area
Locality	Nova Lima	Nova Lima	Brumadinho	Brumadinho
Latitude	20°6'42"S	20°6'52"S	20°9'4"S	20°9'35"S
Longitude	43° 57'28"W	43°57'27"W	44°8'47"W	44°9'5"W
Rainfall (mm)	1390	1390	1325	1325
Mean Annual Temperature (°C)	21.0	21.0	21.3	21.3
Impact level	None to low	None to low	None to low	High

Soil samples were collected in four ecosystems: Atlantic Forest (AF), semi-deciduous seasonal forest; Iron outcrops - Canga (IO), an ecosystems associated with superficial iron crusts typical for the Minas Gerais state; Neotropical Savanna (NS), a savanna type of vegetation "*Cerrado sensu lato*", and Revegetated area (RA), an iron-mining site under process of rehabilitation formed from slopes made to stabilize the iron ore storage area (Figure 15). The rehabilitation process in Revegetated area began in 2005, when mining activity ceased. Currently the area is dominated by grasses as *Urochloa brizantha* and *Panicum maximum*.



**Figura 15. Geographical location of studied areas, sampling points and ecosystems.**

### Sampling design

Soil samples were collected in the dry season (August 2015) and rainy season (January 2016). For each area, two transects were delimited, 50 to 70 m apart from each other. In each transect, five composite samples were collected (0 – 20 cm depth), resulting in 10 soil samples per area in each season. A total of 80 soil samples were collected (4 sites, 2 seasons, 10 samples). Samples were placed in plastic bags and stored at 4 °C to be analyzed at the Mycology Laboratory of the Department of Plant Pathology at *Universidade de Brasília* – UnB, Brasília, Brazil.

### Soil chemical analyses

Soil chemical analyzes were carried out at the *Universidade Federal de Lavras* – UFLA, Brazil, according to *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária* - Embrapa (Donagema et al. 2011). Concentrations of phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), aluminum (Al), zinc (Zn), iron (Fe), manganese (Mn), copper (Cu), boron (B), sulfur (S), exchangeable acidity (H + Al), organic matter (OM), remaining phosphorus (P-rem), sand, silt and clay were evaluated. These results were used to calculate other parameters, such as the sum of exchangeable bases (SB), cation

exchange capacity at pH 7.0 (T), effective cation exchange capacity (t), aluminum saturation index (m) and base saturation index (V). The pH of all samples was also determined.

### **Yeast isolation and identification**

For the isolation of cultivatable yeasts, 10 g of soil were homogenized with 50 ml of YM liquid (0.3% Malt extract; 0.3% Yeast extract; 0.5% Peptone; 1% Glucose), and stirred for 16 hours at 120 rpm and 28 °C. All soil samples were analyzed in three replicates, and each of the replicates was used to produce three dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , and  $10^{-3}$ ). The dilutions were plated on YM agar (0.3% Malt extract; 0.3% Yeast extract; 0.5% Peptone; 1% Glucose; 2% Agar). Sodium propionate (0.25%) and chloramphenicol ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) were used to inhibit the growth of filamentous fungi and bacteria, respectively. Incubation of all plates was performed at 28 °C until the growth of colonies. All yeast colonies grown were selected and purified in YM agar, and differentiated into macro morphological types (color, aspect, margin) using a dissection microscope (Dias and Schwan 2010). Pure cultures were cryopreserved ( $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) using YM liquid with 25% glycerol.

DNA extraction was performed from the cell precipitate, obtained by centrifugation of the yeast culture grown in YM liquid over 48 h at 28 °C under stirring, as described by Moreira and Vale (2018). The D1/D2 domains of the ribosomal LSU (Large Ribosomal Subunit) gene were amplified by PCR, using the following universal primers: NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') and NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') (Kurtzman and Robnett 1998; Fell et al. 2000). The PCR conditions were as follows: initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 33 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 56 °C for 30 s, and extension at 72 °C for a 1 min, and final extension at 72 °C for 6 min. The PCR products were treated with the Exo-SAP enzyme (Affymetrix, Inc. Cleveland, Ohio, USA) and sent to sequencing at ACTGene Molecular Analyzes (Rio Grande do Sul, Brazil), using the sequencer ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). For species identification, the obtained nucleotide sequences were compared with sequences deposited in the NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information), using the BLASTn algorithm (Altschul et al. 1990).

## **Community and multivariate analysis**

Species accumulation curves were calculated with the iNEXT package (Hsieh et al. 2016). The curve asymptote corresponds to the Hill numbers which include the three species diversity measures for the completeness samples: species richness ( $q = 0$ ), Shannon diversity ( $q = 1$ ) and Simpson diversity ( $q = 2$ ). Venn diagram was constructed to analyze the similarity of the yeast communities between the ecosystems and seasons using the VennDiagram package (Chen and Broutos 2011). Nonmetric multidimensional scale (NMDS) was used to visualize the differences among different ecosystems, soil physicochemical properties and the seasonal dynamics owing to yeast community composition. NMDS is a rank-based approach which produces an ordination based on a distance or dissimilarity matrix. Bray-Curtis, a popular similarity index for abundance data was calculated and an R test statistic (Stress values) was generated (Kuramae et al. 2012). Variables having the most significant influence on the microbial community structure were chosen by forward selection with permutation test. The NMDS was made with Vegan package (Oksanen et al. 2016). All the analysis was made in R software (R Development Core Team 2017).

## **Results**

### **Soil characterization**

Soil chemical characterization (Table 4) was performed using the recommendations of the Soil Fertility Commission of the State of Minas Gerais (Alvarez et al. 1999). Soils ranged from medium acidity (RA) to high acidity (NS, IO, and AF). Considering the content of organic matter (OM), and the cation exchange complex ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , SB, H+Al, t, T, and m), as parameters related to soil fertility, all areas presented low fertility conditions, with the RA being the one with the lowest values. The RA area also showed the highest values for base saturation (V), probably due to the revegetation process. AF soils had the highest clay content, and the IO soils had the highest sand content.

**Tabela 4. Soil chemical characterization of different ecosystems: Neotropical savanna (NS), Ironstone outcrops (IO), Atlantic Forest (AF), and a Revegetated area (RA) in two climate seasons (dry and rainy) in the Iron quadrangle, MG, Brazil.**

Soil physicochemical parameters	Ecosystems							
	NS		IO		AF		RA	
	Dry	Rainy	Dry	Rainy	Dry	Rainy	Dry	Rainy
pH (H <sub>2</sub> O)	4.97	4.66	4.72	4.46	4.21	3.91	5.6	5.36
K (mg dm <sup>-3</sup> )	72.6 a	83.8 a	56.8 a	64.0 a	75.6 a	78.0 a	88.2 a	85.2 a
P (mg dm <sup>-3</sup> )	1.363 b	1.623 b	1.595 b	2.275 b	2.151 b	2.125 b	1.66 b	3.626 a
Ca <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0.91 a	1.15 a	1.28 a	1.476 a	0.99 a	1.146 a	0.75 a	1.154 a
Mg <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0.38 a	0.461 a	0.24 a	0.269 a	0.45 a	0.506 a	0.3 a	0.364 a
Al <sup>3+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1.56 a	1.65 a	0.85 b	0.79 b	1.9 a	1.86 a	0.09 c	0.12 c
H+Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	15.46 b	21.41 a	12.64 b	22.01 a	12.26 b	18.53 a	1.94 c	2.64 c
SB (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1.478 a	1.826 a	1.665 a	1.909 a	1.633 a	1.852 a	1.276 a	1.737 a
t (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	3.03 b	3.47 a	2.51 b	2.69 b	3.53 a	3.71 a	1.36 c	1.85 c
T (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	16.92 b	23.24 a	14.31 b	23.92 a	13.89 b	20.38 a	3.21 c	4.38 c
V (%)	12.72 b	10.79 b	13.56 b	10.86 b	13.64 b	11.17 b	40.73 a	40.10 a
m (%)	46.13 a	46.42 a	33.78 b	29.15 b	59.30 a	56.81 a	6.76 c	7.27 c
OM (g kg <sup>-1</sup> )	83.02 a	82.35 a	75.87 a	80.8 a	49.48 b	48.04 b	13.87 c	12.44 c
P-Rem (mg/l)	4.56 d	7.65 d	12.61 c	20.10 a	11.02 c	16.51 b	11.03 c	20.10 a
Zn (mg dm <sup>-3</sup> )	3.136 a	3.129 a	3.292 a	3.443 a	1.927 b	1.687 b	1.608 b	2.137 b
Fe (mg dm <sup>-3</sup> )	134.53 b	149.05 b	403.73 a	401.78 a	124.79 b	136.04 b	150.81 b	85.32 b
Mn (mg dm <sup>-3</sup> )	112.29 a	107.40 a	88.88 a	72.45 b	40.76 b	45.62 b	103.99 a	86.93 a
Cu (mg dm <sup>-3</sup> )	0.799 b	0.293 b	0.57 b	0.357 b	0.809 b	0.561 b	2.14 a	1.917 a
B (mg dm <sup>-3</sup> )	0.202 a	0.122 b	0.266 a	0.123 b	0.201 a	0.102 b	0.154 b	0.106 b
S (mg dm <sup>-3</sup> )	36.29 b	21.33 d	26.58 c	15.02 d	29.06 b	20.19 d	45.14 a	31.08 b
Clay (g kg <sup>-1</sup> )	376 b	362 b	214 c	193 c	456 a	478 a	249 c	240 c
Silt (g kg <sup>-1</sup> )	243 a	275 a	174 b	183 b	188 b	178 b	262 a	277 a
Sand (g kg <sup>-1</sup> )	381 c	363 c	612 a	624 a	356 c	344 c	489 b	483 b
EC (mS/cm)	0.061 b	0.21 a	0.052 b	0.057 b	0.228 a	0.182 a	0.027 b	0.088 b

Averages with the same letters in the lines do not differ statistically. The Scott-Knott test was applied at 5% probability. K-potassium; P - phosphorus; Ca - Calcium; Mg - Magnesium; Al - Aluminum; H + Al - total acidity; SB - sum of exchangeable bases; t - effective cation exchange capacity; T - cation exchange capacity at pH 7; V - saturation index of bases; m - saturation index of aluminum; OM - organic matter; P-rem - remaining phosphorus; Zn - Zinc; Fe - Iron; Mn - Manganese; Cu - Copper; B - hot water extractor; S - phosphate extractor; EC - electrical conductivity.

The Zn content is within the limits established for soil fertility, ranging from medium (AF, RA) to good (NS, IO). Mn, Fe and S presented highest concentrations in the soil, where IO had the highest Fe content. Cu and B did not exceed the maximum allowed concentrations established by Brazilian environmental regulation for soil (CONAMA). The great majority of the soil attributes showed a statistically significant difference between the evaluated ecosystems. According to the soil physicochemical characterization, the RA was the most distinct. The soil physicochemical parameters were not significantly different between the sampling seasons; and followed the same tendency in the dry season and rainy season.

As described by Silva et al. (2018) the soil classes of the ecosystems were Oxisol Plinthic (*Plintossolo Pétrico*) in NS and IO; the AF exhibited a toposequence with Oxisol (*Latossolo Vermelho* and *Latossolo Vermelho-amarelo*) and Inceptisols (*Cambissolo Háptico*); and the RA was classified as an anthropogenic terrain.

### Yeast diversity

A total of 295 isolates were obtained in the present study, representing 37 yeast species (Table 5). Cultivable yeasts were detected in 57 soil samples. Richness estimation for all sites indicated by Chao2 was 43 taxa, and the observed richness (37 taxa) represents 84% of this total (Figure 16).

**Tabela 5. Inventory and abundance of yeast taxa isolates at 4 ecosystems (Neotropical savanna, Iron outcrops, Atlantic forest, and Revegetated area), during 2 sampling seasons: dry and rainy.**

Yeast taxa	Total n° of isolates	Occurrence frequency (%)	Ecosystems							
			NS		IO		AF		RA	
			Dry	Rainy	Dry	Rainy	Dry	Rainy	Dry	Rainy
<b>Ascomycota</b>										
Saccharomycetales										
<i>Candida maltosa</i>	123	41.69					8	15	51	49
<i>Candida melibiosica</i>	16	5.42			16					
<i>Candida parapsilosis</i>	9	3.05			4			1		4
<i>Candida pseudolambica</i>	4	1.36					4			
<i>Candida neerlandica</i>	2	0.68						2		
<i>Candida sanyaensis</i>	1	0.34						1		
<i>Candida intermedia</i>	4	1.36	3							1
<i>Candida rugosa</i>	2	0.68	2							
<i>Candida edaphicus</i>	2	0.68		1				1		
<i>Candida insectorum</i>	1	0.34			1					

<i>Candida quercitrusa</i>	1	0.34						1	
<i>Candida glabrata</i>	1	0.34							1
<i>Candida</i> sp.	3	1.02			1		2		
<i>Schwanniomyces vanrijae</i>	21	7.12			1	2	17		1
<i>Schwanniomyces polymorphus</i>	4	1.36	2				2		
<i>Schwanniomyces</i> sp.	1	0.34			1				
<i>Debaryomyces</i> sp.	2	0.68	1						1
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	12	4.07			3		2	1	6
<i>Meyerozyma</i> sp.	4	1.36			1			3	
<i>Barnettozyma californica</i>	5	1.69				2	3		
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	5	1.69						5	
<i>Pichia kudriavzevii</i>	4	1.36						3	1
<i>Kodamaea ohmeri</i>	3	1.02	1		2				
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	3	1.02					2	1	
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	1	0.34					1		
<i>Torulaspora</i> sp.	3	1.02							3
<i>Sugiyamaella xylolytica</i>	2	0.68					2		
<i>Saturnispora silvae</i>	2	0.68					1		1
<i>Lachancea kluveri</i>	1	0.34						1	

#### Basidiomycota

##### Tremellales

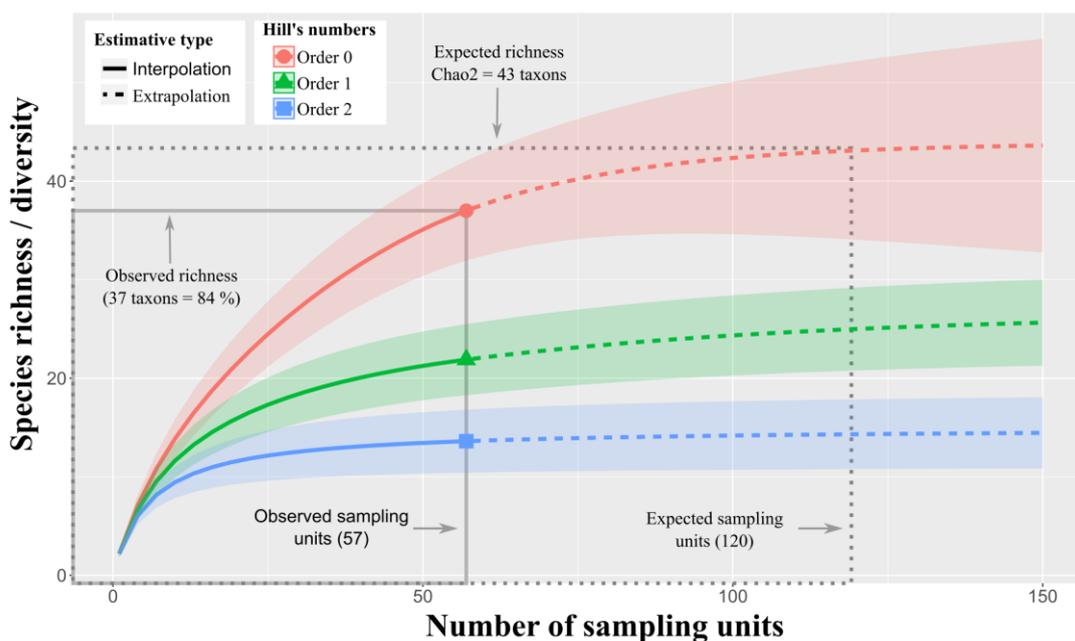
<i>Papiliotrema laurentii</i>	24	8.14	1		1	3			15	4
<i>Saitozyma podzolica</i>	8	2.71	1	1			1	5		
<i>Apiotrichum laibachii</i>	1	0.34			1					
<i>Apiotrichum loubieri</i>	1	0.34			1					
<i>Cutaneotrichosporon terricola</i>	2	0.68					1		1	

##### Sporidiobolales

<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	12	4.07		2						10
<i>Rhodotorula toruloides</i>	3	1.02				1				2
<i>Rhodotorula</i> sp.	2	0.68								2

<b>Total</b>	<b>295</b>		<b>11</b>	<b>4</b>	<b>20</b>	<b>17</b>	<b>20</b>	<b>55</b>	<b>84</b>	<b>84</b>
--------------	------------	--	-----------	----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

The rarefaction and extrapolation curves using the Hill numbers indicates that the sample effort was sufficient to describe 84% of the richness (Order 0) in the study area, and described well the effective number of common species by Shannon index (Order 1), and the effective number of dominant species by Simpson diversity (Order 2) in the assemblage.

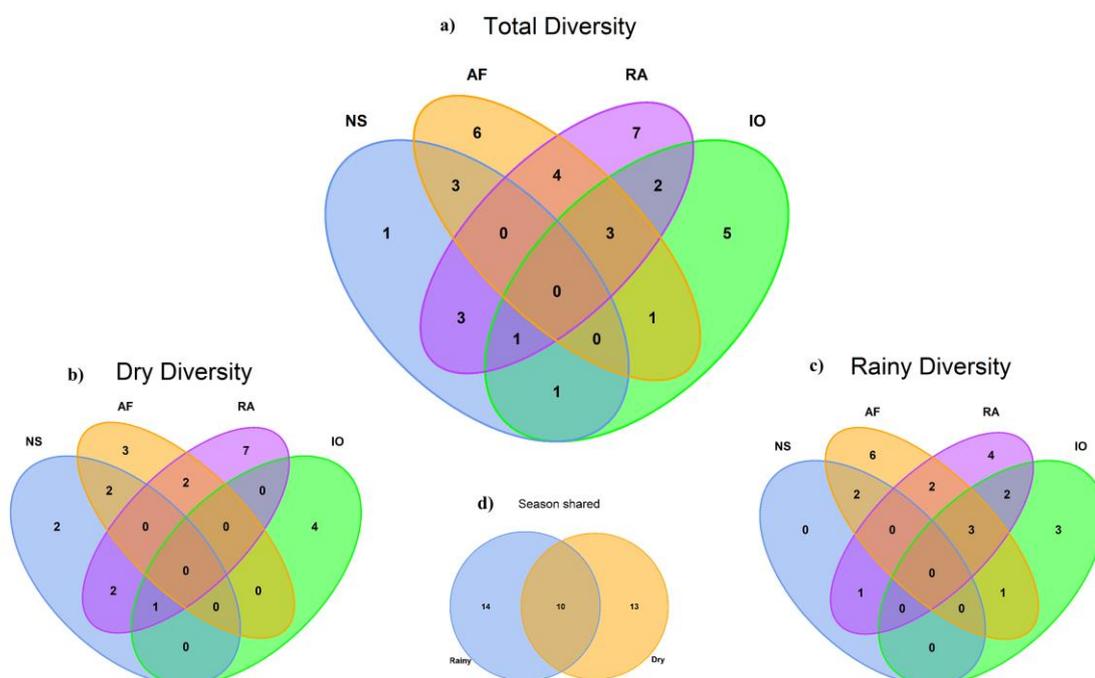


**Figure 16. Soil yeast species accumulation curves for soil samples.**

A high number of ascomycetous species were observed (29), corresponding to 82% of all isolates, with all species belong to the order Saccharomycetales. The genus *Candida* was predominant, with *Candida maltosa* representing the most frequent species (41%). The Basidiomycota, with eight species, represented 17% of all isolates. Species belong the orders Tremellales and Sporidiobolales were detected. *Papiliotrema laurentii* was the most frequent species in Tremellales, and *Rhodotorula mucilaginosa* the most frequency in Sporidiobolales. Most of the species found represented less than 10% of the total isolates, and nine species were represented by a single isolate (Table 5).

Four species showed a wide distribution, as they were recovered in 3 of the 4 sites sampled (Figure 17A): *Candida parapsilosis*, *Schwanniomyces vanriijiae*, and *Meyerozyma guilliermondii*, were found in AF, IO and RA. *Papiliotrema laurentii* was found in IO, NS and RA. The AF and RA shared the largest number of species: *Candida maltosa* (the most frequent species), *Wickerhamomyces anomalus*, *Saturnispora silvae*, *Candida parapsilosis*, *Schwanniomyces vanriijiae*, *Meyerozyma guilliermondii* and *Cutaneotrichosporon terricola*. Seven species were recovered solely

from RA, including *Candida glabrata*, *C. quercitrusa*, and *Lachancea kluyveri* and were represented by only one isolate, respectively.



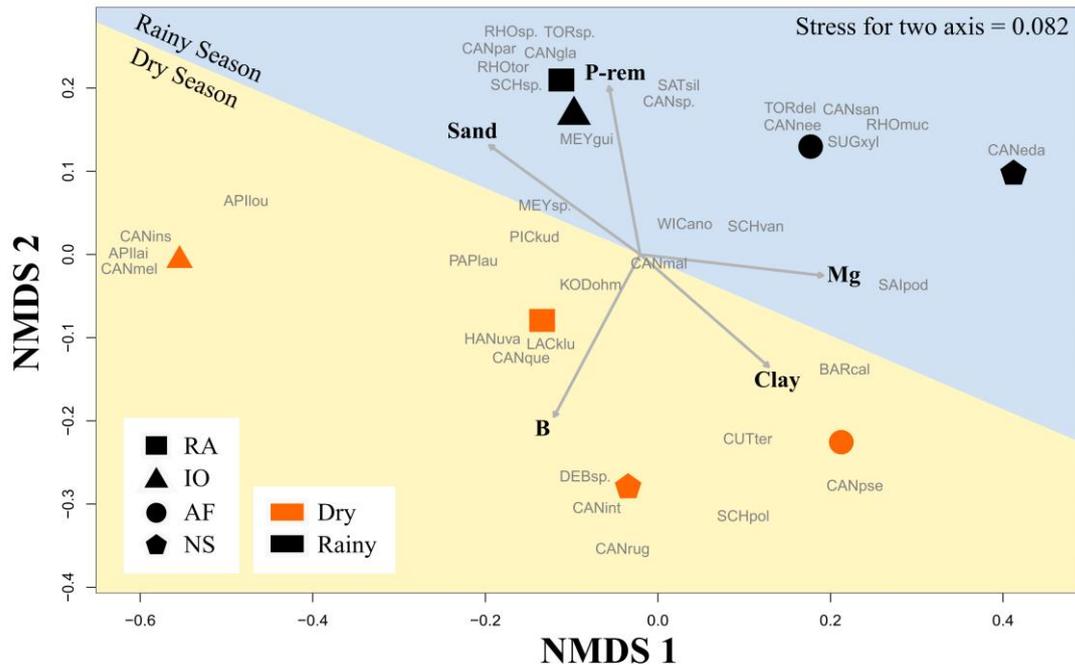
**Figura 17. Venn diagrams of yeast species in soil from different ecosystems, showing the number of shared species in those site sampled. The different circles represent different site with ecosystem sampled, and the intersections of the circles showed the coexisted yeast species in those sites. Total shared diversity in both seasons (a); Diversity shared only dry season (b); Diversity shared only rainy season (c); and diversity shared between seasons (d). NS – Neotropical savanna, IO – Iron outcrops, AF – Atlantic forest, and RA – Revegetated area.**

In the dry season, *Papiliotrema laurentii* was the only species shared between IO, RA and NS sites (Figure 17B). RA had the largest number of species isolates exclusively in this site, followed by IO, AF, and NS. In rainy season, three species were shared between AF, IO and RA (Figure 17C).

Ten species were found during both seasons (Figure 17D), including two of the most widely distributed species, like *Candida maltosa* and *Papiliotrema laurentii*. The rainy season had 14 unique species including three red-pigmented species: *Rhodotorula* sp., *R. mucilaginosa*, and *R. toruloides*. The dry season had 13 unique species, including *Candida melibiosica* and *Hanseniaspora uvarum*.

## Multivariate approach

The NMDS analysis showed clear separation of yeast communities according to ecosystems, the soil attributes and the season (Figure 18). The stress values (0.082) suggest that the data were well represented in the 2-D ordination, perfectly preserving the original rank orders.



**Figure 18. Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) plot tracking community similarity by ecosystems and season. The species names were abbreviated for easy viewing: the first three letters of the genus in upper case and the first three letters of the species in lower case (CANmal = *Candida maltosa*). NS – Neotropical savanna, IO – Iron outcrops, AF – Atlantic forest, and RA – Revegetated area.**

The micronutrients B, Mg and P-rem and the texture (sand and clay) were the variables with the most significant influence on the yeast community structure chosen by forward selection with permutation test ( $< 0.05$ ). These variables explained 65% (P-rem and clay), 75% (Mg and B), and 77% (sand) of data variability.

The yeast communities of RA and IO showed in the rainy season were the most similar, and positively correlated with the P-rem and sand content. The IO community in the dry season was negatively correlated with Mg content, and this ecosystem showed the lowest values for this attribute (Table 4). The clay content was positively

correlated with AF community, and B content with NS and RA communities in the dry season.

The NMDS also showed the unique species of each ecosystem and season, like species of *Rhodotorula* that were only detected during the rainy season. The species that showed a wide distribution, like *C. maltosa* and *P. laurentii*, were not influenced by either the type of vegetation or the soil attribute.

## **Discussion**

The yeast community composition differed along the ecosystem in soil. Interestingly, ascomycetous yeasts was most frequent than basidiomycetous, represents 82% of isolates. Some studies on soil cultivable yeasts indicate a predominance of basidiomycetous yeasts in the communities, mainly in temperate and boreal areas (Golubtsova et al. 2007; Mestre et al. 2014; Glushakova et al. 2017; Moreira and Vale 2018).

The predominance of ascomycetes in all ecosystems evaluated may actually reflect the dominance of this group in tropical soils. In agreement, Vital et al. (2002) and Carvalho et al. (2013) also found a greater proportion of ascomycetous yeasts in Amazonian and Brazilian Savannah soils. However, the methodology based on enrichment techniques may have favored the greatest growth of fermenting ascomycetes (Yurkov 2017). But another recent study of the soil microbiome of the same mining site also demonstrated the most abundance of Ascomycota using metabarcoding approach (Vieira et al. 2018b).

Thirty-seven yeast taxa were retrieved in this survey, which represents 84% of the total diversity estimates by Chao2 (Figure 16), showing that our study provides a reliable basis for yeast species richness assessment in the studied soils. Our survey yielded a value of yeast taxa higher than the values reported before for South America, namely 23 species in Brazilian Savannah soils (Carvalho et al. 2013), 18 - 28 species in Patagonia (Argentina) (Mestre et al. 2011; Mestre et al. 2014).

Yeast communities responded to vegetation type (Figure 18), with few species shared among them, and many unique species in each ecosystem (Figure 17a). Only the species *Candida parapsilosis*, *Schwanniomyces vanrijiae*, *Meyerozyma guilliermondii*, and *Papiliotrema laurentii* had a wide distribution recovered in three of the four ecosystems. These species are frequently reported in soils (Vital et al. 2002; Jaiboon et al. 2016; Yurkov et al. 2015).

The composition of dominating species in the ecosystems analyzed was fundamentally different (Table 5). *Candida intermedia* was most frequent in NS representing 1.36 % of occurrence frequency, *Candida melibiosica* in IO with 5.42 %, and *Candida maltosa* was most frequent in AF and RA representing 41.69%. Species of the genus *Candida* were also the most frequent species detected by Vital et al. (2002) in samples of tropical soils.

RA sites presented the greatest species richness (20 taxa), followed by AF (18 taxa), IO (13 taxa), and NS (nine taxa). RA also presented the greatest quantity of unique species (Figure 17a). In other iron-mining site, also in Iron quadrangle region, Moreira and Vale (2018) found the same tendency, where the area that suffered the greatest impact of mining activity, revegetated with grass, presented the greatest species richness than the adjacent ecosystems, with native vegetation.

The conversion of forests into open vegetation results in changes in the structure of the soil microbial communities. Yeast diversity in soils under different management regimes revealed that grasslands harbor predominantly ascomycetous yeasts unlike forests, thereby mirroring the plant communities (Yurkov et al. 2012). Agriculture practices such as land management, grazing, and fertilization alter soil nutrient balance and provide simpler carbon sources that are easily usable by ascomycetes species, which explains the abundance and species richness of Ascomycota in the communities of yeasts (Matlou and Haynes 2006; Yurkov et al. 2012).

The composition of the yeast communities changed among seasons. Among the species detected in the rainy season, highlight the group of pigmented yeasts, *Rhodotorula toruloides* and *R. mucilaginosa*. These yeasts were isolated from rainy season may represent typical transient species that are introduced in the soil habitat with falling leaves or other dying plant material, because they are typically associated with the

air, the phylloplane, and decaying plant debris (Mannazzu et al. 2015), and may represent a link between, above and below ground communities.

Only in rainy season, we also detected *Sugiyamaella xylolytica*, one new species in *Sugiyamaella* clade, described and isolated from rotting wood of the Brazilian ecosystems (Sena et al. 2017). These findings reinforce the hypothesis of the entry of new species in the soil from the decay of plant material during the rainy season, changing the composition of the communities between the seasons.

The NMDS analysis shows a clear separation of the yeast communities by ecosystem and seasons, evidencing the influence of the type of vegetation and the importance of soil moisture content in the structure of the communities. In addition, the analysis shows that soil attributes, as Sand, clay, Mg, B and P-rem significantly affected the composition of yeast communities.

The seasonal dynamics of yeast communities in soil has been demonstrated. Fluctuations in the number and species composition of the yeast communities in the rhizoplane, rhizosphere, and nonrhizosphere soil was detected during the four seasons, and typical epiphytic pigmented species, like *R. mucilaginosa*, increased during the summer and autumn periods in rhizoplane (Golubtsova et al. 2007). The proportion of red-pigmented *Rhodotorula* and *Cystofilobasidium* spp. varied seasonally in forest soils, which were widely distributed in autumn and winter periods (Sláviková and Vadkertiová 2000). Like in our findings, *Rhodotorula* spp. were only detected during the rainy season, demonstrating the influence of decaying plant in the composition of soil communities.

Within soil properties, the texture (i.e. proportions of clay and sand) explained the largest amounts of variability in yeasts communities among the seasons. In general, there was the predominance of clayey soils of the AF and NS, and sandy soils of the IO and RA. Additionally, the availability of micronutrients, e.g. Mg, B and P-rem had an impact on the yeasts communities' distribution. Variations of yeasts communities as a response to fluctuations in soil texture, moisture, temperature and available nutrients are well known for soil samples (Carvalho et al. 2013; Yurkov et al. 2016; Masínová et al. 2017; Richter et al. 2018).

The soil physicochemical parameters were not different between the sampling seasons, but the bioindicators increased in all the ecosystems from the dry to the rainy season (Silva et al. 2018), and the composition of the yeast communities changed between the seasons (Figure 17 and 18), indicating the high metabolic activity of the microbiota in this season.

The moisture is an important factor affecting yeast communities. The species composition of yeast communities may change significantly with rainfall intensity (Vishniac 2006). Additionally, the type of vegetation can affect yeast communities due to tree composition, since phyloplains contain populations of specific yeast species of abundant tree species that can be inserted into soil communities (Yurkov et al. 2008).

Despite the predominance of Ascomycetes in all ecosystems, the composition and abundance of taxa changed between them (Table 5). *Candida maltosa*, the species with the highest frequency of occurrence, was detected only in RA and AF, with greater abundance in the samples of RA. This species has been reported as one of the most abundant in cultivated and soils under predominance of grasses (Sláviková and Vadkertiová 2003; Vadkertiová and Sláviková 2006).

Furthermore, *Candida maltosa* has been reported in highly impacted environments, as soils contaminated by oils, and its capacity in the biodegradation of pollutants such as hydrocarbons (Chrzanowski et al. 2006) and phenolic compounds (Fialová et al. 2004) have been proven, demonstrating the survival capacity and ecological importance of this species in the recovery of soils that have suffered some environmental impact.

Our study yielded yeasts that are frequently reported from soils worldwide and that in this study presented the highest frequency of occurrence, namely *Candida maltosa* and *Papiliotrema laurentii* in cultivated soils (Sláviková and Vadkertiová 2003); *Papiliotrema laurentii* and *Schwanniomyces vanrijiae* in soils of Brazilian neotropical savannas (Carvalho et al. 2013); *Saitozyma podzolica* in mining soils (Moreira and Vale 2018), in pristine forests in northern Patagonia (Argentina) (Mestre et al. 2014), and soils under different management regimes (Yurkov et al. 2012); *Candida parapsilosis* and *Meyerozyma guilliermondii* in Mediterranean forest soils (Yurkov et al. 2016). Some species were detected at low frequency of occurrence in this

study and 17 taxa represent rare species (<1% of total isolates) although within them have species recognized as typical pedobiontes, like *Apiotrichum laibachii*, *Apiotrichum loubieri*, and *Cutaneotrichosporon terricola* (Yurkov 2018).

Yeast communities in different ecosystems and under a large latitudinal gradient may share a limited number of species, with some taxa being restricted to a single sampling site (Vishniac 2006; Yurkov et al. 2012), and may still present differences at the same sampling point at different seasons, like this study, confirming a strong influence of the heterogeneity of environmental parameters and vegetation type.

In sum, the present findings point to divergent habitat filtering by environmental properties similar to the soil properties in each locality, vegetation characteristics and climatic conditions, shaping the overall microbial community on a local scale. Our findings also point to an ecological functionality of the yeast communities in the recovery of anthropic disturbance area, due to the greater richness of taxon. This study provides the first soil yeast species inventory in the different ecosystems in Iron quadrangle region, Minas Gerais, Brazil.

## **Conclusions**

There were differences in yeast composition when comparing the ecosystems and season. The environmental factors affecting yeast communities comprise soil texture (sandy and clay content) and micronutrients as Mg, B and P-rem. Ascomycetous yeasts dominated over Basidiomycetous with *Candida maltosa* representing the most occurrence frequency. Revegetated area presented the greatest richness of taxa, indicating successful revegetation. Each ecosystem showed a particular assemblage of species as a result of environmental characteristics, such as plant species, nutrient availability, and climatic characteristics.

## References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, pp.403–410. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1990.9999>.
- Alvarez, V.V.H., Novais, R.F., Barros, N.F., Cantarutti, R.B., Lopes, A.S., 1999. Interpretação dos resultados das análises de solos. In: Ribeiro AC, Guimarães PTG, Alvarez V VH, editores. *Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais - 5a aproximação*. Viçosa, MG: Comissão de fertilidade do solo do estado de Minas Gerais, pp. 25–32.
- Azevedo, U.R., Machado, M.M.M., Castro, P.T.A., Renger, F.E., Trevisol, A., Beato, D.A.C., 2011. Geoparque Quadrilátero Ferrífero (MG). *Geoparques do Brasil /Propostas - vol1*, pp.183–219.
- Botha, A., 2011. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(1), pp.1–8. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.10.001>.
- Caixeta, L.B., Pereira, T.J., Castañeda, N.E.N., Cares, J.E., 2016. Nematode communities as indicators of the status of a soil ecosystem influenced by mining practices in Brazil. *Nematology*, 18(3), pp.265–276. <https://doi.org/10.1163/15685411-00002958>.
- Carvalho, F.P., Souza, A.C., Magalhães-Guedes, K.T., Dias, D.R., Silva, C.F., Schwan, R.F., 2013. Yeasts diversity in Brazilian Cerrado soils: Study of the enzymatic activities. *African Journal of Microbiology Research*, 7(32), pp.4176–4190. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5752>.
- Castro, J.L., Souza, M.G., Rufini, M., Guimarães, A.A., Rodrigues, T.L., Moreira, F.M.S., 2017. Diversity and Efficiency of Rhizobia Communities from Iron Mining Areas Using Cowpea as a Trap Plant. *Rev Bras Cienc Solo*, pp.1–20. <https://doi.org/10.1590/18069657rbc20160525>.
- Chen H., Boutros P.C., 2011. VennDiagram: a package for the generation of highly customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics*, 12(35).
- Chrzanowski, Ł., Kaczorek, E., Olszanowski, A., 2006. The Ability of Candida Maltosa for Hydrocarbon and Emulsified Hydrocarbon Degradation. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(1), pp.47–51.
- Dias, D.R., Schwan, R.F., 2010. Isolamento e identificação de leveduras. In: Moreira FMS, Huising EJ, Bignell DE, editores. *Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade*. Lavras: Editora UFLA, pp. 227–277.
- Donagema, G.K., Campos, D.V.B, Calderano, S.B., Teixeira, W.G., Viana, J.H.M., 2011. *Manual de métodos de análise do solo*. 2. ed. rev. Rio de Janeiro: Embrapa Solos.

Dunthorn, M., Kauserud, H., Bass, D., Mayor, J., Mahé, F., 2017. Yeasts dominate soil fungal communities in three lowland Neotropical rainforests. *Environmental Microbiology Reports*, 9, pp.668–675. <http://doi:10.1111/1758-2229.12575>.

Fernandes, C.C., Kishi, L.T., Lopes, E.M., Omori, W.P., Souza, J.A.M., Alves, L.M.C., Lemos, E.G.M., 2018. Bacterial communities in mining soils and surrounding areas under regeneration process in a former ore mine. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(3), pp.489–502. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.12.006>.

Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., Stazzell-Tallman, A., 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Micr.*, 50, pp.1351–1371. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-1351>.

Fialová, A., Boschke, E., Bley, T., 2004. Rapid monitoring of the biodegradation of phenol-like compounds by the yeast *Candida maltosa* using BOD measurements. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54, pp.69–76. <http://doi:10.1016/j.ibiod.2004.02.004>.

Gastauer, M., Souza Filho, P.W.M., Ramos, S.J., Caldeira, C.F., Silva, J.R., Siqueira, J.O., Furtini Neto, A.E., 2018. Mine land rehabilitation in Brazil: Goals and techniques in the context of legal requirements. *Ambio*. <https://doi.org/10.1007/s13280-018-1053-8>.  
Glushakova, A.M., Kachalkin, A.V., Tiunov, A.V., Chernov, I.Y., 2017. Distribution of Yeast Complexes in the Profiles of Different Soil Types. *Eurasian Soil Science*, 50(7), pp.820–825. <https://doi.org/10.1134/S1064229317050064>.

Golubtsova, Y.V., Glushakova, A.M., Chernov, I.Y., 2007. The Seasonal Dynamics of Yeast Communities in the Rhizosphere of Soddy-Podzolic Soils. *Eurasian Soil Science*, 40(8), pp.875–879. <https://doi.org/10.1134/S1064229307080108>.

Hsieh, T.C., Ma, K.H., Chao, A., 2016. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution*, 7(12), pp.1451–1456. <https://doi.org/doi:10.1111/2041-210X.12613>.

Jaiboon, K., Lertwattanasakul, N., Limtong, P., Limtong, S., 2016. 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*, 15(7), pp.755–770. <http://dx.doi.org/10.1007/s11557-016-1205-9>.

Klauber-Filho, O., Siqueira, J.O., Moreira, F.M.S., 2002. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área poluída com metais pesados. *R. Bras. Ci. Solo*, 26(1), pp.125–134. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832002000100012>.

Kuramae, E.E., Yergeau, E., Wong, L.C., Pijl, A.S., Van Veen, J.A., Kowalchuk, G.A., 2012. Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(1), pp.12–24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01192.x>.

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Anton Leeuw*, 73, pp.331–371. <https://doi.org/10.1023/A:1001761008817>.

Mannazzu, I., Landolfo, S., Lopes, T., Buzzini, P., 2015. Red yeasts and carotenoid production : outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(11), pp.1665–1673. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1927-x>.

Masínová, T., Bahnmann, B.D., Vetrovský, T., Tomsovský, M., Merunková, K., Baldrian, P., 2017. Drivers of yeast community composition in the litter and soil of a temperate forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 93, pp.1–10. DOI: 10.1093/femsec/fiw223.

Matlou, M.C., Haynes, R.J., 2006. Soluble organic matter and microbial biomass C and N in soils under pasture and arable management and the leaching of organic C, N and nitrate in a lysimeter study. *Applied Soil Ecology*, 34(2–3), pp.160–167. doi:10.1016/j.apsoil.2006.02.005.

Mendes Filho, P.F., Vasconcellos, R.L.F., De Paula, A.M., Cardoso, E.J.B.N., 2010. Evaluating the potential of forest species under “microbial management” for the restoration of degraded mining areas. *Water, Air, and Soil Pollution*, 208(1–4), pp.79–89. doi:10.1007/s11270-009-0150-5.

Mestre, M.C., Rosa, C.A., Safar, S.V.B., Libkind, D., Fontenla, S.B., 2011. Yeast communities associated with the bulk-soil, rhizosphere and ectomycorrhizosphere of a *Nothofagus pumilio* forest in northwestern Patagonia, Argentina. *FEMS microbiology ecology*, 78(3), pp.531–41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01183.x>.

Mestre, M.C., Fontenla, S., Rosa, C.A., 2014. Ecology of cultivable yeasts in pristine forests in northern Patagonia (Argentina) influenced by different environmental factors. *Canadian journal of microbiology*, 60(6), pp.371–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24849380>. doi: dx.doi.org/10.1139/cjm-2013-0897.

Moreira, G.A.M.; Vale, H.M.M., 2018. Occurrence of Yeast Species in Soils under Native and Modified Vegetation in an Iron Mining Area. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 42, pp.1–15. <https://doi.org/10.1590/18069657rbc201703751>.

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., Minchin, P.R., Hara, R.B.O., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., 2016. Package ‘vegan.’ *R package version 2.4-1*, pp.0–291.

Péter, G., Takashima, M., Cadez, N., 2017. Yeast Habitats: Different but Global. In P. Buzzini, ed. *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology*. Springer International Publishing, pp. 39–71.

R Development Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org>.

Richter, A., Schöning, I., Kahl, T., Bauhus, J., Ruess, L., 2018. Regional environmental conditions shape microbial community structure stronger than local forest management intensity. *Forest Ecology and Management*, 409, pp.250–259. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.11.027>.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.*, 74, pp.5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.

Sena, M.F., Morais, C.G., Lopes, M.R., Santos, R.O., Uetanabaro, A.P.T., Morais, P.B., Rosa, C.A., 2017. D -Xylose fermentation , xylitol production and xylanase activities by seven new species of Sugiyamaella. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110, pp.53–67. doi: 10.1007/s10482-016-0775-5.

Silva, A.O., Costa, A.M., Teixeira, A.F.S., Guimarães, A.A., Santos, J.V., Moreira, F.M.S., 2018. Soil microbiological attributes indicate recovery of an iron mining area and of the biological quality of adjacent phytophysionomies. *Ecological Indicators*, 93, pp.142–151. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.073>.

Skirycz, A., Castilho, A., Chaparro, C., Carvalho, N., Tzotzos, G., Siqueira, J.O., 2014. Canga biodiversity, a matter of mining. *Frontiers in plant science*, 5, p.653. doi: 10.3389/fpls.2014.00653.

Sláviková, E., Vadkertiová, R., 2000. The occurrence of yeasts in the forest soils. *Journal Basic Microbiology*, 40, pp.207–212. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200007\)40:3<207::AID-JOBM207>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200007)40:3<207::AID-JOBM207>3.0.CO;2-H).

Sláviková, E., Vadkertiová, R., 2003. The diversity of yeasts in the agricultural soil. *Journal of basic microbiology*, 43(5), pp.430–6. <https://doi.org/10.1002/jobm.200310277>.

Teixeira, A.F.S., Kimmelmeier, K., Marascalchi, M.N., Sturmer, S.L., Carneiro, M.A.C., Moreira, F.M.S., 2017. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in an iron mining area and its surroundings : Inoculum potential , density , and diversity of spores related to soil properties. *Ciência e Agrotecnologia*, 41(5), pp.511–525. <http://dx.doi.org/10.1590/1413-70542017415014617>.

Vadkertiová, R., Sláviková, E., 2006. Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. *Journal of Basic Microbiology*, 46(2), pp.145–152. doi: 10.1002/jobm.200510609.

Vieira, C.K., Marascalchi, M.N., Rodrigues, A.V., Armas, R.D., Sturmer, S.L., 2018a. Morphological and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in revegetated iron-mining site has the same magnitude of adjacent pristine ecosystems. *Journal of environmental sciences*, 67, pp.330–343. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2017.08.019>.

Vieira, C.K., Borges, L.G.A., Marconatto, L., Giongo, A., Stürmer, S.L., 2018b. Microbiome of a revegetated iron-mining site and pristine ecosystems from the Brazilian Cerrado. *Applied Soil Ecology*, 131, pp.55–65.

<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.07.011>.

Vishniac, H.S., 2006. A multivariate analysis of soil yeasts isolated from a latitudinal gradient. *Microbial ecology*, 52(1), pp.90–103. <https://doi.org/10.1007/BF00171937>.

Vital, M.J.S., Abranches, J., Hagler, A.N., Mendonça-Hagler, L.C., 2002. Mycocinogenic yeasts isolated from amazon soils of the maracá ecological station , Roraima-Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, pp.230–235.

Yurkov, A.M., Chernov, I.Y., Tiunov, A. V., 2008. Influence of *Lumbricus terrestris* earthworms on the structure of the yeast community of forest litter. *Microbiology*, 77(1), pp.107–111. doi: 10.1134/S0026261708010153.

Yurkov, A.M., Kemler, M., Begerow, D., 2012. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal Ecology*, 5(1), pp.24–35. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.07.004>.

Yurkov, A.M., Rohl, O., Pontes, A., Carvalho, C., Maldonado, C., Sampaio, J.P., 2016. Local climatic conditions constrain soil yeast diversity patterns in mediterranean forests, woodlands and scrub biome. *FEMS Yeast Research*, 16(1). doi: 10.1093/femsyr/fov103.

Yurkov, A., 2017. Yeasts in Forest Soils. In: P. Buzzini, ed. *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity*. Springer International Publishing, pp. 87–116.

Yurkov, A.M., 2018. Yeasts of the soil – obscure but precious. *Yeast*, 35, pp.369–378. doi: 10.1002/yea.3310.

## **CAPÍTULO 4 – Plant growth-promoting traits of yeasts from bulk soil in a revegetated iron-mining site and natural ecosystems**

Geisianny Augusta Monteiro Moreira<sup>1</sup>, Helson Mario Martins do Vale<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900, Brasília/ DF, Brazil. gamm.bio@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Fitopatologia, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900, Brasília/ DF, Brazil. helson@unb.br

\*Corresponding author

Helson Mario Martins do Vale, Departamento de Fitopatologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília – UnB, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília/ DF, Brazil. CEP: 70910-900. Phone: (+55) 61 31073060, Fax: (+55) 61 31072931, E-mail: helson@unb.br

## Abstract

Soil microorganisms may promote plant growth and to reduce environmental degradation. Microbial agents can be used as biofertilizers, plant strengtheners, phytostimulators, and biopesticides in place of chemical agents. Yeasts are known to be abundant and diverse soil inhabitants in natural ecosystems, and may also play a role as plant growth promoters and soil conditioners. To the best of our knowledge, the use of yeasts from bulk soil in natural ecosystems as plant growth promoting (PGP) agents has not been extensively investigated. In this study, 379 yeast isolates from soil samples in natural and revegetated ecosystems were assessed for production of auxins, phosphate solubilization, siderophore production, and antagonism in solid medium. In total, 52 isolates presented positive to a number of recognized PGP traits, representing 17 yeast species. Strains of the *Rhodotorula* genus are among the best producers of indol acetic acid with the concentration ranged from 18.9 to 137  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , and the best siderophore-producing capacity. *Wickerhamomyces anomalus* and *Meyerozyma guilliermondii* species exhibited phosphate solubilizing activity. Eight species exhibited antagonistic effects against *Fusarium oxysporum*. The *Candida insectorum*, *Wickerhamomyces anomalus* and *Rhodotorula mucilaginosa* strains proved to be promising for future investigations because they presented the best results. Our study results highlight the potential use of bulk soil yeasts as potential plant growth promoting agents.

**Keywords:** Indole-3-acetic acid, biofertilizers, natural ecosystems, unicellular fungi, phosphate solubilization, biocontrol.

## Introduction

Anthropogenic activities such as agricultural practices, mining and metal processing activities contribute as the major source of soil contamination leading to loss of natural vegetation and chemical, physical, and biological changes in soil (Gastauer et al. 2018; Santos et al. 2016; Silva et al. 2018; Quadros et al. 2015). Sustainable approaches are emerging like the use of microbial agents capable of promoting growth and to reduce environmental degradation have been proposed (Syed and Prasad 2019; de-Bashan et al. 2012).

Plant growth promoting microorganisms (PGPMs) promote plant growth by direct mechanisms, such as nutritional supplementation, nitrogen fixation and phytochemical production of hormones; and by indirect mechanisms, such as the production of siderophores and antifungal activity, leading to plant growth by reducing the activity of pathogens or deleterious microorganisms (El-Tarabily and Sivasithamparam 2006; Nutaratat et al. 2014; Berg 2009). Additionally, the PGPMs can have a multitude of use potential in bioremediation of contaminated and degraded soils, stress tolerance and disease suppression in plants, and to enhance the bioenergy crop biomass even (Syed and Prasad 2019).

PGPMs represent a wide diversity of bacteria (Dell'Amico et al. 2005), including filamentous bacteria (El-Mehalawy et al. 2004), filamentous fungi (Shah et al. 2018) and yeasts (Amprayn et al. 2012). Yeast species can act as plant growth-promoting by direct and indirect mechanisms. Direct mechanisms such as ability to produce phytohormones like Indole Acetic Acid (IAA), polyamine and phytase production were detected in soil yeast *Candida tropicalis* (Amprayn et al. 2012); and ability to produce indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-pyruvic acid (IPYA) in endophytic maize roots yeast *Williopsis saturnus* (Nassar et al. 2005). Rhizosphere yeasts, *Cryptococcus flavus* and *Candida railenensis*, improved maize shoot phosphorus (P) content by phosphate solubilizers in association with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi (Sarabia et al. 2017).

Indirect mechanisms such antagonism to fungal plant pathogens and production of antifungal volatile compounds were exhibited in *Torulaspora globosa* strains, and siderophore production was detected in *Rhodospiridium paludigenum* (Nutaratat et al.

2014). Induction of resistance by production of enzymes such as peroxidase and catalase was the mechanisms of action used by *Bullera sinensis* disease control of damping-off and stem rot caused by *Rhizoctonia solani* on cowpea plants (Tenório et al. 2019). The yeasts *Candida valida*, *Rhodotorula glutinis* and *Trichosporum asahii* demonstrated to be effective against *R. solani*, leading to disease suppression, and also significantly increasing fresh weight of roots and shoots compared with the untreated control (El-Tarabily 2004).

Yeasts that present these plant growth promoters traits can be inoculated in plants, proving their efficacy by increasing the growth of root and shoot. The cocultivation of *Nicotiana benthamiana* with yeast isolates that have PGP traits, enhanced plant growth by the development of lateral roots, formation of root hairs, and elongation of primary roots, indicating a potential yeast-plant interaction (Fu et al. 2016). Additionally, microorganisms that have PGP traits can also be used in the recovery of degraded or impacted areas (Syed and Prasad 2019; Rafi et al. 2019; Ahmed and Holmström 2014).

This data suggest that yeasts can promote plant growth and support ongoing prospecting of yeast strains for inclusion into biofertilizer for sustainable agriculture (Sun et al. 2014), and its use in environmental recovery processes (Liu et al. 2016; Kaszycki et al. 2006). Dependent on their mode of action and effects, these microorganisms can be used as biofertilizers, plant strengtheners, phytostimulators, and biopesticides (Berg 2009). However, few studies have reported the plant growth promotion traits in soil yeasts from natural ecosystems.

Knowing the plant growth-promoting (PGP) traits is essential not only for the application biotechnology but also as play a role ecological in soil. We hypothesized that yeast species in soils from natural environments participate in essential ecological processes of the soil, which consequently affect soil microorganisms and plants. To test this hypothesis, we investigated different PGP traits in strains: a) indole-3-acetic acid producing abilities, b) aluminum- and tricalcium-phosphates solubilizing abilities, c) activities of siderophores, and d) performance as pathogen control agents from soil.

## **Materials and Methods**

### **Yeasts strains**

The screening for plant growth-promoting traits was made for a total of 379 isolates belonging to 48 species. The yeast strains were obtained from soil samples in an iron-mining site with natural and revegetated ecosystems in Minas Gerais state (Chapter 3) and protected areas of Brazilian Atlantic forest in Rio de Janeiro state (Chapter 2). All the isolates tested were previously cultured in YPD medium (yeast extract 1%, peptone 2%, dextrose 2%) to verify the purity of the cultures and to obtain metabolically active cells.

### **IAA production**

IAA production was investigated by the method describe in Amprayn et al. (2012). To quantify the IAA produced, the strains were grown overnight in YPD medium and transferred to Dworkin and Foster (DF) salt minimal medium (Dworkin and Foster, 1958) amended with or without 0.1 % (w/v) L-tryptophan (L-Trp). The cultures were incubated on a shaker at 28 °C and 150 rpm for 7 days. One millilitre of the isolate was centrifuged at 10000 rpm for 10 minutes, and 100 µl of the supernatant was mixed with 100 µl of Salkowski's reagent (1 mL of 0.5 M FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O in 50 mL of 35% HClO<sub>4</sub>) (Gordon and Weber 1950), and incubated in the dark for 30 minutes. The colour (pink) of the sample was quantified using a spectrophotometer (SpectraMAX® 190, Molecular Devices, USA) at 450 nm. The concentration of IAA was calculated from a standard curve of IAA obtained in the range of 0 – 100 µg/mL.

### **Detection of siderophore production**

Siderophore production was investigated by the method describe in Ribeiro et al. (2012). The strains were inoculated into KB liquid medium (pH 7) and maintained for 7 days at 28 °C under agitation. After this period, 1 mL of the cultures was centrifuged at 10000 rpm for 5 minutes, and 100 µl of the supernatant was mixed with 100 µl of chrome azurol S reagent (CAS) (Alexander and Zuberer 1991). After 30 min the incubated in the dark, the plates were evaluated. Orange or yellow staining of the samples indicates the production of siderophores by yeast. The KB medium without yeast inoculum was used as negative control.

### **Phosphate solubilization**

Phosphate-solubilizing activity of yeasts was determined according to Fu et al. (2016). The strains were grown overnight in YPD medium and 3  $\mu$ L was spotted onto Pikovskaya's agar containing aluminum- and tricalcium-phosphates (5 g L<sup>-1</sup> each). The plates were incubated at 28 °C for 5 days and observed for the appearance of a clearing zone around the colonies, caused by the solubilization of inorganic phosphate. The solubilization index (SI) was calculated by subtracting the colony diameter from total diameter of halo.

### **Antagonism in solid medium**

To select the most promising yeast isolates as biocontrol agents, antagonism tests were conducted *in vitro* against isolates of soil-borne phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum* and *Macrophomina phaseolina*. The isolates of soil-borne phytopathogenic fungi were obtained from the Department of Plant Pathology of the University of Brasilia. The yeasts and other fungi were co-cultured in an assay, as described by Sperandio et al. (2015). The fungus and the yeast tested were paired in Petri dishes containing PDA culture medium. Plates receiving only the inoculum of the pathogen were used as control. The plates were incubated at 28 °C, and the growth inhibition was evaluated when the whole control medium was covered by fungal growth. Mycelial growth inhibition (% inhibition) was calculated by comparing the diameter of the colonies with respect to the control treatment without any yeast isolate.

### **Results and Discussion**

The screening for plant growth-promoting traits was made for a total of 379 isolates. Of these 52 isolates (13.7% of the total) presented positive results to a number of recognized PGP traits including IAA production with and without L-tryptophan, phosphate solubilization, siderophore production, and antagonism in solid medium (Table 6). Soil microorganisms, associative and free-living, may contribute to plant nutrition and growth through a variety of mechanisms, including direct and indirect effects such as nutrient availability and root pathogen antagonists (Richardson et al. 2009).

**Tabela 6. Soil yeasts that presented positive result to at least one plant growth promoter traits, origin and locality from which they were isolated.**

<b>Species</b>	<b>Strains</b>	<b>Soil source</b>	<b>Locality</b>
<b>Phylum Ascomycota</b>			
<i>Candida parapsilosis</i>	CA116	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Candida parapsilosis</i>	CA414	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Candida parapsilosis</i>	CA824	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Candida parapsilosis</i>	CR75	Iron outcrops	Minas Gerais
<i>Candida parapsilosis</i>	CR817	Iron outcrops	Minas Gerais
<i>Candida parapsilosis</i>	CR31	Iron outcrops	Minas Gerais
<i>Candida parapsilosis</i>	CR818	Iron outcrops	Minas Gerais
<i>Candida parapsilosis</i>	CR819	Iron outcrops	Minas Gerais
<i>Candida parapsilosis</i>	F46	Atlantic Forest	Minas Gerais
<i>Candida insectorum</i>	CR96	Iron outcrops	Minas Gerais
<i>Candida sanyaensis</i>	F117	Atlantic Forest	Minas Gerais
<i>Candida neerlandica</i>	F29	Atlantic Forest	Minas Gerais
<i>Candida maltosa</i>	F31	Atlantic Forest	Minas Gerais
<i>Candida maltosa</i>	CA117	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Candida maltosa</i>	CA215	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Candida maltosa</i>	CA216	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Candida maltosa</i>	CA910	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Candida maltosa</i>	CA48	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Candida maltosa</i>	CA64	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Schwanniomyces vanrijiae</i>	CA18	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	F112	Atlantic Forest	Minas Gerais
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	F27	Atlantic Forest	Minas Gerais
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CR72	Iron outcrops	Minas Gerais
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CA87	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CR64	Iron outcrops	Minas Gerais
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	A416	Atlantic Forest	Rio de Janeiro
<i>Meyerozyma</i> sp.	CR74	Iron outcrops	Minas Gerais
<i>Torulasporea</i> sp.	CA1010	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CA310	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CA311	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Candida glabrata</i>	CA323	Revegetated area	Minas Gerais
<b>Phylum Basidiomycota</b>			
<i>Saitozyma podzolica</i>	A122	Atlantic Forest	Rio de Janeiro
<i>Saitozyma podzolica</i>	A146	Atlantic Forest	Rio de Janeiro
<i>Rhodotorula toruloides</i>	CR13	Iron outcrops	Minas Gerais
<i>Rhodotorula toruloides</i>	CA312	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	CA322	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	CA610	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	CA314	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	CE33	Neotropical Savanna	Minas Gerais

<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CE83	Neotropical Savanna	Minas Gerais
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	F76	Atlantic Forest	Minas Gerais
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CA313	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CA46	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CR53	Iron outcrops	Minas Gerais
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	F811	Atlantic Forest	Minas Gerais
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CA317	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CA319	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CA712	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Rhodotorula</i> sp.	CA521	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA99	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA52	Revegetated area	Minas Gerais
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA522	Revegetated area	Minas Gerais

Yeasts are known to be abundant and diverse soil inhabitants in natural ecosystems (Yurkov 2018), and may also play a role as plant growth promoters and soil conditioners (Botha 2011). Plant hormones such as auxins plays a critical role in plant development, and indole-3-acetic acid (IAA) is generally considered the most important auxin. Two major pathways for IAA biosynthesis have been proposed: using tryptophan as precursor of the IAA (Trp-dependent) and the IAA synthesis without tryptophan (Trp-independent) (Bernales et al. 2019; Saharan and Nehra 2011). IAA-producing yeast species are receiving increasing attention.

In this study 37 strains (9.8%) were IAA producers, belonging to 11 species (Table 7). The IAA concentration ranged from 18.9 to 137  $\mu\text{g ml}^{-1}$  when cultured on a DF medium with Trp as the biochemical precursor. The concentration of the IAA produced was strain-dependent, and strains of the *Rhodotorula* genus are among the best producers of IAA. The *Rhodotorula toruloides* (CR13) and *R. mucilaginosa* (CA610) strains produced high concentrations of IAA, ranged from 116.8 to 127.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Species of the genus *Rhodotorula* have been reported to possess this PGP trait (Ignatova et al. 2015; Streletskii et al. 2016; Firrincieli et al. 2015; Silambarasan et al. 2019). To our knowledge, this is the first report of IAA production for *R. toruloides*.

**Tabela 7. Production of indole-3-acetic acid (IAA) by yeast species in medium with and without tryptophan. ND: not detected.**

Species/ Strains	IAA production ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) in DF with Trp	IAA production ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) in DF w/o Trp
<i>Candida parapsilosis</i> CA116	63.5	8.85
<i>Candida parapsilosis</i> CA414	35.3	8.2
<i>Candida parapsilosis</i> CA824	36.6	11.1
<i>Candida parapsilosis</i> CR75	36.8	9.14
<i>Candida parapsilosis</i> CR817	35.9	9.74
<i>Candida parapsilosis</i> CR31	26.6	8.7
<i>Candida parapsilosis</i> CR818	20.7	9.44
<i>Candida parapsilosis</i> CR819	20.6	8.65
<i>Candida parapsilosis</i> F46	28.4	ND
<i>Candida insectorum</i> CR96	56.1	1.18
<i>Candida sanyaensis</i> F117	40.8	9.69
<i>Candida neerlandica</i> F29	41.1	ND
<i>Candida maltosa</i> F31	32.8	10.1
<i>Candida maltosa</i> CA117	46.6	13
<i>Candida maltosa</i> CA215	47	ND
<i>Candida maltosa</i> CA216	46.4	2.48
<i>Candida maltosa</i> CA910	54	ND
<i>Candida maltosa</i> CA48	55.7	ND
<i>Candida maltosa</i> CA64	36.1	5.56
<i>Schwanniomyces vanrijiae</i> CA18	59.7	19.2
<i>Torulaspota</i> sp. CA1010	ND	3.2
<i>Candida glabrata</i> CA323	ND	1.54
<i>Saitozyma podzolica</i> A146	40.7	8.25
<i>Rhodotorula toruloides</i> CR13	127.5	9.5
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CA322	93.6	17
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CA610	116.8	2.64
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CA314	72.1	18.8
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CE33	67.2	ND
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CE83	42.2	9
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> F76	56.7	ND
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CA313	27.1	9.19
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CA46	24.9	12
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CR53	18.9	9.8
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> F811	40.7	8.65
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CA317	33.8	14
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CA319	64.6	20
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CA712	34	8.35
<i>Rhodotorula</i> sp. CA521	137	11.1
<i>Papiliotrema laurentii</i> CA99	50.3	8.95
<i>Papiliotrema laurentii</i> CA52	30.3	ND

The strains evaluated produced only basal amounts of IAA, with only three strains reaching a maximum of 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  when cultured in DF medium without Trp. The existence of a Trp-independent pathway was confirmed in previous study for some yeast species with higher amounts of IAA produced (Sun et al. 2014), suggesting that yeast may have multiple pathways for IAA synthesis, one of which is not dependent on Trp (Rao et al. 2010).

The yeast isolates in our study produced significantly high amounts of IAA in the presence of exogenous Trp, and basal amounts of IAA in the absence of exogenous Trp. Our results support the presence of a Trp-independent IAA biosynthetic pathway in yeasts. Moreover, the addition of Tryptophan, as a precursor for auxins, to the medium enhanced the production of IAA. Additionally, strains of one species exhibit different IAA-producing capabilities revealing that the production was strain-dependent. These results are consistent with previous study (Fu et al. 2016; Amprayn et al. 2012; Nassar et al. 2005; Nutaratat et al. 2014).

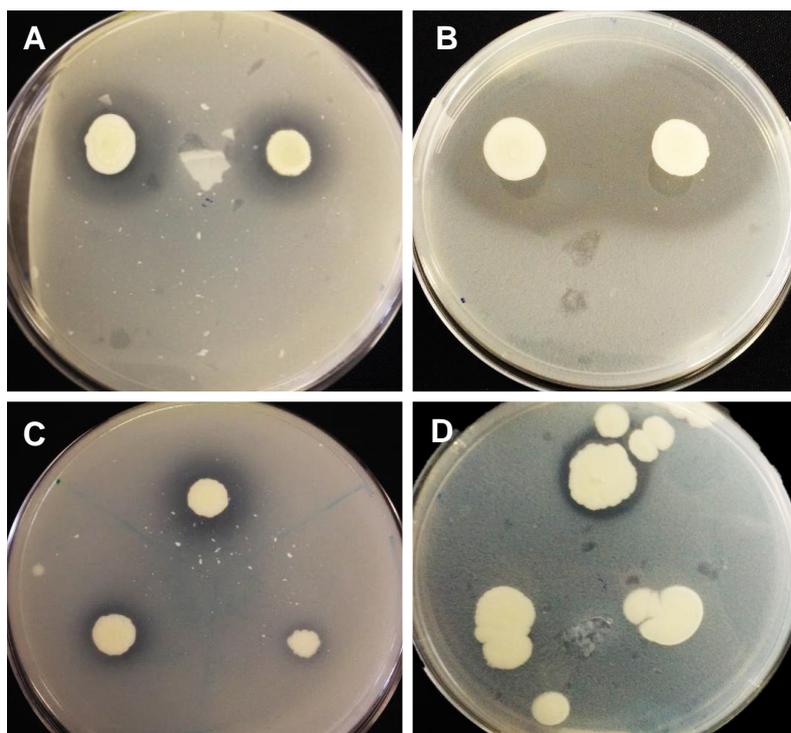
Other studies report higher amounts of IAA produced by rhizosphere and phylloplane yeasts (Fu et al. 2016; Sun et al. 2014; Limtong and Koowadjanakul 2012), where the amount of Trp and other IAA precursors is present in larger quantities, unlike bulk soil where the yeasts in this study were isolated. When compared with studies that used soil yeast (Amprayn et al. 2012; Ignatova et al. 2015), the *R. toruloides* (CR13) and *R. mucilaginosa* (CA610) strains have been shown to be highly efficient in IAA producing.

Yeasts also play an ecological role in the solubilization of insoluble phosphates, making them bioavailable (Botha 2011). We observed that 15 strains (4%) belonging to 11 species exhibited in vitro phosphate solubilizing ability for the two sources of phosphate (aluminum and calcium) (Table 8). Strains of *Meyerozyma guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida glabrata*, and *C. insectorum* exhibited the strongest solubilizing activity for aluminum- and tricalcium-phosphates, expressed using the solubilization index (SI) ranged from 1.31 to 3.37.

**Tabela 8. Solubilization activity for aluminum- and tricalcium-phosphates by soil yeasts. ND: not detected.**

Species/ Strains	Aluminum-phosphates solubilization (SI)	Tricalcium-phosphates solubilization (SI)
<i>Candida parapsilosis</i> F46	1.67	ND
<i>Candida insectorum</i> CR96	ND	2.29
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> F112	1.55	1.85
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> F27	1.9	ND
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> CR72	2.67	2.56
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> CA87	3.37	2.72
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> CR64	2	ND
<i>Meyerozyma</i> sp. CR74	1.6	ND
<i>Torulaspora</i> sp. CA1010	ND	1.42
<i>Hanseniaspora uvarum</i> CA310	ND	2.19
<i>Hanseniaspora uvarum</i> CA311	ND	2.12
<i>Candida glabrata</i> CA323	ND	2.4
<i>Saitozyma podzolica</i> A122	ND	1.31
<i>Papiliotrema laurentii</i> CA522	ND	1.37

Three strains, belonging to species *Wickerhamomyces anomalus* and *M. guilliermondii*, exhibited solubilizing activity for the two sources of phosphate (aluminum and calcium), and *M. guilliermondii* CA87 had the strongest solubilizing activity, with an SI unit of 3.37 and 2.72, for aluminum- and tricalcium-phosphates, respectively (Figure 19). The *W. anomalus* (F112) and *M. guilliermondii* (CR72 and CA87) strains had the strongest solubilizing activity for the two sources of phosphate (aluminum and calcium).



**Figure 19. Halos produced by yeasts on Pikovskaya's agar by spot inoculation and incubation at 28 °C for 5 d. Phosphate- solubilizing medium separately by using (A and C) tricalcium-phosphates, (B and D) aluminum-phosphates as source of insoluble inorganic phosphate. Strains of *Meyerozyma guilliermondii* (A-B) and *Wickerhamomyces anomalus* (C-D).**

The soil yeast *M. guilliermondii* have been shown to possess antifungal activities (Coda et al. 2013) and phosphate-solubilization ability (Nakayan et al. 2013). In other study, *M. guilliermondii* strains showed highest phosphate-solubilizing capability for tricalcium-phosphate but none of these strains exhibited aluminum-phosphate-solubilizing capabilities (Nakayan et al. 2013). However, our strain exhibited strongest solubilizing activity for the two sources of phosphate, with high SI unit, becoming promising for future applications in agriculture.

Several other yeast species have also been characterized by their ability to solubilize phosphate (Hesham and Mohamed 2011; Al-Falih 2005; Sarabia et al. 2017; Mukherjee and Sen 2014). We detected this activity in 11 species of soil yeast, corroborating that yeasts could play a role in the transformation of organic materials and the mineralization of phosphate in soil.

Another activity detected in our isolates was the production of siderophores. Siderophores are organic molecules produced by microorganisms under iron-limiting conditions to increase the absorption of this nutrient (Saha et al. 2016). It is believed that siderophores can increase plant growth by increasing iron uptake (Saha et al. 2016); and still inhibit the growth of pathogens by the sequestration of iron from the environment (Calvente et al. 2001).

Production of siderophores was detected in 16 strains (4.2%), representing five species (Table 9). Our investigation of siderophore production revealed that strains of *Rhodotorula* genus showed the best siderophore- producing capacity. The relationship between a type of siderophores, called rhodotorulic acid, produced by species of the genus *Rhodotorula* and the antagonistic activity against fruit pathogens has already been demonstrated (Calvente et al. 2001).

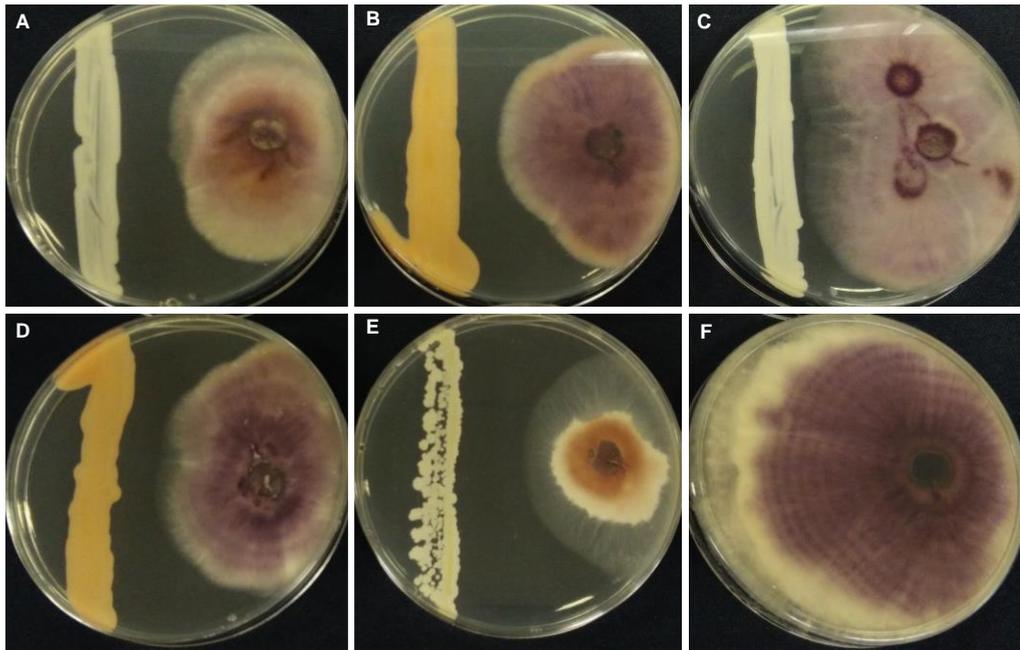
Interestingly, we did not detect a relationship between the production of siderophores and the antagonistic activity, since only three isolates that produced siderophores showed antagonistic activity (Table 9). The same result was reported by (Fu et al. 2016) where yeasts that showed antifungal activity did not necessarily produce siderophores. This finding may be related to the type of siderophore the strains are producing. Unfortunately, the methodology used in this work does not allow the identification of the siderophore type, being necessary future investigations.

**Tabela 9. Siderophore production and activity of antagonism against the soil-borne plant pathogens. ND: not detected.**

Species/ Strains	Siderophore production	Antagonism in solid medium (% inhibition)	
		<i>F. oxysporum</i>	<i>M. phaseolina</i>
<i>Candida parapsilosis</i> CA414	ND	25	ND
<i>Candida parapsilosis</i> CA824	ND	44	35
<i>Candida parapsilosis</i> CR75	ND	30	ND
<i>Candida parapsilosis</i> CR817	ND	37.5	ND
<i>Candida parapsilosis</i> CR818	ND	46	ND
<i>Candida insectorum</i> CR96	ND	32.5	ND
<i>Candida maltosa</i> CA215	ND	44	32
<i>Candida maltosa</i> CA216	ND	33	ND
<i>Candida maltosa</i> CA910	ND	50	ND
<i>Candida maltosa</i> CA48	ND	22	ND
<i>Candida maltosa</i> CA64	ND	44	ND
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> F112	ND	56	41

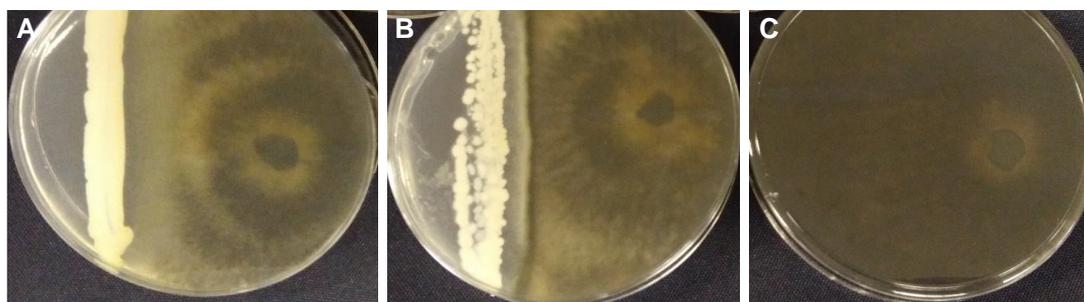
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> A416	(+)	ND	ND
<i>Meyerozyma</i> sp. CR74	ND	34	ND
<i>Candida glabrata</i> CA323	ND	37.5	ND
<i>Rhodotorula toruloides</i> CR13	(+)	ND	ND
<i>Rhodotorula toruloides</i> CA312	(+)	ND	ND
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CA322	(+)	ND	ND
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CA610	(+)	ND	ND
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CA314	(+)	ND	ND
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CE33	(+)	ND	ND
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CA313	(+)	ND	ND
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CA46	(+)	ND	ND
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CR53	(+)	ND	ND
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> F811	(+)	ND	ND
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CA317	(+)	30	ND
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CA319	(+)	40	40
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CA712	(+)	37.5	ND
<i>Rhodotorula</i> sp. CA521	(+)	ND	ND
<i>Papiliotrema laurentii</i> CA99	(+)	ND	ND
<i>Papiliotrema laurentii</i> CA522	ND	40	ND

The yeast isolates were investigated for their antagonistic activity against the soil borne fungal pathogens, and 18 strains (4.7%) exhibited antagonistic effects against two fungi tested on the PDA agar plates (Figure 20 and 21). The antagonistic activity was more prominent against *Fusarium oxysporum* with 18 strains exhibited antagonistic effects (Figure 20), belonging to species *C. parapsilosis*, *C. insectorum*, *C. maltosa*, *C. glabrata*, *W. anomalus*, *Meyerozyma* sp., *R. toruloides*, *R. mucilaginosa*, and *Papiliotrema laurentii*.



**Figura 20.** In vitro evaluation of antagonism in a solid medium by yeasts against the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. A: *Candida glabrata*, B and D: *Rhodotorula mucilaginosa*, C: *C. maltosa*, E: *Wickerhamomyces anomalus*, F: *F. oxysporum* alone as the control group.

The antagonistic activity was weak against *Macrophomina phaseolina*, with small zones of inhibition of fungal growth (Figure 21). Only four strains exhibited antagonistic effects belonging to species *C. parapsilosis*, *C. maltosa*, *W. anomalus*, and *R. mucilaginosa*.



**Figura 21.** Evaluation of in vitro antagonism in a solid medium by yeasts against the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. A: *Candida parapsilosis*, B: *Wickerhamomyces anomalus*, C: *M. phaseolina* alone as the control group.

The best results of inhibition of fungal growth were observed for the *W. anomalus* (F112) strain, inhibiting 56% of the mycelial growth of *F. oxysporum* and 41% of *M. phaseolina*. The *W. anomalus* specie is already known for its potential as a biocontrol agent, mainly for the production of killer toxins (Grzegorzczak et al. 2017; Fernández de Ullivarri et al. 2018).

Other three species, as *C. parapsilosis* (CA824), *C. maltosa* (CA215) and *R. mucilaginosa* (CA319) exhibited antagonistic activity against the two soil borne fungal pathogens. The *C. maltosa* was able to inhibit fungal growth through the production of antifungal metabolites (El-Mehalawy et al. 2004), but in this work presented a weak zone of inhibition for the tested fungi. However, *C. glabrata* and *R. mucilaginosa* strains showed a reduction in the growth of *F. oxysporum* (Figure 20). The ability to inhibit the growth of pathogens has already been demonstrated for these species (El-Mehalawy 2004; Ignatova et al. 2015). The mechanism used by the yeasts in the antagonistic activity was not evaluated. However, as the methodology used here was the direct co-inoculation of the pathogen with the yeast, probably the inhibition was by the action of antifungal compounds diffused by the culture medium.

Three strains highlights because they present the best results for more than one activity. The *C. insectorum* (CR96) was one of the best IAA producer, with and without tryptophan, had a high solubilization index of tricalcium-phosphates, and antagonistic activity against *F. oxysporum*. The *W. anomalus* (F112) showed ability to solubilize the two sources of phosphate (aluminum and calcium) and antagonistic activity against the two soil pathogens (*F. oxysporum* and *M. phaseolina*). While *R. mucilaginosa* (CA319) produced high concentrations of AIA, with and without tryptophan, was one of the best siderophore-producing capacity and presented antagonistic activity against the two pathogens.

The most isolates (28 isolates) that showed PGPs traits come from an iron-mining site in environmentally recovering (Table 6). This study highlights for the ecological role of these species in the recovery of soil quality and reestablishment of the plant community. Together, the three species have shown promise for future research on their potential in increasing plant growth *in vitro* and *in vivo*. Our results support ongoing prospecting of yeast isolates from natural ecosystems for future inclusion into

commercial PGP inoculants for sustainable agriculture, or its application in the recovery of degraded areas, increasing plant growth.

## References

Ahmed, E. & Holmström, S.J.M., 2014. Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), pp.196–208.

Al-Falih, A.M., 2005. Phosphate solubilization in vitro by some soil yeasts. *Qatar Univ. Sci. J.*, 25, pp.119–125.

Amprayn, K. et al, 2012. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. *Applied Soil Ecology*, 61, pp.295–299.

Berg, G., 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), pp.11–18.

Bernales, M. et al., 2019. Expression of two indole-3-acetic acid (IAA)-amido synthetase (GH3) genes during fruit development of raspberry (*Rubus idaeus* Heritage). *Scientia Horticulturae*, 246, pp.168–175.

Botha, A., 2011. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(1), pp.1–8.

Calvente, V. et al., 2001. Effect of nitrogen source and pH on siderophore production by *Rhodotorula* strains and their application to biocontrol of phytopathogenic moulds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(4), pp.226–229.

Coda, R. et al., 2013. Antifungal activity of *Meyerozyma guilliermondii*: Identification of active compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long-term storage of wheat bread. *Food Microbiology*, 33(2), pp.243–251.

de-Bashan, L.E., Hernandez, J.-P. & Bashan, Y., 2012. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology*, 61, pp.171–189.

Dell'Amico, E., Cavalca, L. & Andreoni, V., 2005. Analysis of rhizobacterial communities in perennial Graminaceae from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 52, pp.153–162.

El-Mehalawy, A., 2004. The rhizosphere yeast fungi as biocontrol agents for wilt disease of kidney bean caused by *Fusarium oxysporum*. *International J. Agri. Biol.*, pp.310–316.

El-Mehalawy, A.A. et al., 2004. Influence of maize root colonization by the rhizosphere

actinomycetes and yeast fungi on plant growth and on the biological control of late wilt disease. *International Journal of Agriculture and Biology*, 6(4), pp.599–605.

El-Tarabily, K.A., 2004. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 96(1), pp.69–75.

El-Tarabily, K.A. & Sivasithamparam, K., 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*, 47(1), pp.25–35.

Fernández de Ullivarri, M., Mendoza, L.M. & Raya, R.R., 2018. Characterization of the killer toxin KTCf20 from *Wickerhamomyces anomalus*, a potential biocontrol agent against wine spoilage yeasts. *Biological Control*, 121, pp.223–228.

Firincieli, A. et al., 2015. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic yeast *Rhodotorula graminis* WP1. *Frontiers in Microbiology*, 6, pp.6–11.

Fu, S.-F. et al., 2016. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera*. *Fungal Biology*, 120(3), pp.433–448.

Gastauer, M. et al., 2018. Mine land rehabilitation in Brazil: Goals and techniques in the context of legal requirements. *Ambio*. DOI: 10.1007/s13280-018-1053-8.

Gordon, S.A. & Weber, R.P., 1950. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 26, pp.192–195.

Grzegorzczuk, M. et al., 2017. Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food Microbiology*, 61, pp.93–101.

Hesham, A. & Mohamed, H., 2011. Molecular genetic identification of yeast strains isolated from Egyptian soils for solubilization of inorganic phosphates and growth promotion of corn plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, pp.55–61.

Ignatova, L. V. et al., 2015. Plant growth-promoting and antifungal activity of yeasts from dark chestnut soil. *Microbiological Research*, 175, pp.78–83.

Kaszycki, P. et al., 2006. Methylophilic extremophilic yeast *Trichosporon* sp.: a soil-derived isolate with potential applications in environmental biotechnology. *Acta biochimica Polonica*, 53(3), pp.463–473.

Limtong, S. & Koowadjanakul, N., 2012. Yeasts from phylloplane and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(12), pp.3323–3335.

Liu, W. et al., 2016. Characteristics of metal-tolerant plant growth-promoting yeast (*Cryptococcus* sp. NSE1) and its influence on Cd hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola*. *Environmental Science and Pollution Research*. DOI: 10.1007/s11356-016-7041-2.

- Mukherjee, S. & Sen, S.K., 2014. Exploration of novel rhizospheric yeast isolate as fertilizing soil inoculant for improvement of maize cultivation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. DOI:10.1002/jsfa.6848.
- Nakayan, P. et al., 2013. Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. *Plant and Soil*, 373(1–2), pp.301–315.
- Nassar, A.H., El-Tarabily, K.A. & Sivasithamparam, K., 2005. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils*, 42(2), pp.97–108.
- Nutaratat, P. et al., 2014. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. *Fungal Biology*, 118(8), pp.683–694.
- Quadros, P.D. et al., 2015. Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil. *Applied Soil Ecology*. DOI:10.1016/j.apsoil.2015.10.016.
- Rafi, M.M., Krishnaveni, M.S. & Charyulu, P.B.B.N., 2019. Phosphate-solubilizing microorganisms and their emerging role in sustainable agriculture. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, pp.223-233.
- Rao, R.P. et al., 2010. Aberrant synthesis of indole-3-acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* triggers morphogenic transition, a virulence trait of pathogenic fungi. *Genetics*, 185(1), pp.211–220.
- Ribeiro, C.M., Jurandy, E. & Nogueira, B., 2012. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiological Research*, 167(2), pp.69–78.
- Richardson, A.E. et al., 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, 321(1–2), pp.305–339.
- Saha, M. et al., 2016. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), pp.3984–3999.
- Saharan, B.S. & Nehra, V., 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, 2011, pp.1–30.
- Santos, J.V. et al., 2016. Biological attributes of rehabilitated soils contaminated with heavy metals. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(7), pp.6735–6748.
- Sarabia, M. et al., 2017. Rhizosphere yeasts improve P uptake of a maize arbuscular mycorrhizal association. *Applied Soil Ecology*. DOI:10.1016/j.apsoil.2017.12.012.
- Shah, S. et al., 2018. Isolation and characterization of plant growth-promoting endophytic fungi from the roots of *Dendrobium moniliforme*. *Plants*, 8(1), p.5.
- Silambarasan, S. et al., 2019. Evaluation of the production of exopolysaccharide by

plant growth promoting yeast *Rhodotorula* sp. strain CAH2 under abiotic stress conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, pp.55–62.

Silva, A.O. et al., 2018. Soil microbiological attributes indicate recovery of an iron mining area and of the biological quality of adjacent phytophysionomies. *Ecological Indicators*, 93, pp.142–151.

Sperandio, E.M., Martins do Vale, H.M. & Moreira, G.A.M., 2015. Yeasts from native Brazilian Cerrado plants: Occurrence, diversity and use in the biocontrol of citrus green mould. *Fungal Biology*, 119(11), pp.984–993.

Streletskaa, R.A. et al., 2016. Quantitative determination of indole-3-acetic acid in yeasts using high performance liquid chromatography—tandem mass spectrometry. *Microbiology*, 85(6), pp.727–736.

Sun, P. et al., 2014. Indole-3-acetic acid-producing yeasts in the phyllosphere of the carnivorous plant *Drosera indica* L. *PLoS ONE*, pp.1–22.

Syed, S. & Prasad Tollamadugu, N.V.K.V., 2019. Role of plant growth-promoting microorganisms as a tool for environmental sustainability. In: *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. Elsevier Inc., pp. 209–222.

Tenório, D.A. De et al., 2019. Biological control of *Rhizoctonia solani* in cowpea plants using yeast. *Tropical Plant Pathology*, 44, pp.113–119.

Yurkov, A.M., 2018. Yeasts of the soil - obscure but precious. *EcoYeast Primer*, 35, pp. 369-378.

## **CAPÍTULO 5 – Estrutura e composição das comunidades de leveduras em solos brasileiros: uma análise por *Metabarcoding***

### **Resumo**

Fungos são componentes importantes do ecossistema solo atuando, dentre outras coisas, na manutenção da estrutura do solo, mineralização de matéria orgânica e dissipação de carbono e energia. Uma significativa proporção dessas comunidades é composta por fungos unicelulares conhecidos por leveduras. Entretanto o conhecimento sobre a diversidade desse grupo em solos é baseado principalmente em experimentos de cultivo. Abordagens independentes de cultivo, como o sequenciamento de *amplicons* (*metabarcoding*), está se tornando uma ferramenta indispensável em estudos de ecologia microbiana. Neste estudo, utilizamos a abordagem de *metabarcoding* para descrever a estrutura e composição das comunidades de leveduras em diferentes ecossistemas dos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. Baseado em análises de *amplicons* da região ITS2, as sequências identificadas como leveduras representaram uma proporção de 16% das comunidades de fungos. O filo Ascomycota foi predominante, com a espécie *Exophiala bonariae* apresentando a maior abundância relativa. A estrutura e composição das comunidades entre os ecossistemas foi dissimilar, sugerindo que fatores ecológicos como tipo de vegetação, sazonalidade e gradiente altitudinal exercem influência sobre o comportamento dessas comunidades.

**Palavras-chave:** ITS2, fungos unicelulares, fitofisionomias, Illumina Miseq.

## Introdução

Solos configuram-se como um habitat peculiar de natureza complexa e altamente dinâmica onde ocorrem processos biológicos importantes e cruciais para a manutenção da vida no planeta (Moreira *et al.*, 2013). Sustentam uma imensa diversidade de microrganismos, embora, grande parte ainda permaneça inexplorada (Torsvik e Øvreås 2002). Os fungos representam um importante grupo de microrganismos nos solos (Fierer *et al.* 2007), do qual uma significativa proporção dessas comunidades é composta por fungos unicelulares conhecidos por leveduras (Masínová *et al.* 2017).

A maior parte do conhecimento sobre as comunidades fúngicas no solo, em especial a comunidade de leveduras têm sido obtido principalmente por meio de técnicas de cultivo (por exemplo, Mestre *et al.* 2014; Carvalho *et al.* 2013; Yurkov *et al.* 2012), o qual restringe a descrição da comunidade baseada apenas em táxons cultiváveis. Além disso, os estudos sobre a diversidade de leveduras em solos sob clima tropical e subtropical ainda são escassos, com alguns relatos em solos da América do Sul (Mestre *et al.* 2014; Toro *et al.* 2005; Mestre *et al.* 2011; Dunthorn *et al.* 2017), e poucos relatos para solos brasileiros (Pimenta *et al.* 2009; Carvalho *et al.* 2013; Moreira e Vale 2018).

Trabalhos recentes utilizando tecnologias de sequenciamento de nova geração e alto rendimento (Caporaso *et al.* 2012) baseado no sequenciamento de *amplicons* (*Metabarcoding*) têm permitido acessar a diversidade fúngica em diversas amostras ambientais (Zhang *et al.* 2016; Siles & Margesin 2016; Zifcáková *et al.* 2016; Dunthorn *et al.* 2017; Harantová & Frouz 2017). Alguns desses trabalhos têm mencionado a proporção de leveduras que compõem a comunidade fúngica em solos (Buée *et al.* 2014; Dunthorn *et al.* 2017; Masínová *et al.* 2017). O sequenciamento de *amplicons* padroniza o uso de um DNA *barcode*, o qual são sequências curtas de nucleotídeos (marcadores genéticos) bem estabelecidos para catalogar e identificar determinados grupos taxonômicos (Lindahl *et al.* 2013; Begerow *et al.* 2010).

Para fungos, a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rRNA têm sido amplamente aceita como marcador universal (Schoch *et al.* 2012) em estudos envolvendo sequenciamento de *amplicons*. A região ITS é a principal escolha como

marcador por possuir um gene altamente conservado (5.8 S), entre regiões altamente variáveis (ITS1 e ITS2), ocorrerem em múltiplas cópias no genoma e serem compartilhadas por todas as linhagens fúngicas, sendo facilmente amplificadas por PCR (Lindahl et al. 2013). Além disso, a região ITS representa o marcador genético com o maior número de sequências disponíveis em banco de dados de referência (Begerow et al. 2010).

A região ITS possui um tamanho altamente variável, indo de 450 a 750 bp, onde para propostas de *Metabarcoding* é utilizado a região ITS1 ou a ITS2 (Blaalid et al. 2013), devido a limitações do tamanho de fragmentos que podem ser sequenciados, embora novas tecnologias tenha permitido o sequenciamento da região ITS completa (Tedersoo et al. 2017). Entretanto, formação de sequências quiméricas durante a amplificação da região ITS completa por PCR, torna preferível a análise das regiões ITS1 e ITS2 separadamente em amostras ambientais (Blaalid et al. 2013).

Muitos conjuntos de *primers* tem sido propostos para essa finalidade (Toju et al. 2012; Ihrmark et al. 2012; Martin & Rygiewicz 2005) na tentativa de minimizar o viés inerente a técnica de amplificação (Aird et al. 2011). Masínová et al. (2017) utilizaram o sequenciamento de *amplicons* com um novo conjunto de *primers* para a região ITS2 (Ihrmark et al. 2012). Os autores conseguiram descrever as comunidades de leveduras em solos de florestas temperadas, determinando que essas comunidades representam uma proporção substancial das comunidades fúngicas. Este trabalho representa a primeira aplicação da técnica de sequenciamento de alto rendimento para avaliar especificamente a composição da comunidade de levedura em solo.

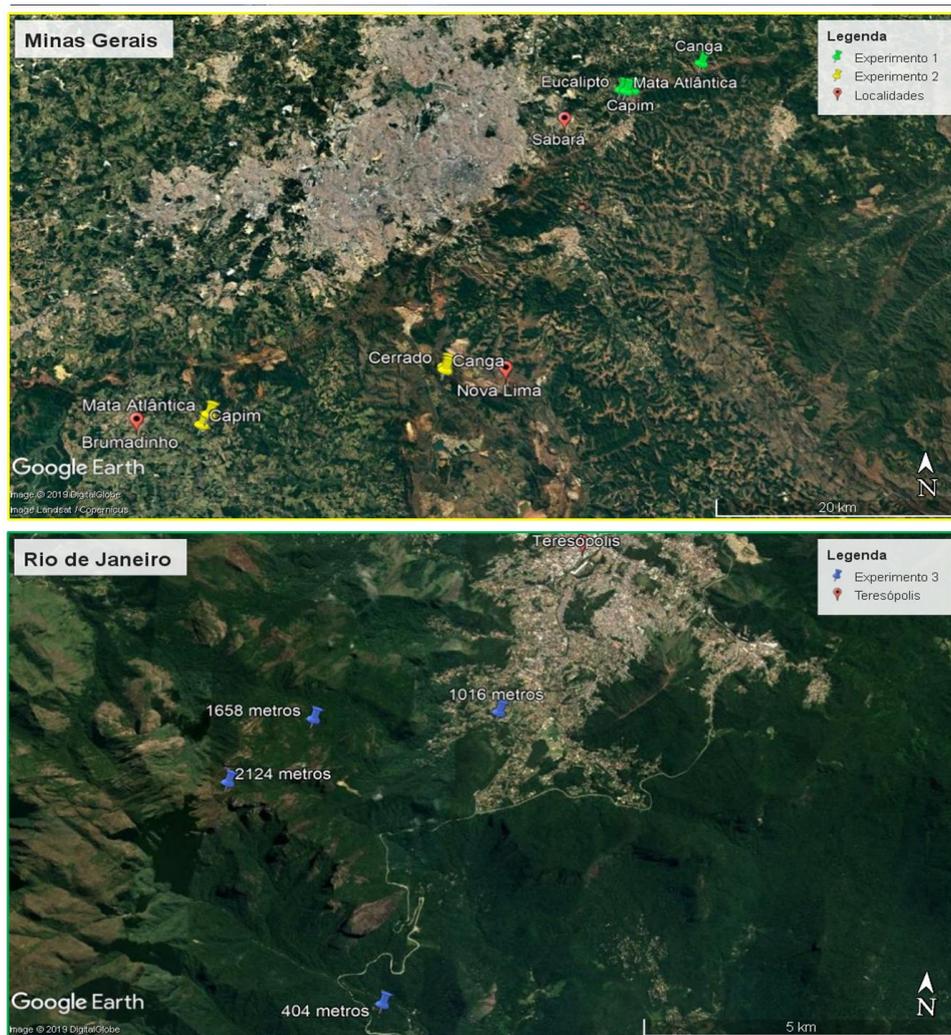
A comunidade de leveduras em solos sob diferentes fitofisionomias, incluindo vegetação natural e modificada, foram caracterizadas em áreas dos Estados de Minas Gerais (Capítulo 3) e Rio de Janeiro (Capítulo 2), utilizando técnicas de cultivo. Sabe-se que o tipo de vegetação é um dos principais determinantes do funcionamento biológico do solo que, conseqüentemente, afeta a estrutura da comunidade microbiana (Quirino et al. 2009; de Carvalho Mendes et al. 2012). Esse fato foi comprovado para essas comunidades caracterizadas por cultivo, onde o tipo de vegetação e as características do solo foram as principais características ambientais que moldaram a composição de espécies das comunidades.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho é complementar a descrição das comunidades de leveduras caracterizadas por meio de cultivo, aplicando a técnica de sequenciamento de alto rendimento baseada em *amplicons* da região ITS2. Nós hipotetizamos que as comunidades serão estruturalmente diferentes em cada ecossistema devido ao tipo de vegetação, sazonalidade e gradiente altitudinal, e que a técnica utilizada poderá recuperar táxons não detectados por meio de cultivo. Do ponto de vista ecológico propomos algumas questões a serem respondidas: 1) é possível identificar a proporção de leveduras presentes nas comunidades fúngicas do solo?; 2) de que forma as comunidades se comportam, quanto a composição de espécies e estrutura das comunidades, frente aos fatores ambientais como mudança de vegetação (experimento 1 e 2), sazonalidade (experimento 2) e gradiente altitudinal (experimento 3)?

## **Metodologia**

### **Área de estudo e amostragem**

Foram avaliadas três áreas de estudo: duas no Estado de Minas Gerais, em sítios desativados de mineração de ferro; e uma no Rio de Janeiro, em uma unidade de preservação ambiental (Figura 22). Todas as amostras foram coletadas em sacos plásticos e armazenadas para análises posteriores.



**Figura 22. Localização geográfica dos ecossistemas analisados nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro.**

O primeiro experimento foi realizado no Centro de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade do Quadrilátero Ferrífero (CeBio – VALE SA), localizado em Sabará, MG (Tabela 10). As amostras foram coletadas em setembro de 2013 (estação seca), em quatro diferentes fitofisionomias: Mata Atlântica, Canga, Eucalipto e Capim. Foram coletadas quatro amostras compostas por fitofisionomia. A fitofisionomia de Capim (*Melinis minutiflora*) é uma área sob processo de revegetação, que foi previamente utilizada como pilha de rejeitos provenientes do processo de mineração de ferro. A fitofisionomia de Eucalipto (*Eucalyptus* spp.) se caracteriza por ser uma área de vegetação não nativa (reflorestamento). Mata Atlântica e Canga são ecossistemas naturais, onde o último caracteriza-se como um ecossistema que se desenvolve sob afloramentos rochosos, com solos ácidos, nutricionalmente pobres e com alto teor de

alumínio e metais pesados (Skiryicz et al. 2014). Para maiores detalhes das áreas e processo de amostragem ver Moreira e Vale (2018).

O segundo experimento foi realizado no Centro de Tecnologia de Ferrosos (CTF – VALE SA) do Quadrilátero Ferrífero nas cidades de Brumadinho e Nova Lima, MG (Tabela 1). Para esse experimento foi avaliado a mudança sazonal e a influência da vegetação. As amostras foram coletadas em agosto de 2015 (estação seca) e janeiro de 2016 (estação chuvosa), em quatro diferentes fitofisionomias: Mata Atlântica, Cerrado, Canga e Capim. Foram coletadas 10 amostras compostas por fitofisionomia e estação sazonal. A fitofisionomia de Capim (*Urochloa brizantha* e *Panicum maximum*) é uma área em processo de revegetação, previamente utilizada como pilha de rejeitos provenientes do processo de mineração de ferro. Mata Atlântica, Cerrado e Canga são ecossistemas naturais, onde Canga caracteriza-se pelas mesmas propriedades descritas no experimento 1. Maiores detalhes das áreas e processo de amostragem ver Capítulo 3.

O terceiro experimento foi realizado no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO) no estado do Rio de Janeiro (Tabela 1). As amostras foram coletadas em junho de 2015 (inverno seco). As coletas foram feitas em um gradiente altitudinal com mudança vegetacional do Bioma Mata Atlântica: 404 metros (Floresta pluvial submontana), 1016 metros (Floresta montana), 1658 metros (Floresta pluvial alto-montana) e 2124 metros (Campo de altitude). Foram coletadas quatro amostras compostas por altitude avaliada. Maiores detalhes das áreas e processo de amostragem ver Capítulo 2.

**Tabela 10. Características das áreas de estudos e detalhamento dos 3 experimentos avaliados.**

Área de estudo	ID	Repetições	Fatores ambientais			
			Vegetação	Estação sazonal	Altitude	Nível de impacto
Centro de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade (CeBio), Sabará, MG	MF	2	Mata Atlântica	seca		nenhum
	CG	2	Campo Rupestre	seca		nenhum
	CP	2	Capim	seca		alto (área revegetada)
	ME	2	Eucalipto	seca		médio
	FLS	3	Mata Atlântica	seca		nenhum
	FLC	3		chuva		nenhum
	CES	3	Cerrado	seca		nenhum
Centro de Tecnologia de Ferrosos (CTF), Brumadinho e Nova Lima, MG	CEC	3	Campo Rupestre	chuva		nenhum
	CRS	3		seca		nenhum
	CRC	3	Capim	chuva		nenhum
	CAS	3		seca		alto (área revegetada)
	CAC	3	chuva		alto (área revegetada)	
	A1	4	Mata Atlântica (Floresta pluvial submontana)	seca	404 m	nenhum
Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO), Teresópolis, RJ	A2	4	Mata Atlântica (Floresta montana)	seca	1016 m	nenhum
	A3	4	Mata Atlântica (Floresta pluvial alto-montana)	seca	1658 m	nenhum
	A4	4	Mata Atlântica (Campo de altitude)	seca	2124 m	nenhum

### Extração de DNA e sequenciamento de amplicons

O DNA total das amostras de solo foi extraído utilizando o kit comercial PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio) de acordo com as recomendações do fabricante, em duplicatas para as amostras do CeBio (MG, experimento 1), triplicatas para o CTF (MG, experimento 2) e quadruplicatas para o PARNASO (RJ, experimento 3), totalizando 48 amostras.

Para caracterizar a diversidade das comunidades fúngicas do solo a região ITS2 do rRNA foi amplificada utilizando o par de primers gITS7/ITS4, conforme protocolo descrito por Masínová et al. (2017). As reações de PCR foram feitas para 25 µl, contendo: 12.5 µl do GoTaq Master Mix 2X, 1 µl de cada primer (10 µM), 0.3 µl de BSA (50 mg ml<sup>-1</sup>) e 1 µl do DNA template. As condições de termociclagem foram:

94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min, e 72°C por 1 min, com uma extensão final a 72°C por 10 min.

O sequenciamento dos *amplicons* foi feito utilizando a plataforma Illumina MiSeq, com o MiSeq Reagent Kit v2 (300 cycle), e bibliotecas de sequenciamento paired-ends (2 x 150 pb), realizado pela empresa BPI Bioinformática (Botucatu, São Paulo).

### **Processamento dos dados de sequenciamento**

Os dados do sequenciamento foram processados usando o pipeline DADA2 (Callahan et al. 2016) no R software. O DADA2 é um pipeline que analisa a qualidade e o comprimento das sequências, retira as sequências quiméricas e realiza a junção das *paired ends* (*forward* e *reverse*), e calcula as sequências representantes para formar a tabela de ASV (*Amplicons sequences variants*).

Inicialmente os *primers* foram identificados e removidos. A qualidade dos *reads* foi inspecionada; e as sequências foram filtradas por tamanho (minLen=130), descartando as sequências menores. Os *reads* (*Forward* e *Reverse*) foram concatenados utilizando a função JustConcatenated, uma vez que não houve regiões suficientes para realizar a sobreposição entre eles; e enfim as sequências quiméricas foram removidas. Após o processamento, as sequências restantes formaram a tabela de sequências variantes (*Amplicons sequences variants* - ASV), contendo a abundância de sequências variantes por amostra.

A abordagem utilizando o algoritmo DADA (*Divisive Amplicon Denoising Algorithm*) minimiza erros que podem ocorrer ao agrupar as sequências com 97% de semelhança na forma de unidades taxonômicas operacionais (OTU), o que poderia levar a perda de variação biológica. Dessa forma, o DADA infere a composição das amostras a partir da construção de uma tabela de sequências variantes (ASV), capturando e preservando a variação biológica presente no conjunto de dados, uma vez que não usa o *cutoff* de 97% (Callahan et al. 2016). A taxonomia foi atribuída utilizando a última versão do banco de dados UNITE para ITS (Nilsson et al. 2019).

## **Análises das comunidades**

O método de ordenação por NMDS (*Nonmetric multidimensional scale*) foi utilizada para visualizar de que forma as comunidades se comportam entre os diferentes experimentos e ecossistemas. O NMDS é uma abordagem baseada em classificação que produz uma ordenação a partir de uma matriz de distância ou dissimilaridade. Bray-Curtis, um índice de similaridade popular para dados de abundância, foi calculado e um valor de suporte estatístico (*Stress*) foi gerado (Kuramae et al. 2012). O NMDS foi feito com o pacote Vegan (Oksanen et al. 2016) no software R (R Development Core Team 2017).

Os índices de *alpha* diversidade correspondentes à riqueza e diversidade (Shannon e Simpson 1-D), relacionado aos táxons detectados nas amostras, foram calculados no programa Past (versão 3.10) (Hammer et al. 2001).

## **Resultados e Discussão**

### **Processamento dos dados de sequenciamento**

O sequenciamento das 48 amostras utilizando a plataforma Illumina Miseq rendeu um total de 6 527 713 *reads* referentes a região ITS2. Após cortar as sequências de baixa qualidade e remover os *reads* pequenos, um total de 1 498 503 sequências (23% do conjunto de dados brutos) da região ITS2 permaneceram no conjunto de dados para análises posteriores. Essa grande perda de dados refere-se principalmente ao grande volume de sequências pequenas (< 50 bp) que foram removidas, após filtrar o tamanho mínimo de 130 bp.

As sequências restantes representam uma média de 29 382 sequências por amostra. Entretanto, a quantidade de sequências por amostra variou bastante indo de um mínimo de aproximadamente 6 000 para um máximo de 62 000. Essas diferenças devem-se principalmente a problemas intrínsecos a cada amostra de solo que dificultaram os processos de pré-sequenciamento, como amplificação de DNA e preparação da biblioteca de sequenciamento.

Além do fato de boa parte das sequências terem apresentado tamanho pequeno (< 50 bp), também não apresentaram sobreposição suficiente entre os *reads forward* e *reverse* para realizar junção (*merge*) das sequências. Essa ausência de sobreposição entre as sequências pode ser consequência da alta variabilidade encontrada na região ITS (Nilsson et al. 2009), o que gera fragmentos com tamanhos variáveis e frequentemente sem sobreposição entre eles. Além disso, a falta de sobreposição também foi consequência da escolha da química de *paired-ends* de 2x150, o que pode ter limitado o tamanho dos fragmentos, e dessa forma não disponibilizando regiões de sobreposição.

Essa considerável perda durante a limpeza dos dados brutos já foi relatada utilizando o Illumina Miseq para comunidades de fungos do solo (Schmidt et al. 2013), e deve-se principalmente a generalidade do par de *primers* utilizados e a montagem dos *paired-ends* dificultadas pela ausência de sobreposição. Entretanto, várias fontes de erros podem ter sido incluídos desde a qualidade da extração de DNA, a combinação de *primers reverse* e *forward*, quantidade de ciclos utilizados na PCR, concentração do produto de PCR, método utilizado na construção da biblioteca de sequenciamento e a própria corrida de sequenciamento (Schirmer et al. 2015).

Devido ao tamanho dos fragmentos gerados e a falta de sobreposição entre eles, as sequências *forward* e *reverse* foram concatenadas, para obter tamanhos maiores, e assim realizar a atribuição taxonômica das sequências variantes (ASV) obtidas. Entretanto, essa estratégia rendeu fragmentos maiores, porém não conseguimos uma boa resolução taxonômica para além de Filo.

Masínová et al. (2017) utilizando a mesma abordagem e o mesmo conjunto de *primers* conseguiram avaliar especificamente a composição da comunidade de leveduras do solo a nível de espécie, descrevendo espécies de gêneros comumente relatados em solo como *Saitozyma*, *Solicoccozyma* e *Apiotrichum*. Por terem identificado espécies que são comumente detectadas por cultivo, Masínová et al. (2017) sugerem que as leveduras do solo representam um grupo de microrganismos bem cultiváveis.

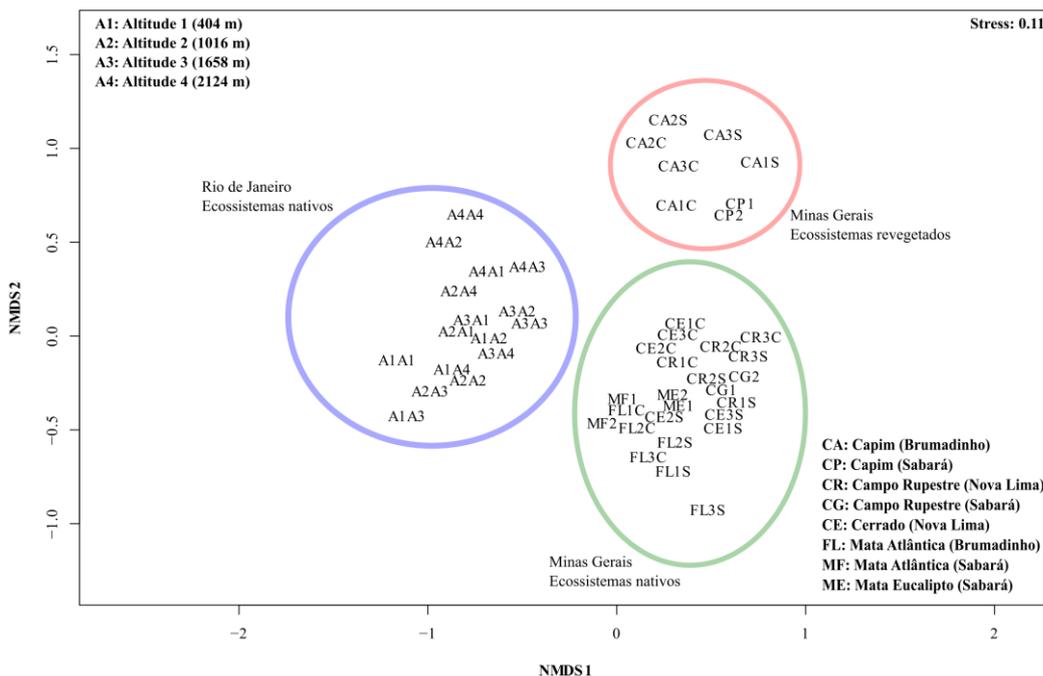
Entretanto, os autores não relatam problemas ou dificuldades com a atribuição taxonômica das espécies, o que pode indicar que não houve problemas com a escolha

dos *primers* aqui utilizados. O que nos leva a acreditar que a maior dificuldade em atribuir taxonomia para esse conjunto de dados esteja relacionada a concatenação das sequências, impedindo a identificação para além de filo.

Para contornar esse problema, utilizamos apenas as sequências *forward* para realizar a atribuição taxonômica, uma vez que elas apresentaram uma melhor qualidade, e assim evitamos a concatenação. Nessa proposta, trabalhamos com um subconjunto de dados contendo 2 293 179 sequências *forward*, após a limpeza dos dados brutos. Com isso, apesar de utilizarmos fragmentos pequenos (150 bp), conseguimos uma melhor resolução taxonômica, o que nos deu uma melhor visão sobre a composição de espécies entre as amostras, e a proporção de leveduras dentro dessas comunidades. Um total de 10 413 sequências variantes foram obtidas, sendo classificadas em 1 178 táxons. Entretanto, nem todos os táxons foi possível obter resolução taxonômica a nível de espécie.

### **Estrutura das comunidades fúngicas**

A estrutura geral e distribuição das comunidades fúngicas, baseado nos táxons identificados, para os dados de todos os experimentos foi visualizada utilizando *Nonmetric multidimensional scaling* (NMDS) (Figura 23). As comunidades se agruparam principalmente a partir de dois fatores: região e tipo de ecossistema. É possível observar uma clara separação entre as comunidades do RJ e de MG. Dentro de cada grupo, é possível observar o efeito da vegetação e da mudança antrópica da vegetação, uma vez que o sítio em reabilitação ambiental formou um grupo separado daquele com vegetação nativa.



**Figura 23. Ordenação espacial da distribuição das amostras construída utilizando NMDS a partir de uma matriz de similaridade baseada nas sequências variantes detectadas.**

Essa separação de comunidades microbianas entre áreas nativas e áreas degradadas por atividades de mineração já foi demonstrada por outros trabalhos (Harantová & Frouz 2017; Vieira et al. 2018), demonstrando a importância da comunidade microbiana na recuperação do solo e da vegetação desses sítios.

A estreita ligação entre plantas e fungos sugere que o tipo de vegetação pode moldar a estrutura da comunidade fúngica nos solos, conforme visualizado na Figura 23, e comprovado por outros autores onde a comunidade fúngica em solos florestais foi influenciada pelas espécies arbóreas dominantes (Urbanová et al. 2015), e pelo estágio de sucessão ecológica em uma área degradada por atividades de mineração (Harantová & Frouz 2017).

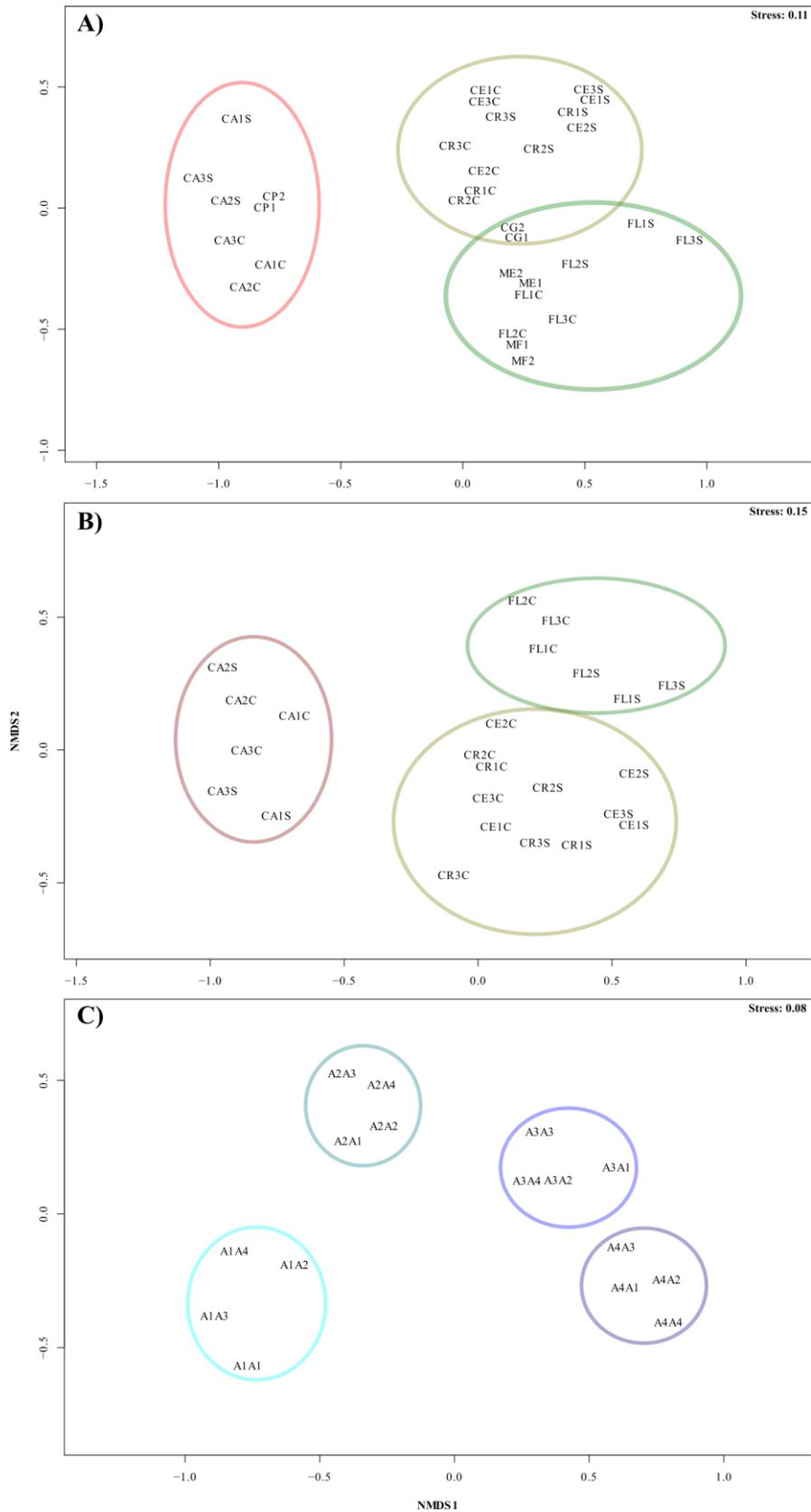
Ao analisar os experimentos separadamente, podemos observar o efeito de diferentes fatores ecológicos intrínsecos a cada experimento.

Uma correção entre a vegetação e a comunidade de leveduras em uma escala local é evidenciado na Figura 24A. Uma clara separação entre os biomas nativos e a

área em reabilitação ambiental é apresentada. A estrutura das comunidades entre os ecossistemas com vegetação diferente foi bastante dissimilar, evidenciando que as comunidades fúngicas no sítio em recuperação ambiental é diferente daqueles presentes em áreas nativas. Considerando que esses sítios estão geograficamente próximos e sob as mesmas condições climáticas, os resultados observados sugerem um forte efeito da vegetação sobre a estrutura dessas comunidades.

A sazonalidade (experimento 2) foi outro fator ecológico avaliado (Figura 24B). Embora esse tenha sido um fator que influenciou a composição da comunidade de leveduras obtida por meio de cultivo (Capítulo 3), não apresentou influencia evidente na estrutura das comunidades de leveduras obtidas por *Metabarcoding*. Embora para alguns ecossistemas tenha demonstrado uma leve influencia no agrupamento, de forma geral o efeito da vegetação foi mais pronunciado do que o da sazonalidade.

O efeito do gradiente altitudinal fica evidente (experimento 3), agrupando as comunidades por altitude (Figura 24C). O aumento da altitude também exerce influência sobre a vegetação, que embora seja o mesmo Bioma (Mata Atlântica), caracteriza-se por quatro diferentes fitofisionomias (Floresta pluvial submontana – 404 metros, floresta montana – 1016 m, floresta pluvial alto-montana – 1658 m, campo de altitude – 2124 m). Essa modificação na estrutura em resposta a mudança altitudinal também foi detectada na comunidade de leveduras obtida por cultivo (Capítulo 2).



**Figura 24. Ordenação espacial da distribuição das amostras construída utilizando NMDS, para o conjunto de dados separados por fator ambiental. A) tipo de vegetação; B) sazonalidade; C) gradiente altitudinal.**

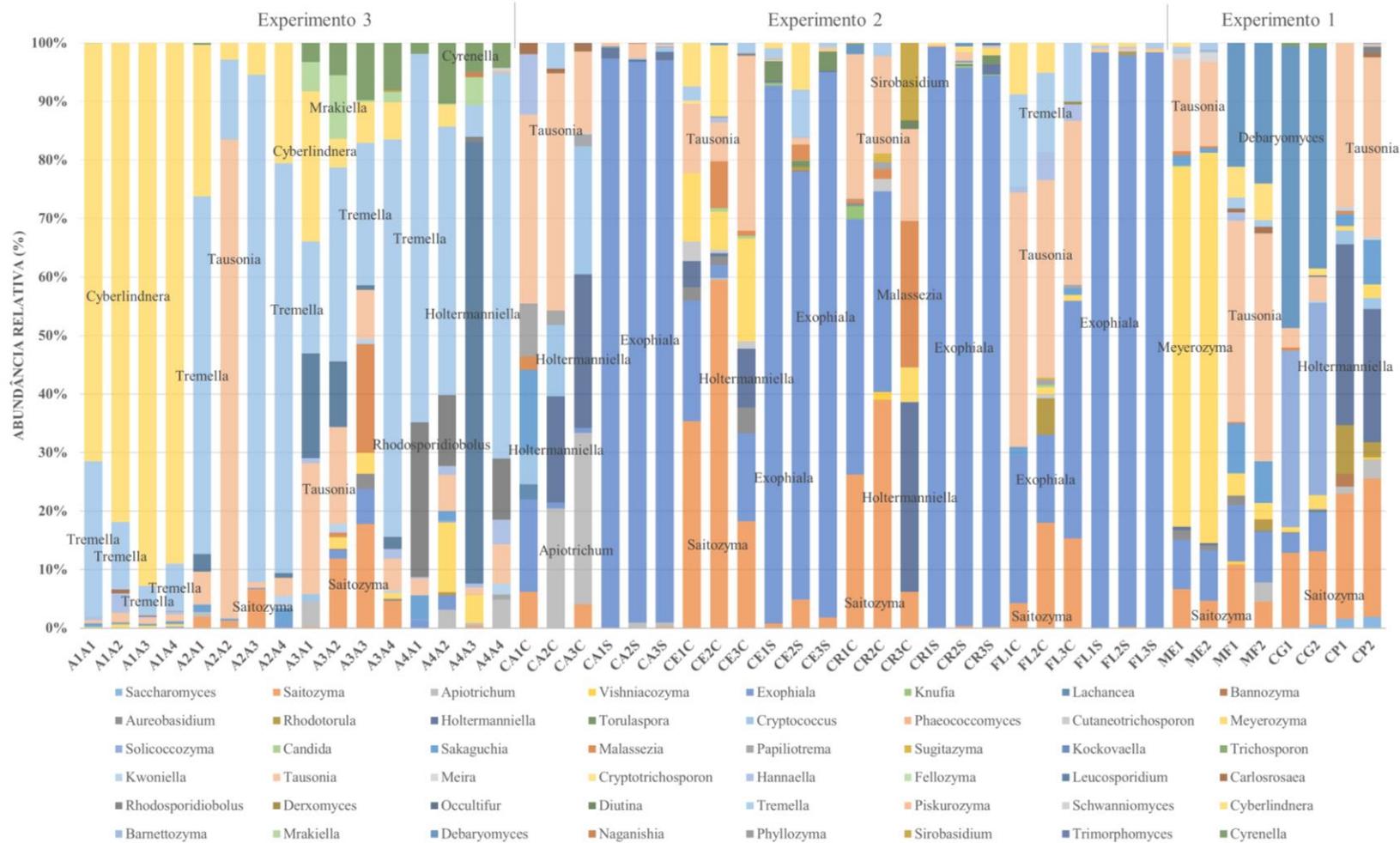
## Composição das comunidades de leveduras

Dentro da comunidade fúngica, 367 668 sequências foram atribuídas a táxons de leveduras, representando 16% do total de sequências (2 293 179). Essas sequências representaram 88 táxons, o que equivale a 7.5% do total de táxons encontrados (1178). A proporção de sequências referentes a leveduras detectadas corrobora com os achados por Masínová et al. (2017), em que a proporção de sequências de leveduras variou de 0.4 a 14% em solos de clima temperado.

Em termos de abundância de sequências, o filo Ascomycota foi predominante sobre o filo Basidiomycota, representando 74% do total de sequências. Entretanto, em termos de riqueza de táxons, o filo Basidiomycota predominou sobre o Ascomycota, representando 72% do total de táxons, embora em uma menor quantidade de sequências.

Nossos resultados corroboram a predominância do filo Ascomycota em solos de clima tropical e subtropical, tanto por abordagens baseadas em cultivo (Vital et al. 2002; Carvalho et al. 2013), como por abordagens utilizando *metabarcoding* (Dunthorn et al. 2017; Vieira et al. 2018). A maior abundância do filo Ascomycota, em termos de sequências, pode explicar os achados por meio de cultivo, uma vez que sendo mais abundantes são mais facilmente recuperadas em meio de cultivo.

A composição de espécies das comunidades foi diferente, em termos de abundância e riqueza, entre as amostras (Figura 25). Esse achado sugere um efeito dos fatores ambientais observados, como: mudança na vegetação, gradiente altitudinal, sazonalidade, atributos do solo. Entretanto, análises posteriores serão necessárias para avaliar o efeito de cada fator ambiental no conjunto de dados, separadamente por experimento. A influência de fatores ambientais na composição das comunidades já foi demonstrada para sazonalidade (Zifcáková et al. 2016), mudança na vegetação e propriedades do solo (Masínová et al. 2017; Schappe et al. 2017), gradiente altitudinal e propriedades do solo (Siles & Margesin 2016), gradiente altitudinal e sazonalidade (França et al. 2016), e a influência antrópica proveniente de atividades de mineração (Harantová & Frouz 2017; Vieira et al. 2018).



**Figura 25. Abundância relativa dos gêneros detectados entre as amostras de solo dos estados de Minas Gerais (experimentos 1 e 2) Rio de Janeiro (experimento 3). Em destaque no gráfico os gêneros com maior abundância relativa.**

Os 88 táxons identificados como leveduras representam 48 gêneros. Sete espécies foram detectadas em uma maior abundância relativa. *Exophiala bonariae* foi a espécie com maior abundância relativa (57%), seguida por *Cyberlindnera jadinii* (13%), *Tremella fuciformis* (9%), *Tausonia pullulans* (6.6%), *Meyerozyma guilliermondii* (2.5%), *Saitozyma podzolica* (2.2%) e *Leucosporidium yakuticum* (2%). Com exceção da última espécie (*Leucosporidium yakuticum*) que foi detectada apenas nas amostras do Rio de Janeiro, todas as outras apresentaram ampla ocorrência em todas as amostras analisadas. Todas as outras espécies apresentaram abundância relativa menores que 1%.

As espécies *Saitozyma podzolica* e *Meyerozyma guilliermondii* também foram detectadas por cultivo nas amostras analisadas (Capítulo 2 e 3; Moreira e Vale, 2018). *Saitozyma podzolica*, é uma espécie tipicamente pedobionte e tem sido encontrada frequentemente, mas não exclusivamente, em solos (Masínová et al. 2017; Yurkov et al. 2016; Vreulink et al. 2007; Yurkov et al. 2015; Glushakova et al. 2017). *Meyerozyma guilliermondii* tem sido detectada tanto na filosfera de plantas (Nasanit & Krataithong 2015) quanto em solos (Mokhtarnejad et al. 2016; Yurkov 2015).

Várias espécies do gênero *Exophiala* foram detectadas nas amostras, dentre elas a espécie com maior abundância relativa, *Exophiala bonariae*. Espécies desse gênero, juntamente com outros gêneros como *Aureobasidium*, são coletivamente denominadas leveduras negras (*black yeasts*) e caracterizam-se por possuírem a parede celular altamente melanizada formando colônias pigmentadas e estados hifais (Kurtzman & Fell 1998; Botha 2011). Além disso, elas são conhecidas pela sua capacidade de crescer em ambientes oligotróficos ou degradar materiais recalcitrantes (Isola et al. 2015).

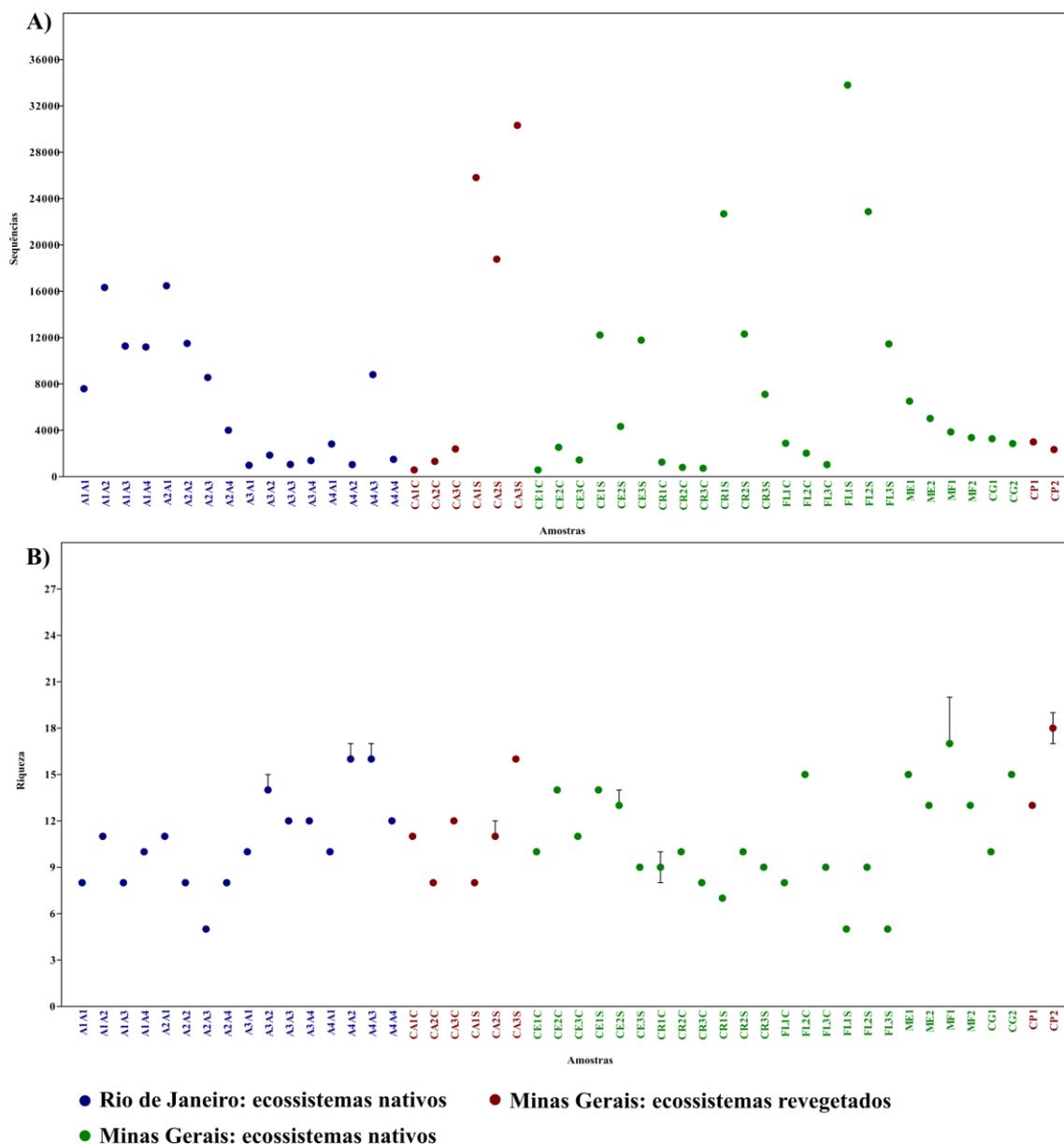
As espécies *Exophiala bonariae*, *Cyberlindnera jadinii*, *Tremella fuciformis* e *Tausonia pullulans*, apesar de terem sido abundantes pela abordagem do *metabarcoding*, não foram detectadas por meio de cultivo. Já outros gêneros que foram detectados com uma abundância relativa menor que 1%, como *Apiotrichum*, *Rhodotorula*, *Torulaspora*, *Cutaneotrichosporon*, *Candida*, *Papiliotrema*, *Barnettozyma* e *Debaryomyces*, foram detectados por meio de cultivo (Capítulo 2 e 3; Moreira e Vale, 2018).

## Alpha Diversidade

As diferenças nos índices de *alpha* diversidade referentes a riqueza de táxons e diversidade (Shannon e Simpson (1-D)) dos grupos taxonômicos entre as amostras são apresentados na Figura 26.

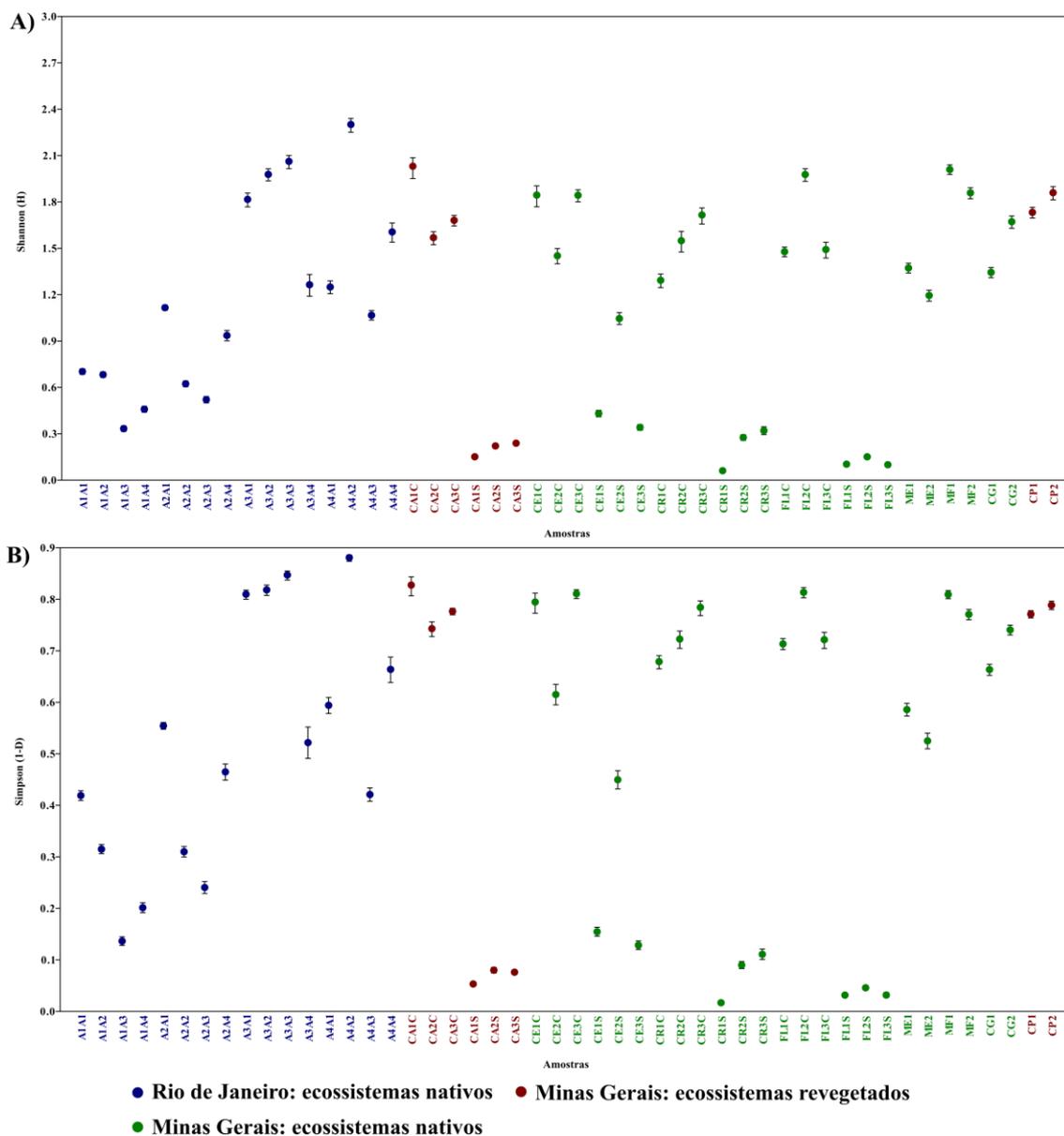
A figura 26A mostra a quantidade de sequências referentes a táxons de leveduras por amostra. Para a maior parte das amostras a quantidade de sequência variou de 4 000 a 16 000. Amostras do experimento 1 (capim, canga e mata atlântica), experimento 2 (capim, cerrado, canga e mata atlântica) e experimento 3 (altitudes 3 e 4) apresentaram as menores quantidades de sequências (< 4 000). Já na amostra de Mata Atlântica (FL1S, experimento 2), apresentou a maior quantidade de sequências, e essas foram referentes a espécie com maior abundância relativa, *Exophiala bonariae*, indicando a dominância dessa espécie nessa amostra. Nessas amostras também foram detectados a menor riqueza de táxons (Figura 26B).

A riqueza de táxons foi uniforme para a maioria das amostras, com exceção das amostras de Capim (CP2, CA3S), Mata Atlântica (MF1), Altitude 4 (A4A2, A4A3) que apresentaram maior riqueza.



**Figura 26. Análises de diversidade das amostras em ecossistemas nativos e revegetados dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. A) Quantidade de sequências por amostra; B) Riqueza de táxons por amostra.**

O índice de Shannon mensura o quão uniformemente os táxons estão distribuídos entre as amostras. Esse índice aumenta à medida que a riqueza e a uniformidade da comunidade aumentam. Amostras das Altitudes 3 e 4 (experimento 3); Capim chuva, cerrado chuva, canga chuva, mata atlântica chuva (experimento 2); mata atlântica, eucalipto, canga e capim (experimento 1 – estação seca) apresentaram-se mais diversas em comparação com as outras amostras (Figura 27A).



**Figura 27. Análises de diversidade das amostras em ecossistemas nativos e revegetados dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. A) Índice de Shannon (H); B) Índice de Simpson (1-D).**

O índice de Simpson, indica a probabilidade de dois indivíduos retirados ao acaso da comunidade pertencerem a espécies diferentes, dando maior peso aos táxons dominantes (Melo 2008). Dessa forma quanto mais próximo de 1, maior a diversidade das amostras. A diversidade revelada por esse índice foi similar ao encontrado pelo índice de Shannon. As amostras de Capim seca, cerrado seca, canga seca e mata atlântica seca (experimento 2); e altitude 1 e 2 (experimento 3) apresentaram os valores mais próximos de 0, indicando a dominância de poucos táxons nas amostras (Figura 27B).

Amostras da altitude 1 foi dominada pelo gênero *Cyberlindnera*, enquanto que amostras da altitude 2 foi dominada pelos gêneros *Tremella* e *Tausonia*. As amostras de Capim seca, cerrado seca, canga seca e mata atlântica seca foram dominadas pelo gênero *Exophiala* (Figura 25). Embora as outras amostras tenham tido gêneros dominantes, não foi tão proeminente quanto as amostras citadas.

De forma geral, a riqueza e diversidade entre os ecossistemas revegetados e nativos não apresentaram grande diferença, embora a estrutura e composição das comunidades entre eles tenham sido diferentes. Os táxons *Apiotrichum sporotrichoides*, *Bannozyma* sp., *Cryptococcus cuniculi*, *Cryptococcus uniguttulatus*, *Rhodospordiobolus ruineniae* e *Kockovaella* sp. foram detectados apenas nos ecossistemas revegetados, sugerindo um papel ecológico no processo de reabilitação desses ecossistemas. Comunidades fúngicas diversas e abundantes foram encontradas durante o processo de sucessão primária em áreas degradadas pelas atividades de mineração (Harantová & Frouz 2017), demonstrando a importância dessas comunidades em áreas sob reabilitação.

Para o experimento 2, onde analisamos o efeito da sazonalidade, é interessante observar que as amostras referentes ao período de seca apresentaram baixa diversidade comparado ao período de chuva. Em todas essas amostras houve a dominância do gênero *Exophiala*. Enquanto que no período de chuva a diversidade foi maior, com uma maior riqueza de táxons. Essas diferenças sazonais nas comunidades fúngicas já é conhecida (Zifcáková et al. 2016), e foi detectada também por meio de cultivo (Capítulo 3). Mudanças na temperatura e deposição de matéria orgânica entre as estações podem ser os fatores mais importantes que afetam a composição das comunidades microbianas no solo (Zifcáková et al. 2016).

Para o experimento 3, onde analisamos o efeito do gradiente altitudinal, observa-se que a riqueza e diversidade aumenta conforme aumenta a altitude, embora a quantidade de sequências tenha sido menor nessas amostras. A composição de espécies entre as altitudes também diferiu por meio de cultivo (Capítulo 2). Siles & Margesin (2016) demonstram que a estrutura da comunidade fúngica em solos diferiu ao longo de um gradiente altitudinal principalmente devido a mudanças na razão C/N. Gradiente altitudinal associado a mudanças na temperatura e precipitação tem sido considerados

os principais preditores da variação de composição das comunidades microbianas (Singh et al. 2014).

## **Conclusões**

A abordagem por *metabarcoding* demonstrou aplicabilidade em estudos ecológicos de leveduras do solo, permitindo acessar a proporção de espécies de leveduras dentro da comunidade de fungos, e identificando taxas raras não detectados por meio de cultivo.

A composição das comunidades foi diferente daquelas obtidas por meio de cultivo. Dentre as espécies abundantes apenas duas foram encontradas por meio de cultivo, *Saitozyma podzolica* e *Meyerozyma guilliermondii*.

A estrutura e composição de espécies modificou entre as amostras e experimentos analisados, sugerindo uma influência dos fatores ambientais como tipo de vegetação, sazonalidade e gradiente altitudinal.

## **Perspectivas futuras**

- Separar os dados por experimento para a escrita dos manuscritos.
- Analisar os dados separadamente por experimentos, e investigar estatisticamente qual o principal fator ecológico que está moldando as comunidades de leveduras nas amostras.
- Realizar análises de curva de rarefação e acumulação de espécies, para verificar se a quantidade de sequências obtidas foi suficiente para revelar a real riqueza de espécies das amostras.
- Testar outras metodologias para melhorar a resolução taxonômica dos dados.

## Referências

- Aird, D. et al., 2011. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biology*, 12(2).
- Begerow, D. et al., 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), pp.99–108.
- Blaalid, R. et al., 2013. ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources*, pp.1–7.
- Botha, A., 2011. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(1), pp.1–8.
- Buée, A.M. et al., 2014. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an high fungal diversity unexpectedly. *New Phytologist*, 184(2), pp.449–456.
- Callahan, B.J. et al., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7).
- Caporaso, J.G. et al., 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, 6(8), pp.1621–1624.
- Carvalho, F.P. et al., 2013. Yeasts diversity in Brazilian Cerrado soils: Study of the enzymatic activities. *African Journal of Microbiology Research*, 7(32), pp.4176–4190.
- de Carvalho Mendes, I. et al., 2012. Biological functioning of Brazilian Cerrado soils under different vegetation types. *Plant and Soil*, 359(1–2), pp.183–195.
- Dunthorn, M. et al., 2017. Yeasts dominate soil fungal communities in three lowland Neotropical rainforests. *Environmental Microbiology Reports*, 9, pp.668–675.
- Fierer, N. et al., 2007. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), pp.7059–7066.
- França, L. et al., 2016. Seasonal and altitudinal changes of culturable bacterial and yeast diversity in Alpine forest soils. *Extremophiles*.
- Glushakova, A.M. et al., 2017. Distribution of Yeast Complexes in the Profiles of Different Soil Types. *Eurasian Soil Science*, 50(7), pp.820–825.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. a. T. & Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1)(1), pp.1–9.
- Harantová, L. & Frouz, J., 2017. Development of microbial community during primary succession in areas degraded by mining activities. *Land Degradation and Development*, 28, pp.2574–2584.
- Ihrmark, K. et al., 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by

- 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 82, pp.666–677.
- Isola, D., Zucconi, L. & Onofri, S., 2015. Extremotolerant rock inhabiting black fungi from Italian monumental sites. *Fungal Diversity*. Doi: 10.1007/s13225-015-0342-9
- Kurtzman, C.P. & Fell, J.W., 1998. *The Yeast: a taxonomic study*.
- Lindahl, B. et al., 2013. Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user ’ s guide. *New Phytologist*, 199(1), pp.288–299.
- Martin, K.J. & Rygiewicz, P.T., 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC microbiology*, 5, p.28.
- Masínová, T. et al., 2017. Drivers of yeast community composition in the litter and soil of a temperate forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 93, pp.1–10.
- Melo, A.S., 2008. O que ganhamos “confundindo” riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade? *Biota Neotropica*, 8(3), pp.21–27.
- Mestre, M.C. et al., 2011. Yeast communities associated with the bulk-soil, rhizosphere and ectomycorrhizosphere of a *Nothofagus pumilio* forest in northwestern Patagonia, Argentina. *FEMS microbiology ecology*, 78(3), pp.531–41.
- Mestre, M.C., Fontenla, S. & Rosa, C. a, 2014. Ecology of cultivable yeasts in pristine forests in northern Patagonia (Argentina) influenced by different environmental factors. *Canadian journal of microbiology*, 60(6), pp.371–82.
- Mokhtarnejad, L., Arzanlou, M. & Babai, A., 2016. Characterization of basidiomycetous yeasts in hypersaline soils of the Urmia Lake National Park, Iran. *Extremophiles*.
- Moreira, G.A.M. & do Vale, H.M.M., 2018. Occurrence of Yeast Species in Soils under Native and Modified Vegetation in an Iron Mining Area. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 42, pp.1–15.
- Nasanit, R. & Krataithong, K., 2015. Assessment of epiphytic yeast diversity in rice (*Oryza sativa*) phyllosphere in Thailand by a culture-independent approach. *Antonie van Leeuwenhoek*, pp.1475–1490.
- Nilsson, R.H. et al., 2009. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiology Letters*, 296, pp.97-101.
- Nilsson, R.H. et al., 2019. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, 47, pp.259–264.
- Pimenta, R.S. et al., 2009. Yeast communities in two Atlantic rain Forest fragments in Southeast Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), pp.90–95.
- Quirino, B.F. et al., 2009. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. *Microbiological Research*, 164(1), pp.59–70.

Schappe, T. et al., 2017. The role of soil chemistry and plant neighbourhoods in structuring fungal communities in three Panamanian rainforests. *Journal of ecology*, 105, pp.569–579.

Schirmer, M. et al., 2015. Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. *Nucleic Acids Research*, 43(6).

Schmidt, P. et al., 2013. Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biology and Biochemistry*, (June), pp.1–5.

Schoch, C.L. et al., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), pp.6241–6.

Siles, J.A. & Margesin, R., 2016. Abundance and diversity of bacterial, archaeal, and fungal communities along an altitudinal gradient in alpine forest soils: what are the driving factors? *Microbial Ecology*, 72(1), pp.207–220.

Singh, D. et al., 2014. Strong elevational trends in soil bacterial community composition on Mt. Halla, South Korea Dharmesh. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, pp.140–149.

Skirycz, A. et al., 2014. Canga biodiversity, a matter of mining. *Frontiers in plant science*, 5, p.653.

Tedersoo, L., Tooming-klunderud, A. & Anslan, S., 2017. Methods PacBio metabarcoding of Fungi and other eukaryotes: errors, biases and perspectives. *New Phytologist*. doi: 10.1111/nph.14776.

Toju, H. et al., 2012. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS ONE*, 7(7).

Toro, M.E. et al., 2005. Diversidad de levaduras en canopias y suelos asociados con *Bulnesia retama* y *Larrea divaricata*. *Revista Argentina de Microbiología*, 37, pp.209–213.

Torsvik, V. & Øvreås, L., 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current opinion in microbiology*, 5(3), pp.240–5.

Urbanová, M., Snajdr, J. & Baldrian, P., 2015. Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees. *Soil Biology & Biochemistry*, pp.1–13.

Vieira, C.K. et al., 2018. Microbiome of a revegetated iron-mining site and pristine ecosystems from the Brazilian Cerrado. *Applied Soil Ecology*, 131, pp.55–65.

Vital, M. et al., 2002. Mycocinogenic yeasts isolated from amazon soils of the Maracá ecological station, Roraima-Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, pp.230–235.

Vreulink, J.-M. et al., 2007. Soil properties that impact yeast and actinomycete numbers in sandy low nutrient soils. *Canadian journal of microbiology*, 53(12), pp.1369–74.

Yurkov, A. M., Kemler, M. & Begerow, D., 2012. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal Ecology*, 5(1), pp.24–35.

Yurkov, A.M. et al., 2015. Local climatic conditions constrain soil yeast diversity patterns in mediterranean forests, woodlands and scrub biome. *FEMS Yeast Research*, 16(1).

Yurkov, A.M. et al., 2016. Yeast diversity and species recovery rates from beech forest soils. *Mycological Progress*, 15(8), pp.845–859.

Zhang, L. et al., 2016. Fungal communities from the calcareous deep-sea sediments in the Southwest India Ridge revealed by Illumina sequencing technology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(5).

Zifcáková, L. et al., 2016. Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter. *Environmental Microbiology*, 18(1), pp.288–301.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ecologicamente, as leveduras têm sido encontradas em uma diversa gama de habitats, incluindo os solos, ambientes aquáticos, superfícies de plantas, alimentos, pele e mucosas de animais hospedeiros, dentre outros (Buzzini *et al.* 2017). Entretanto, a maior parte do conhecimento acumulado a respeito de leveduras provém da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, por ser o organismo utilizado como sistema modelo em estudos de genética, biologia molecular, evolução e ecologia microbiana (Replansky *et al.* 2008). Ainda há muito para avançar no que diz respeito a ecologia, evolução e diversidade de leveduras nos mais diversos habitats naturais, fora do complexo *Saccharomyces*.

Um esforço tem sido feito, ainda que com cunho meramente industrial, para isolar e estudar populações de leveduras em amostras ambientais como um repositório de estirpes que apresente uma melhor performance industrial do que aquelas estirpes tradicionalmente utilizadas (Steensels *et al.* 2014). A exploração de uma diversidade de leveduras em ambientes naturais, mesmo que não tenha o viés ecológico embutido, tem aumentando nosso conhecimento a respeito da imensa diversidade e distribuição desse grupo.

Neste estudo foi proposto estudar a diversidade e ecologia de leveduras em amostras de solo provenientes dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, utilizando abordagens dependentes e independentes de cultivo. Aqui nós corroboramos nossa hipótese geral do trabalho, ao demonstrar ao longo da tese que a composição de espécies das comunidades de leveduras nos solos diferiu como consequência dos fatores ecológicos avaliados e da abordagem utilizada para acessar a diversidade.

Um conjunto complexo de fatores ecológicos afeta a distribuição, composição e estrutura das comunidades de leveduras no solo (ver Capítulo 1, Quadro 1). Esse fato foi bem demonstrado para o conjunto de amostras de solo avaliada nesse estudo. Mesmo em uma escala local, dentro de um mesmo Bioma ou de uma mesma área amostrada, as variações nas comunidades de leveduras podem ocorrer como consequências de variações temporais e espaciais, ambientais, fitofisionômicas, dentre

outros conjuntos de características intrínsecas ao ponto amostral e/ou momento da coleta. Portanto, torna-se difícil estabelecer um padrão comportamental das comunidades diante tanta variação a qual ela está sujeita. Embora seja possível obter algumas conclusões interessantes de forma geral a respeito de quais variáveis mais influenciam o comportamento das comunidades naquela determinada amostra.

Através da abordagem baseada em cultivo, verificamos que leveduras basidiomicéticas dominaram sobre ascomicéticas nas comunidades do estado do Rio de Janeiro. Enquanto que nas comunidades de leveduras em Minas Gerais, ascomicetos dominaram sobre basidiomicetos. O primeiro padrão detectado vai de acordo com o descrito para comunidades de leveduras em formações florestais (Sláviková e Vadkertiová, 2000), enquanto que o segundo padrão é descrito para solos cultivados (Sláviková e Vadkertiová, 2003a), em comunidades de leveduras descritas em regiões temperadas.

Visto por outra perspectiva, formações florestais como a Mata Atlântica no Rio de Janeiro (Capítulo 2) possuem solos ricos em matéria orgânica, e devido a baixas temperaturas as quais aquela região está sujeita, o processo de decomposição pode ser mais lento, limitando a disponibilidade de nutrientes o que favorece o crescimento e permanência de basidiomicetos no solo, devido a habilidade deste grupo em utilizar compostos de carbono complexos (Yurkov, 2017). As condições ambientais encontradas no PARNASO (Cadeia de montanhas Serra do Mar), se assemelham as condições ambientais de regiões temperadas e boreais, onde os estudos revelam uma maior predominância de basidiomicetos nas comunidades de leveduras.

Por outro lado, nas comunidades de leveduras de Minas Gerais (Capítulo 3), houve uma predominância de ascomicetos. Este achado vai de acordo com outros trabalhos realizados em clima tropical (Dunthorn et al., 2017; Carvalho et al. 2013; Gomes et al., 2003; Vital et al. 2002). Pode ser que em climas tropicais realmente exista uma predominância de ascomicetos, embora para alguns ecossistemas específicos o contrário seja verdadeiro, conforme visto para Mata Atlântica. Por isso que muito mais do que tentar estabelecer um padrão de dominância dependente do clima ou região observado, devemos olhar para como a comunidade se comporta em cada ecossistema.

O gradiente altitudinal foi um dos principais fatores ecológicos que influenciaram a composição das comunidades de leveduras no estado do Rio de Janeiro (Capítulo 2). Dentro do Bioma Mata Atlântica, observa-se diferentes fitofisionomias de acordo com a altitude, indo de floresta montana (404 metros) a Campos de altitude (2124 metros). Essas diferenças se refletiram também na comunidade de leveduras, onde observamos uma diversificação conforme a elevação. A comunidade de leveduras na maior altitude (2124 metros), apresentou uma menor abundância, porém maior riqueza. Nós acreditamos que essa tendência esteja relacionada ao conjunto de condições ambientais (características da vegetação, baixas temperaturas e maior incidência de radiação UV) relacionadas a essa altitude, o que favoreceu a emergência de espécies únicas e adaptadas a essas condições, como espécies psicotolerantes (*Leucosporidium scottii*, *L. golubevii*) e pigmentadas (*Cystofilobasidium infirmominiatum*).

Outro fato interessante para essas comunidades foi a diversidade intraespecífica dos isolados de *Saitozyma podzolica* entre as altitudes. Esta espécie é uma típica habitante do solo relatada em diversos trabalhos em diferentes partes do mundo. Ela foi detectada em todas as altitudes, apenas diminuindo em abundância a medida que aumentava a altitude. A análise de rede de haplótipos evidenciou a relação do gradiente altitudinal com a diversidade genética dessa espécie. Interessantemente, foram observados quatro haplótipos diferentes, onde um dos haplótipos (H1) dominou na altitude 1 (404 metros), e outro haplótipo (H4) dominou na altitude 4 (2124 metros), e uma mistura entre eles foi detectado nas altitudes intermediárias (1016 e 1658 metros). Este fato reflete a mudança na vegetação e nas características do solo, que também se alteraram com o gradiente altitudinal. Dessa forma, estabelecemos uma correlação positiva entre o gradiente altitudinal, a vegetação e atributos do solo com a composição e estrutura das comunidades de leveduras.

Em outro cenário, onde o gradiente altitudinal não é um fator determinante, o tipo de vegetação pode influenciar a composição das comunidades. Para as comunidades de leveduras avaliadas no estado de Minas Gerais, vemos que a vegetação e a sazonalidade foram os principais fatores que ditaram a composição das comunidades. As comunidades foram fundamentalmente diferentes, e não houve espécie compartilhada entre todos os ecossistemas. Interessantemente, a maior riqueza

de espécies foi detectada no ecossistema em reabilitação ambiental, o que pode ser um indicio da importância desse grupo na recuperação e bom funcionamento do ecossistema solo. Além disso, *Candida maltosa* foi a principal espécie detectada nessa área, e tem sido comumente associada a ambientes altamente impactados, possuindo habilidades ecológicas importantes na recuperação desses ambientes.

Áreas degradadas por atividades de mineração, como a área de Capim aqui avaliada, depende do desenvolvimento e estabelecimento de plantas e comunidades microbianas no solo para o reestabelecimento do ecossistema. Nos estágios iniciais de sucessão ecológica em áreas degradadas, a composição da comunidade de plantas é determinada principalmente por fatores abióticos e pelo pool de espécies já presentes naquele sítio (Prach & Řehouňková, 2006). A riqueza e abundância de espécies fúngicas tende a ser maior nos estágios iniciais de sucessão, e ir diminuindo nos estágios posteriores, com uma maior abundância relativa de Ascomycota nos estágios iniciais que vai diminuindo e sendo substituída por uma maior abundância relativa de Basidiomycota, com o tempo (Harantová & Frouz 2017). Esse padrão foi detectado na área de Capim, indicando a importância de leveduras ascomicéticas no estabelecimento de um sistema biológico funcional, e na etapa de sucessão ecológica.

Outro fator interessante foi a sazonalidade. A comunidade fúngica em solos é afetada pela sazonalidade, provocando mudanças na biomassa fúngica, atividade enzimática, composição e abundância relativa entre as estações (Vorísková et al. 2014). A sazonalidade modificou a composição das comunidades de duas formas: aumentando o teor de água do solo, o que favoreceu a emergência de espécies que poderiam estar em estado dormente durante o período seco; e inserindo no solo espécies provenientes do decaimento de material vegetal. Dessa forma, espécies pigmentadas e tipicamente associada a plantas, como *Rhodotorula toruloides* e *R. mucilaginosa*, foram detectadas nas comunidades do solo apenas durante o período chuvoso.

Entretanto, as comunidades de leveduras foram mais dissimilares entre os sítios, ou seja, o tipo de ecossistema/ vegetação teve um efeito mais pronunciado do que a sazonalidade. O mesmo efeito foi detectado por Vieira et al. (2018) ao analisar o microbioma do solo das mesmas amostras aqui avaliadas, incluindo procariotos (bactéria e archeias) e eucariotos, onde foi demonstrado um forte efeito da vegetação

sobre a composição da comunidade microbiana do solo a níveis taxonômicos mais baixos, como família e gênero.

Uma alta heterogeneidade na composição de espécies das comunidades fúngicas entre amostras dentro do mesmo ecossistema e entre ecossistemas foi demonstrado neste trabalho, e vai de acordo com trabalhos anteriores em clima tropical (Dunthorn et al. 2017).

Utilizando a abordagem independente de cultivo (*Metabarcoding* – Capítulo 5), nós observamos o mesmo padrão de dissimilaridade entre as amostras, confirmando mais uma vez que as características intrínsecas a cada ecossistema moldaram a composição das comunidades de leveduras no solo. Interessante, mas não surpreendente, o *Metabarcode* revelou uma composição de espécies das comunidades significativamente diferente daquelas encontradas por cultivo.

As espécies *Exophiala bonariae*, *Cyberlindnera jadinii*, *Tremella fuciformis*, *Tausonia pullulans*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Saitozyma podzolica* e *Leucosporidium yakuticum* foram as mais abundantes detectadas por *Metabarcode*. Dessas, apenas *Meyerozyma guilliermondii* e *Saitozyma podzolica* foram detectadas por cultivo. Enquanto que *Saitozyma podzolica*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Candida maltosa* foram as principais espécies detectadas por cultivo.

Nas amostras do Rio de Janeiro (Capítulo 2), as espécies *Cyberlindnera jadinii* e *Tremella fuciformis*, foram as mais abundantes. Essas não foram detectadas por meio de cultivo nessas amostras. Nas amostras de Minas Gerais (Capítulo 3), a abordagem por cultivo detectou a espécie *Candida maltosa* com maior frequência de ocorrência, enquanto que a espécie *Exophiala bonariae* foi a que apresentou maior abundância por meio do *Metabarcode*. Essa diferença na composição de espécie entre as abordagens utilizadas sugere que a abordagem baseada em cultivo pode favorecer o crescimento de determinadas espécies em detrimento de outras, devido as fontes nutricionais fornecidas no meio de cultivo.

Visto que a espécie *Exophiala bonariae* foi a espécie mais representativa, com o maior número de sequências, esse resultado indica que o meio de cultivo utilizado não foi o suficiente para recuperar eficientemente a maior parte dos táxons. O resultado

encontrado pode servir de guia em trabalhos futuros baseados em cultivo, auxiliando na escolha de meios de cultivo que vise a recuperação da maior parte dos táxons que possivelmente possam estar presentes nas amostras. Entretanto, a abordagem por *Metabarcoding* também possui vieses inerentes as várias etapas do processo, sugerimos que as duas abordagens se complementam, e sua aplicação em conjunto pode fornecer uma visão mais realista da diversidade de leveduras no ambiente.

Este é o primeiro trabalho a utilizar a abordagem de *Metabarcoding* no estudo da diversidade de leveduras em solos de clima tropical. Nós demonstramos a aplicabilidade da técnica e sua complementariedade a abordagens de cultivo para descrever as comunidades de leveduras nos solos. Além disso, demonstramos também o papel funcional de leveduras do solo, em atividades importantes como produção de hormônios vegetais e solubilização de fosfatos. Assim, esperamos que este documento possa agregar para o inventário global da diversidade de leveduras e servir de referência para trabalhos futuros.

## Referências

- Buzzini, P., Lachance, M.-A. & Yurkov, A.M., 2017. *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology*. P. Buzzini, M. Lachance, & A. Yurkov, eds., Switzerland: Springer International Publishing.
- Carvalho, F.P. et al., 2013. Yeasts diversity in Brazilian Cerrado soils: Study of the enzymatic activities. *African Journal of Microbiology Research*, 7(32), pp.4176–4190.
- Dunthorn, M. et al., 2017. Yeasts dominate soil fungal communities in three lowland Neotropical rainforests. *Environmental Microbiology Reports*, 9, pp.668–675.
- Gomes, N.C.M. et al., 2003. Dynamics of Fungal Communities in Bulk and Maize Rhizosphere Soil in the Tropics. *Applied and environmental microbiology*, 69(7), pp.3758–3766.
- Harantová, L. & Frouz, J., 2017. Development of microbial community during primary succession in areas degraded by mining activities. *Land Degradation and Development*, 28, pp.2574–2584.
- Prach, K., & Řehouňková, K., 2006. Vegetation succession over broad geographical scales: Which factors determine the patterns? *Preslia*, 78(4), 469–480.
- Replansky, T. et al., 2008. *Saccharomyces sensu stricto* as a model system for evolution and ecology. *Trends in ecology & evolution*, 23(9), pp.494–501.
- Sláviková, E. & Vadkertiová, R., 2003. The diversity of yeasts in the agricultural soil. *Journal of basic microbiology*, 43(5), pp.430–6.
- Sláviková, E. & Vadkertiová, R., 2000. The occurrence of yeasts in the forest soils. *Journal Basic Microniology*, 40, pp.207–212.
- Steensels, J. et al., 2014. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS microbiology reviews*, 38, pp.947–995.
- Vieira, C.K. et al., 2018. Microbiome of a revegetated iron-mining site and pristine ecosystems from the Brazilian Cerrado. *Applied Soil Ecology*, 131, pp.55–65.
- Vital, M. et al., 2002. Mycocinogenic yeasts isolated from amazon soils of the maracá ecological station, roraima-brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, pp.230–235.
- Vorísková, J. et al., 2014. Seasonal dynamics of fungal communities in a temperate oak forest soil. *New Phytologist*, 201, pp.269–278.
- Yurkov, A., 2017. Yeasts in Forest Soils. In P. Buzzini, ed. *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity*. Springer International Publishing, pp. 87–116.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Inventário de espécies de leveduras isoladas a partir de amostras de solos sob diferentes condições ambientais nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, Brasil.

Espécies	Isolado	ID Coleção	Fonte de isolamento	Cidade/Estado	GenBank match	Identidade (Bgen/Bmy)	Nº de acesso (GenBank)
<i>Schwanniomyces polymorphus</i>	CE13	CLUnB 508	Cerrado	Nova Lima/ MG	KY109623	524/524(100%)	MK110049
<i>Schwanniomyces polymorphus</i>	CE14	CLUnB 509	Cerrado	Nova Lima/ MG	KY109623	525/525(100%)	MK110050
<i>Debaryomyces</i> sp.	CE24	CLUnB 510	Cerrado	Nova Lima/ MG	NG055699/ HQ860275	524/524(100%)	MK110051
<i>Candida intermedia</i>	CE25	CLUnB 511	Cerrado	Nova Lima/ MG	MG815863	483/483(100%)	MK110052
<i>Candida intermedia</i>	CE26	CLUnB 512	Cerrado	Nova Lima/ MG	MG815863	485/485(100%)	MK110053
<i>Candida intermedia</i>	CE27	CLUnB 513	Cerrado	Nova Lima/ MG	MG815863	483/483(100%)	MK110054
<i>Saitozyma podzolica</i>	CE28	CLUnB 514	Cerrado	Nova Lima/ MG	KX903051	535/535(100%)	MK110055
<i>Kodamaea ohmeri</i>	CE72	CLUnB 515	Cerrado	Nova Lima/ MG	KY684049	464/464(100%)	MK110056
<i>Candida rugosa</i>	CE91	CLUnB 516	Cerrado	Nova Lima/ MG	HE716783	446/446(100%)	MK110057
<i>Candida rugosa</i>	CE92	CLUnB 517	Cerrado	Nova Lima/ MG	HE716783	447/447(100%)	MK110058
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CE101	CLUnB 518	Cerrado	Nova Lima/ MG	KY037816	546/546(100%)	MK110059
<i>Candida edaphicus</i>	CE93	CLUnB 519	Cerrado	Nova Lima/ MG	AB247371	537/539(99%)	MK110060
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CE83	CLUnB 520	Cerrado	Nova Lima/ MG	KY911362	529/529(100%)	MK110061
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CE33	CLUnB 521	Cerrado	Nova Lima/ MG	KY744132	530/530(100%)	MK110062
<i>Saitozyma podzolica</i>	CE53	CLUnB 522	Cerrado	Nova Lima/ MG	KX903044	564/564(100%)	MK110063
<i>Candida insectorum</i>	CR96	CLUnB 523	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	JN544058	480/481(99%)	MK110064
<i>Candida melibiosica</i>	CR813	CLUnB 524	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY106567	481/481(100%)	MK110065
<i>Candida melibiosica</i>	CR814	CLUnB 525	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY106567	482/482(100%)	MK110066

<i>Candida melibiosica</i>	CR812	CLUnB 526	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY106567	479/479(100%)	MK110067
<i>Candida melibiosica</i>	CR811	CLUnB 527	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY106567	483/483(100%)	MK110068
<i>Candida melibiosica</i>	CR810	CLUnB 528	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY106567	480/480(100%)	MK110069
<i>Candida melibiosica</i>	CR95	CLUnB 529	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY106567	482/482(100%)	MK110070
<i>Candida melibiosica</i>	CR94	CLUnB 530	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY106567	481/481(100%)	MK110071
<i>Candida melibiosica</i>	CR92	CLUnB 531	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY106567	484/484(100%)	MK110072
<i>Candida melibiosica</i>	CR89	CLUnB 532	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	NG055230	471/471(100%)	MK110073
<i>Candida melibiosica</i>	CR88	CLUnB 533	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	NG055230	467/467(100%)	MK110074
<i>Candida melibiosica</i>	CR87	CLUnB 534	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY106567	479/479(100%)	MK110075
<i>Candida melibiosica</i>	CR86	CLUnB 535	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY106567	479/479(100%)	MK110076
<i>Candida melibiosica</i>	CR84	CLUnB 536	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	NG055230	471/471(100%)	MK110077
<i>Candida melibiosica</i>	CR83	CLUnB 537	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY106567	478/478(100%)	MK110078
<i>Candida melibiosica</i>	CR82	CLUnB 538	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY106567	483/483(100%)	MK110079
<i>Candida melibiosica</i>	CR81	CLUnB 539	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	NG055230	471/471(100%)	MK110080
<i>Apiotrichum laibachii</i>	CR71	CLUnB 540	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	JQ672597	489/500(98%)	MK110081
<i>Apiotrichum loubieri</i>	CR65	CLUnB 541	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY106137	559/559(100%)	MK110082
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CR41	CLUnB 542	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY037816	554/554(100%)	MK110083
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CR66	CLUnB 543	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY037816	552/552(100%)	MK110084
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CR76	CLUnB 544	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY037816	557/557(100%)	MK110085
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CR816	CLUnB 545	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY037816	520/522(99%)	MK110086
<i>Candida</i> sp.	CR31	CLUnB 546	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	MG833304/ MF767668	524/524(100%)	MK110087
<i>Candida parapsilosis</i>	CR75	CLUnB 547	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	MG871743	525/526(99%)	MK110088
<i>Candida parapsilosis</i>	CR817	CLUnB 548	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	MG871743	525/525(100%)	MK110089
<i>Candida parapsilosis</i>	CR818	CLUnB 549	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	MG871743	504/506(99%)	MK110090
<i>Candida parapsilosis</i>	CR819	CLUnB 550	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	MG871743	527/527(100%)	MK110091
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CR11	CLUnB 551	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY952849	522/522(100%)	MK110092
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CR12	CLUnB 552	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY952849	521/521(100%)	MK110093

<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CR72	CLUnB 553	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY952849	515/515(100%)	MK110094
<i>Meyerozyma</i> sp.	CR74	CLUnB 554	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY952849	536/536(100%)	MK110095
<i>Schwanniomyces vanrijiae</i>	CR97	CLUnB 555	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	LN909492	519/519(100%)	MK110096
<i>Schwanniomyces</i> sp.	CR98	CLUnB 556	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	LN909492	514/517(99%)	MK110097
<i>Kodamaea ohmeri</i>	CR42	CLUnB 557	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY684049	461/461(100%)	MK110098
<i>Kodamaea ohmeri</i>	CR43	CLUnB 558	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY684049	467/467(100%)	MK110099
<i>Rhodotorula toruloides</i>	CR13	CLUnB 559	Campo Rupestre	Nova Lima/ MG	KY670833	530/530(100%)	MK110100
<i>Candida maltosa</i>	F63	CLUnB 560	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KJ159031	488/495(99%)	MK110101
<i>Candida maltosa</i>	F62	CLUnB 561	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KJ159031	509/509(100%)	MK110102
<i>Candida maltosa</i>	F58	CLUnB 563	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KJ159031	493/500(99%)	MK110104
<i>Candida maltosa</i>	F33	CLUnB 565	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KJ159031	490/490(100%)	MK110106
<i>Candida maltosa</i>	F32	CLUnB 566	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KY106552	485/490(99%)	MK110107
<i>Barnettozyma californica</i>	F88	CLUnB 568	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	MG707647	546/546(100%)	MK110109
<i>Barnettozyma californica</i>	F42	CLUnB 569	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	MG707647	547/547(100%)	MK110110
<i>Schwanniomyces vanrijiae</i>	F14	CLUnB 570	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	NG054865	525/525(100%)	MK110111
<i>Schwanniomyces vanrijiae</i>	F57	CLUnB 571	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	NG054865	507/507(100%)	MK110112
<i>Schwanniomyces polymorphus</i>	F96	CLUnB 572	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KY109623	525/525(100%)	MK110113
<i>Schwanniomyces polymorphus</i>	F97	CLUnB 573	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KY109623	527/527(100%)	MK110114
<i>Candida pseudolambica</i>	F51	CLUnB 574	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KY106707	504/504(100%)	MK110115
<i>Candida pseudolambica</i>	F54	CLUnB 575	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KY106707	501/501(100%)	MK110116
<i>Candida pseudolambica</i>	F55	CLUnB 576	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KY106707	507/508(99%)	MK110117
<i>Candida pseudolambica</i>	F56	CLUnB 577	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KY106707	488/489(99%)	MK110118
<i>Cutaneotrichosporon terricola</i>	F52	CLUnB 578	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	FJ527226	556/556(100%)	MK110119
<i>Saitozyma podzolica</i>	F87	CLUnB 579	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KX903051	524/524(100%)	MK110120
<i>Candida maltosa</i>	F615	CLUnB 580	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KJ159031	525/526(99%)	MK110121
<i>Candida maltosa</i>	F810	CLUnB 581	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KJ159031	522/523(99%)	MK110122
<i>Candida maltosa</i>	F613	CLUnB 582	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KJ159031	527/528(99%)	MK110123

<i>Candida maltosa</i>	F612	CLUnB 583	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KY106552	538/540(99%)	MK110124
<i>Candida maltosa</i>	F310	CLUnB 584	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KJ159031	523/523(100%)	MK110125
<i>Candida maltosa</i>	F89	CLUnB 585	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KJ159031	509/513(99%)	MK110126
<i>Candida maltosa</i>	F69	CLUnB 586	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KJ159031	528/528(100%)	MK110127
<i>Candida maltosa</i>	F68	CLUnB 587	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KJ159031	504/505(99%)	MK110128
<i>Candida maltosa</i>	F67	CLUnB 588	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KJ159031	518/519(99%)	MK110129
<i>Candida maltosa</i>	F66	CLUnB 589	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KJ159031	522/523(99%)	MK110130
<i>Candida maltosa</i>	F37	CLUnB 592	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KY106552	503/510(99%)	MK110133
<i>Candida maltosa</i>	F36	CLUnB 593	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KJ159031	523/523(100%)	MK110134
<i>Candida sanyaensis</i>	F117	CLUnB 595	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	NG054829	525/526(99%)	MK110136
<i>Candida neerlandica</i>	F29	CLUnB 596	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	NG054776	539/539(100%)	MK110137
<i>Candida edaphicus</i>	F510	CLUnB 598	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	EU523625	544/545(99%)	MK110139
<i>Candida</i> sp.	F115	CLUnB 599	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	MG833304	531/531(100%)	MK110140
<i>Candida</i> sp.	F116	CLUnB 600	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	MG833304	524/524(100%)	MK110141
<i>Candida parapsilosis</i>	F46	CLUnB 601	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KY037801	528/530(99%)	MK110142
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	F27	CLUnB 602	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KY952849	522/522(100%)	MK110143
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	F114	CLUnB 603	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KY952849	517/518(99%)	MK110144
<i>Barnettozyma californica</i>	F98	CLUnB 604	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	MG707647	543/543(100%)	MK110145
<i>Barnettozyma californica</i>	F611	CLUnB 605	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	MG707647	541/541(100%)	MK110146
<i>Barnettozyma californica</i>	F75	CLUnB 606	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	MG707647	541/541(100%)	MK110147
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	F111	CLUnB 607	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	MF769591	524/524(100%)	MK110148
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	F112	CLUnB 608	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	MG518207	524/524(100%)	MK110149
<i>Schwanniomyces vanriijiae</i>	F16	CLUnB 610	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	NG054865	507/512(99%)	MK110151
<i>Schwanniomyces vanriijiae</i>	F18	CLUnB 611	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	NG054865	525/525(100%)	MK110152
<i>Schwanniomyces vanriijiae</i>	F19	CLUnB 612	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	NG054865	526/526(100%)	MK110153
<i>Schwanniomyces vanriijiae</i>	F22	CLUnB 614	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	NG054865	511/514(99%)	MK110155
<i>Schwanniomyces vanriijiae</i>	F23	CLUnB 615	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	NG054865	499/499(100%)	MK110156
<i>Schwanniomyces vanriijiae</i>	F26	CLUnB 617	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	NG054865	501/504(99%)	MK110158

<i>Schwanniomyces vanriijiae</i>	F43	CLUnB 619	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	NG054865	493/497(99%)	MK110160
<i>Schwanniomyces vanriijiae</i>	F72	CLUnB 622	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	NG054865	517/517(100%)	MK110163
<i>Schwanniomyces vanriijiae</i>	F110	CLUnB 623	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	NG054865	515/516(99%)	MK110164
<i>Schwanniomyces vanriijiae</i>	F113	CLUnB 624	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	NG054865	507/507(100%)	MK110165
<i>Schwanniomyces vanriijiae</i>	F511	CLUnB 625	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	NG054865	512/512(100%)	MK110166
<i>Sugiyamaella xylolytica</i>	F71	CLUnB 626	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KF889433	525/525(100%)	MK110167
<i>Sugiyamaella xylolytica</i>	F73	CLUnB 627	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KF889433	527/527(100%)	MK110168
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	F25	CLUnB 628	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	MH010872	526/526(100%)	MK110169
<i>Saturnispora silvae</i>	F610	CLUnB 629	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	MG707692	508/508(100%)	MK110170
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	F76	CLUnB 630	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	MG833306	530/530(100%)	MK110171
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	F811	CLUnB 631	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	MG833306	522/522(100%)	MK110172
<i>Saitozyma podzolica</i>	F311	CLUnB 632	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KX903044	564/564(100%)	MK110173
<i>Saitozyma podzolica</i>	F312	CLUnB 633	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KX903044	556/556(100%)	MK110174
<i>Saitozyma podzolica</i>	F210	CLUnB 634	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KX903051	547/547(100%)	MK110175
<i>Saitozyma podzolica</i>	F65	CLUnB 635	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KX903044	543/543(100%)	MK110176
<i>Saitozyma podzolica</i>	F15	CLUnB 636	Mata Atlântica	Brumadinho/ MG	KX903044	559/561(99%)	MK110177
<i>Candida maltosa</i>	CA817	CLUnB 639	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	502/504(99%)	MK110180
<i>Candida maltosa</i>	CA813	CLUnB 640	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	527/530(99%)	MK110181
<i>Candida maltosa</i>	CA812	CLUnB 641	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	497/500(99%)	MK110182
<i>Candida maltosa</i>	CA710	CLUnB 642	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	483/490(99%)	MK110183
<i>Candida maltosa</i>	CA516	CLUnB 643	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	498/500(99%)	MK110184
<i>Candida maltosa</i>	CA511	CLUnB 644	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	483/488(99%)	MK110185
<i>Candida maltosa</i>	CA97	CLUnB 646	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	492/494(99%)	MK110187
<i>Candida maltosa</i>	CA96	CLUnB 647	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	480/480(100%)	MK110188
<i>Candida maltosa</i>	CA95	CLUnB 648	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	502/502(100%)	MK110189
<i>Candida maltosa</i>	CA79	CLUnB 649	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	497/501(99%)	MK110190
<i>Candida maltosa</i>	CA78	CLUnB 650	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	500/500(100%)	MK110191
<i>Candida maltosa</i>	CA76	CLUnB 651	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	527/531(99%)	MK110192

<i>Candida maltosa</i>	CA75	CLUnB 652	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	499/499(100%)	MK110193
<i>Candida maltosa</i>	CA74	CLUnB 653	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	498/501(99%)	MK110194
<i>Candida maltosa</i>	CA73	CLUnB 654	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	499/499(100%)	MK110195
<i>Candida maltosa</i>	CA72	CLUnB 655	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	500/500(100%)	MK110196
<i>Candida maltosa</i>	CA71	CLUnB 656	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	498/498(100%)	MK110197
<i>Candida maltosa</i>	CA69	CLUnB 657	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	483/490(99%)	MK110198
<i>Candida maltosa</i>	CA67	CLUnB 659	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	488/490(99%)	MK110200
<i>Candida maltosa</i>	CA65	CLUnB 660	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	484/490(99%)	MK110201
<i>Candida maltosa</i>	CA64	CLUnB 661	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	498/501(99%)	MK110202
<i>Candida maltosa</i>	CA63	CLUnB 662	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	497/500(99%)	MK110203
<i>Candida maltosa</i>	CA62	CLUnB 663	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	484/490(99%)	MK110204
<i>Candida maltosa</i>	CA58	CLUnB 665	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	498/500(99%)	MK110206
<i>Candida maltosa</i>	CA54	CLUnB 668	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	498/500(99%)	MK110209
<i>Candida maltosa</i>	CA53	CLUnB 669	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	498/500(99%)	MK110210
<i>Candida maltosa</i>	CA51	CLUnB 670	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	499/499(100%)	MK110211
<i>Candida maltosa</i>	CA45	CLUnB 671	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	489/490(99%)	MK110212
<i>Candida maltosa</i>	CA44	CLUnB 672	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	489/490(99%)	MK110213
<i>Candida maltosa</i>	CA43	CLUnB 673	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	479/480(99%)	MK110214
<i>Candida maltosa</i>	CA42	CLUnB 674	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	485/485(100%)	MK110215
<i>Candida maltosa</i>	CA38	CLUnB 676	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	499/500(99%)	MK110217
<i>Candida maltosa</i>	CA32	CLUnB 678	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	496/500(99%)	MK110219
<i>Candida maltosa</i>	CA27	CLUnB 680	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	496/500(99%)	MK110221
<i>Candida maltosa</i>	CA25	CLUnB 682	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	517/521(99%)	MK110223
<i>Candida maltosa</i>	CA24	CLUnB 683	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	468/475(99%)	MK110224
<i>Candida maltosa</i>	CA22	CLUnB 685	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	498/500(99%)	MK110226
<i>Candida maltosa</i>	CA21	CLUnB 686	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	474/478(99%)	MK110227
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CA87	CLUnB 688	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY952849	508/509(99%)	MK110229

<i>Meyerozyma</i> sp.	CA88	CLUnB 689	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY952854/ MG859666	498/499(99%)	MK110230
<i>Meyerozyma</i> sp.	CA811	CLUnB 690	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY952854/ MG859666	502/502(100%)	MK110231
<i>Meyerozyma</i> sp.	CA810	CLUnB 691	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	MF783055/ FM180531/ AY969108	502/502(100%)	MK110232
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	CA814	CLUnB 692	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	MF769591	501/501(100%)	MK110233
<i>Candida quercitrusa</i>	CA89	CLUnB 693	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY996729	519/519(100%)	MK110234
<i>Debaryomyces</i> sp.	CA82	CLUnB 694	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	NG055700/ KY000093	497/497(100%)	MK110235
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CA311	CLUnB 696	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KP990659	500/500(100%)	MK110237
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CA86	CLUnB 697	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KP990659	506/506(100%)	MK110238
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CA37	CLUnB 698	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KP990659	500/500(100%)	MK110239
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CA34	CLUnB 699	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KP990659	500/500(100%)	MK110240
<i>Lachancea kluyveri</i>	CA13	CLUnB 700	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY108237	501/501(100%)	MK110241
<i>Candida intermedia</i>	CA815	CLUnB 701	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KX609389	477/477(100%)	MK110242
<i>Pichia kudriavzevii</i>	CA101	CLUnB 702	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	MF769603	509/509(100%)	MK110243
<i>Pichia kudriavzevii</i>	CA85	CLUnB 703	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	MF769603	479/479(100%)	MK110244
<i>Pichia kudriavzevii</i>	CA84	CLUnB 704	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	MF769603	492/492(100%)	MK110245
<i>Cutaneotrichosporon terricola</i>	CA103	CLUnB 705	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KU167667	512/516(99%)	MK110246
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA83	CLUnB 706	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	JQ968487	471/471(100%)	MK110247
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA912	CLUnB 707	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	JQ968487	531/531(100%)	MK110248
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA15	CLUnB 708	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY037816	500/500(100%)	MK110249
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA16	CLUnB 709	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY037816	535/535(100%)	MK110250
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA33	CLUnB 710	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY037816	500/500(100%)	MK110251
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA35	CLUnB 711	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY037816	500/500(100%)	MK110252
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA52	CLUnB 712	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY037816	500/500(100%)	MK110253
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA59	CLUnB 714	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY037816	500/500(100%)	MK110255

<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA77	CLUnB 715	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY037816	500/500(100%)	MK110256
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA99	CLUnB 716	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY037816	541/541(100%)	MK110257
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA510	CLUnB 717	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY037816	500/500(100%)	MK110258
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA513	CLUnB 718	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY037816	500/500(100%)	MK110259
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA514	CLUnB 719	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY037816	499/500(99%)	MK110260
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA515	CLUnB 720	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY037816	500/500(100%)	MK110261
<i>Candida maltosa</i>	CA915	CLUnB 721	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	500/505(99%)	MK110262
<i>Candida maltosa</i>	CA825	CLUnB 724	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	538/540(99%)	MK110265
<i>Candida maltosa</i>	CA722	CLUnB 730	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	523/523(100%)	MK110271
<i>Candida maltosa</i>	CA720	CLUnB 732	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	505/506(99%)	MK110273
<i>Candida maltosa</i>	CA719	CLUnB 733	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	500/504(99%)	MK110274
<i>Candida maltosa</i>	CA612	CLUnB 739	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	527/528(99%)	MK110280
<i>Candida maltosa</i>	CA519	CLUnB 745	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	496/502(99%)	MK110286
<i>Candida maltosa</i>	CA518	CLUnB 746	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	505/510(99%)	MK110287
<i>Candida maltosa</i>	CA415	CLUnB 747	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	504/510(99%)	MK110288
<i>Candida maltosa</i>	CA413	CLUnB 748	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	498/504(99%)	MK110289
<i>Candida maltosa</i>	CA412	CLUnB 749	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	499/504(99%)	MK110290
<i>Candida maltosa</i>	CA410	CLUnB 751	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	511/514(99%)	MK110292
<i>Candida maltosa</i>	CA216	CLUnB 752	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	506/509(99%)	MK110293
<i>Candida maltosa</i>	CA213	CLUnB 754	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	515/517(99%)	MK110295
<i>Candida maltosa</i>	CA210	CLUnB 756	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	513/516(99%)	MK110297
<i>Candida maltosa</i>	CA117	CLUnB 757	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	500/507(99%)	MK110298
<i>Candida maltosa</i>	CA115	CLUnB 758	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	529/530(99%)	MK110299
<i>Candida maltosa</i>	CA114	CLUnB 759	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	517/519(99%)	MK110300
<i>Candida maltosa</i>	CA110	CLUnB 760	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	528/528(100%)	MK110301
<i>Candida maltosa</i>	CA109	CLUnB 761	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	522/522(100%)	MK110302
<i>Candida maltosa</i>	CA108	CLUnB 762	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KJ159031	517/518(99%)	MK110303
<i>Candida maltosa</i>	CA49	CLUnB 763	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY106552	507/512(99%)	MK110304

<i>Candida parapsilosis</i>	CA116	CLUnB 770	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	MG871743	524/524(100%)	MK110311
<i>Candida parapsilosis</i>	CA414	CLUnB 771	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	MG871743	531/531(100%)	MK110312
<i>Candida parapsilosis</i>	CA613	CLUnB 772	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	MG871743	532/532(100%)	MK110313
<i>Candida parapsilosis</i>	CA824	CLUnB 773	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	MG871743	508/508(100%)	MK110314
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CA47	CLUnB 774	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY952849	537/537(100%)	MK110315
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CA214	CLUnB 775	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY952849	529/529(100%)	MK110316
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CA320	CLUnB 776	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY952849	523/523(100%)	MK110317
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CA111	CLUnB 777	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY952849	532/532(100%)	MK110318
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CA113	CLUnB 778	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY952849	528/528(100%)	MK110319
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CA212	CLUnB 779	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY952849	528/528(100%)	MK110320
<i>Schwanniomyces vanriijae</i>	CA18	CLUnB 780	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	NG054865	522/522(100%)	MK110321
<i>Torulaspota sp.</i>	CA1012	CLUnB 781	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY109871/ KY109867	532/532(100%)	MK110322
<i>Torulaspota sp.</i>	CA1013	CLUnB 782	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY109871/ KY109867	531/531(100%)	MK110323
<i>Torulaspota sp.</i>	CA1010	CLUnB 783	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY109871/ KY109867	528/528(100%)	MK110324
<i>Candida glabrata</i>	CA323	CLUnB 784	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	MG859667	537/537(100%)	MK110325
<i>Saturnispora silvae</i>	CA523	CLUnB 785	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	NG055098	502/502(100%)	MK110326
<i>Pichia kudriavzevii</i>	CA318	CLUnB 786	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	MG859665	524/524(100%)	MK110327
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CA610	CLUnB 787	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KU893133	535/535(100%)	MK110328
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CA313	CLUnB 789	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	MG833306	529/529(100%)	MK110330
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CA46	CLUnB 790	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	MG833306	530/531(99%)	MK110331
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CA322	CLUnB 794	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY744132	526/526(100%)	MK110335
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CA324	CLUnB 795	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY744132	529/529(100%)	MK110336
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CA712	CLUnB 796	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY744132	530/530(100%)	MK110337
<i>Rhodotorula sp.</i>	CA529	CLUnB 797	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KU167662/ KJ756736	527/527(100%)	MK110338

<i>Rhodotorula</i> sp.	CA521	CLUnB 798	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KU167662/ KJ756736	518/519(99%)	MK110339
<i>Rhodotorula toruloides</i>	CA312	CLUnB 799	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KF971831	540/540(100%)	MK110340
<i>Rhodotorula toruloides</i>	CA321	CLUnB 800	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY109171	532/532(100%)	MK110341
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA315	CLUnB 801	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY670834	563/563(100%)	MK110342
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA522	CLUnB 802	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY037816	557/557(100%)	MK110343
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA524	CLUnB 803	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY670834	563/563(100%)	MK110344
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CA527	CLUnB 804	Capim (Área revegetada)	Brumadinho/ MG	KY037816	557/557(100%)	MK110345
<i>Saitozyma podzolica</i>	A112	CLUnB 805	Mata Atlântica (404 metros)	Teresópolis/ RJ	KX903051	552/553(99%)	MK626569
<i>Saitozyma podzolica</i>	A121	CLUnB 806	Mata Atlântica (404 metros)	Teresópolis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626570
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	A123	CLUnB 807	Mata Atlântica (404 metros)	Teresópolis/ RJ	KX791359	555/555(100%)	MK626571
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	A131	CLUnB 808	Mata Atlântica (404 metros)	Teresópolis/ RJ	KX791359	555/555(100%)	MK626572
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	A132	CLUnB 809	Mata Atlântica (404 metros)	Teresópolis/ RJ	KX791359	555/555(100%)	MK626573
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	A133	CLUnB 810	Mata Atlântica (404 metros)	Teresópolis/ RJ	KX791359	555/555(100%)	MK626574
<i>Saitozyma podzolica</i>	A134	CLUnB 811	Mata Atlântica (404 metros)	Teresópolis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626575
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	A135	CLUnB 812	Mata Atlântica (404 metros)	Teresópolis/ RJ	KX791359	555/555(100%)	MK626576
<i>Saitozyma podzolica</i>	A136	CLUnB 813	Mata Atlântica (404 metros)	Teresópolis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626577
<i>Saitozyma podzolica</i>	A137	CLUnB 814	Mata Atlântica (404 metros)	Teresópolis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626578
<i>Saitozyma podzolica</i>	A141	CLUnB 815	Mata Atlântica (404 metros)	Teresópolis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626579
<i>Saitozyma podzolica</i>	A142	CLUnB 816	Mata Atlântica (404 metros)	Teresópolis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626580
<i>Saitozyma podzolica</i>	A145	CLUnB 817	Mata Atlântica (404 metros)	Teresópolis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626581
<i>Saitozyma podzolica</i>	A146	CLUnB 818	Mata Atlântica (404 metros)	Teresópolis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626582
<i>Candida natalensis</i>	A211	CLUnB 819	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresópolis/ RJ	KJ794716	547/555(99%)	MK626583
<i>Saitozyma podzolica</i>	A214	CLUnB 820	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresópolis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626584
<i>Saitozyma podzolica</i>	A215	CLUnB 821	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresópolis/ RJ	KY826435	525/525(100%)	MK626585
<i>Saitozyma podzolica</i>	A216	CLUnB 822	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresópolis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626586
<i>Saitozyma podzolica</i>	A217	CLUnB 823	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresópolis/ RJ	KX903051	552/553(99%)	MK626587
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	A2110	CLUnB 824	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresópolis/ RJ	KX791359	555/555(100%)	MK626588

<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	A2111	CLUnB 825	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresopólis/ RJ	KX791359	555/555(100%)	MK626589
<i>Saitozyma podzolica</i>	A2112	CLUnB 826	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresopólis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626590
<i>Saitozyma podzolica</i>	A221	CLUnB 827	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresopólis/ RJ	KX902996	576/578(99%)	MK626591
<i>Saitozyma podzolica</i>	A223	CLUnB 828	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresopólis/ RJ	MH636074	548/549(99%)	MK626592
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	A224	CLUnB 829	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresopólis/ RJ	KX791359	555/555(100%)	MK626593
<i>Apiotrichum</i> sp.	A232	CLUnB 830	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresopólis/ RJ	EF653947	567/569(99%)	MK626594
<i>Saitozyma podzolica</i>	A233	CLUnB 831	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresopólis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626595
<i>Saitozyma podzolica</i>	A234	CLUnB 832	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresopólis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626596
<i>Saitozyma podzolica</i>	A235	CLUnB 833	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresopólis/ RJ	MH636074	546/547(99%)	MK626597
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	A236	CLUnB 834	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresopólis/ RJ	KX791359	555/555(100%)	MK626598
<i>Saitozyma podzolica</i>	A237	CLUnB 835	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresopólis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626599
<i>Saitozyma podzolica</i>	A241	CLUnB 836	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresopólis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626600
<i>Saitozyma podzolica</i>	A242	CLUnB 837	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresopólis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626601
<i>Saitozyma podzolica</i>	A243	CLUnB 838	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresopólis/ RJ	KX903051	559/560(99%)	MK626602
<i>Saitozyma podzolica</i>	A244	CLUnB 839	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresopólis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626603
<i>Saitozyma podzolica</i>	A245	CLUnB 840	Mata Atlântica (1016 metros)	Teresopólis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626604
<i>Saitozyma podzolica</i>	A311	CLUnB 841	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KX902996	577/578(99%)	MK626605
<i>Saitozyma podzolica</i>	A313	CLUnB 842	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	577/577(100%)	MK626606
<i>Saitozyma podzolica</i>	A314	CLUnB 843	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	577/577(100%)	MK626607
<i>Saitozyma podzolica</i>	A321	CLUnB 844	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	577/577(100%)	MK626608
<i>Saitozyma podzolica</i>	A322	CLUnB 845	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	577/577(100%)	MK626609
<i>Saitozyma podzolica</i>	A323	CLUnB 846	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	577/577(100%)	MK626610
<i>Saitozyma podzolica</i>	A324	CLUnB 847	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	577/577(100%)	MK626611
<i>Saitozyma podzolica</i>	A325	CLUnB 848	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	577/577(100%)	MK626612
<i>Saitozyma podzolica</i>	A327	CLUnB 849	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	554/554(100%)	MK626613
<i>Saitozyma podzolica</i>	A328	CLUnB 850	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	577/577(100%)	MK626614
<i>Saitozyma podzolica</i>	A329	CLUnB 851	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	556/556(100%)	MK626615
<i>Saitozyma podzolica</i>	A331	CLUnB 852	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	577/577(100%)	MK626616

<i>Saitozyma podzolica</i>	A332	CLUnB 853	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	577/577(100%)	MK626617
<i>Apiotrichum porosum</i>	A333	CLUnB 854	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KU167688	552/552(100%)	MK626618
<i>Saitozyma podzolica</i>	A334	CLUnB 855	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	577/577(100%)	MK626619
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	A341	CLUnB 856	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KX791359	555/555(100%)	MK626620
<i>Saitozyma podzolica</i>	A342	CLUnB 857	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	577/577(100%)	MK626621
<i>Leucosporidium scottii</i>	A343	CLUnB 858	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	MG707716	574/576(99%)	MK626622
<i>Saitozyma podzolica</i>	A344	CLUnB 859	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	577/577(100%)	MK626623
<i>Saitozyma podzolica</i>	A345	CLUnB 860	Mata Atlântica (1658 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	577/577(100%)	MK626624
<i>Apiotrichum porosum</i>	A412	CLUnB 861	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	KU167688	582/582(100%)	MK626625
<i>Saitozyma podzolica</i>	A413	CLUnB 862	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	577/577(100%)	MK626626
<i>Apiotrichum porosum</i>	A414	CLUnB 863	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	KU167688	582/582(100%)	MK626627
<i>Apiotrichum porosum</i>	A415	CLUnB 864	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	KU167688	582/582(100%)	MK626628
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	A416	CLUnB 865	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	KX791359	555/555(100%)	MK626629
<i>Saitozyma podzolica</i>	A421	CLUnB 866	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	577/577(100%)	MK626630
<i>Apiotrichum porosum</i>	A422	CLUnB 867	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	KU167688	582/582(100%)	MK626631
<i>Saitozyma podzolica</i>	A423	CLUnB 868	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	577/577(100%)	MK626632
<i>Apiotrichum porosum</i>	A426	CLUnB 869	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	KU167688	582/582(100%)	MK626633
<i>Apiotrichum porosum</i>	A427	CLUnB 870	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	KU167688	582/582(100%)	MK626634
<i>Apiotrichum porosum</i>	A428	CLUnB 871	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	KU167688	582/582(100%)	MK626635
<i>Apiotrichum porosum</i>	A429	CLUnB 872	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	KU167688	582/582(100%)	MK626636
<i>Saitozyma podzolica</i>	A4210	CLUnB 873	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	KC494728	576/577(99%)	MK626637
<i>Apiotrichum porosum</i>	A4211	CLUnB 874	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	KU167688	582/582(100%)	MK626638
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	A441	CLUnB 875	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	MF448332	580/583(99%)	MK626639
<i>Apiotrichum porosum</i>	A442	CLUnB 876	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	KU167688	582/582(100%)	MK626640
<i>Leucosporidium golubevii</i>	A443	CLUnB 877	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	KY108283	574/578(99%)	MK626641
<i>Nadsonia starkeyi-henricii</i>	A444	CLUnB 878	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	KY109593	555/558(99%)	MK626642
<i>Holtermanniella wattica</i>	A445	CLUnB 879	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	FJ748667	582/587(99%)	MK626643
<i>Nadsonia starkeyi-henricii</i>	A446	CLUnB 880	Mata Atlântica (2124 metros)	Teresopólis/ RJ	KY109593	555/558(99%)	MK626644

