



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

DIOGO XAVIER LIMA

**ASPECTOS ECOLÓGICOS E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE
MUCORALES DE SOLOS DE MATA ATLÂNTICA DO LITORAL DE
PERNAMBUCO, BRASIL**

Recife

2018

DIOGO XAVIER LIMA

**ASPECTOS ECOLÓGICOS E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE
MUCORALES DE SOLOS DE MATA ATLÂNTICA DO LITORAL DE
PERNAMBUCO, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Área de concentração: Taxonomia e Ecologia

Orientador: Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta

Co-orientador: Prof. Dr. André Luiz C. M. de A. Santiago

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Lima, Diogo Xavier

Aspectos ecológicos e caracterização enzimática de mucorales de solos de mata atlântica do litoral de Pernambuco, Brasil / Diogo Xavier Lima. – 2018.

116 f. : il.

Orientadora: Cristina Maria de Souza Motta.

Coorientador: André Luiz C. M. de A. Santiago.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Fungos. 2. Biologia – Classificação. 3. Ecologia. I. Motta, Cristina Maria de Souza (Orientadora). II. Santiago, André Luiz C. M. de A. (coorientador). III. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 140

DIOGO XAVIER LIMA

**ASPECTOS ECOLÓGICOS E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE
MUCORALES DE SOLOS DE MATA ATLÂNTICA DO LITORAL DE
PERNAMBUCO, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Aprovado em: 01/03/2018.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cristina Maria de Souza-Motta (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Micologia

Dra. Neiva Tinti de Oliveira (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Micologia

Dr. Alexandre Reis Machado (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Micologia

Dr. Roger Melo (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Micologia

Dra. Lidiane Roberta Cruz da Silva (Examinador Externo)

Universidade Federal Rural de Pernambuco - Centro de Ciências Biológicas

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Maria Risalva Xavier, às minhas tias, Arabela e Josefa, ao meu tio Armando e ao meu irmão, Filipe Augusto, que investiram na minha formação para que eu pudesse concluir todos meus objetivos.

A minha amada e parceira Iolanda Pereira, por todo amor e companheirismo durante o último ano desse projeto. Obrigado por todo suporte, sem você teria sido difícil conseguir.

A minha orientadora, Prof^a. Dra. Cristina Maria de Souza Motta, pela oportunidade e confiança durante todo o período de trabalho, desde o mestrado ao doutorado.

Ao amigo e co-orientador Prof. Dr. André Luiz Cabral Monteiro de Azevedo Santiago, pela atenção, paciência e aprendizado na taxonomia dos Mucorales. Serei eternamente grato.

À colaboradora e amiga Dra. Lidiane Roberta Cruz da Silva, pela ajuda no desenvolvimento do projeto na parte enzimática, pela amizade e pelos conselhos.

À Prof. Dra. Kerstin Voigt, pela colaboração no projeto e pela excelente recepção em Jena, Alemanha, para realização do doutorado sanduíche.

À Dra. Grit Walther, pelo aprendizado e suporte na filogenia de Mucorales.

Aos amigos e companheiros de equipe: Carlos, pela edição de imagens e pranchas, Rafeal, pelo suporte nas árvores filogenéticas e à Catarina, Thalline e Ana, pela amizade e nas atividades de laboratório.

À amiga Lilia Dark, pela amizade e suporte principalmente na revisão do projeto.

À equipe da Micoteca-URM: Eliane, Luan, Marília e Susana, por todo suporte e auxílio.

Aos amigos do Laboratório 1 e do Departamento de Micologia da UFPE: Pamela, Rejane, Sergio, Jadson, Thaís e Camila, por todos os momentos de descontração e felicidades compartilhados.

Ao amigo Mohamed, por ter me recebido gentilmente e dado todo suporte durante a minha estadia em Jena, Alemanha.

Aos amigos adquiridos durante o doutorado sanduíche em Jena: André (Dédé), Caio, Carlinhos, Cássio, Daniel, Fernando, Gustavo, Júlio, Rebeca, Pedro (Limão), Mardem, Matheus e Túlio.

A todos os que me ajudaram no experimento enzimático, Juliana, Joenny, Henrique e Matheus, obrigado pelo suporte.

À coordenação e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos pelo apoio e ensinamentos, em especial ao amigo e Prof. Dr. Gladstone Silva, pelos conselhos nas análises filogenéticas de algumas espécies.

Ao ICMBIO, pela autorização e livre acesso às áreas de coleta na Reserva Ecológica de Dois Irmãos, Reserva ecológica de Saltinho e Área de Proteção Ambiental de Guardalupe.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Pernambuco, por todo suporte e por ser a fonte do meu aprendizado.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização dessa tese.

RESUMO

O domínio Mata Atlântica é conhecido pela ampla biodiversidade e por apresentar um elevado número de espécies endêmicas dos mais variados grupos taxonômicos, incluindo os micro-organismos. Dentre os fungos presentes em solos de Mata Atlântica, destacam-se os da ordem Mucorales, que apresentam características fisiológicas e propriedades bioquímicas peculiares que os tornam interessantes para produção de enzimas. A tanase é uma enzima extracelular induzível, produzida na presença de ácido tânico, utilizada na fabricação de bebidas, cosméticos e medicamentos, podendo ser produzida industrialmente através da fermentação em estado sólido. O uso de resíduos de manga pode ser uma alternativa viável para a produção de tanase através de fermentação em estado sólido, utilizando Mucorales. Os objetivos deste estudo foram avaliar o comportamento ecológico das comunidades de Mucorales em diferentes ecossistemas da Mata Atlântica e caracterizar os espécimes dessa ordem quanto à capacidade da produção de tanase. Foram realizadas sete coletas de solo em quatro áreas naturais: floresta ombrófila, tabuleiro, restinga e manguezal, no município de Tamandaré, e em uma floresta ombrófila no Recife. Foram isolados 23 táxons de Mucorales presentes nos ecossistemas da Mata Atlântica, distribuídos entre os gêneros *Absidia*, *Backusella*, *Cunninghamella*, *Gongronella*, *Lichtheimia*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Syncephalastrum*. Onze novos registros estão sendo reportados para esse domínio, incluindo três novas espécies e uma primeira ocorrência para América do Sul. A riqueza e diversidade das espécies de Mucorales variaram entre os solos dos ecossistemas inventariados, sendo maiores nos solos da floresta ombrófila e o tabuleiro. Todas as linhagens testadas foram capazes de produzir tanase, sendo *Absidia pseudocylindrospora* a mais eficiente na produção dessa enzima.

Palavras-chave: Mucoromycotina. Taxonomia. Ecologia. Tanase.

ABSTRACT

The Atlantic Rainforest is known for broad biodiversity and endemic species of several taxonomic groups, included microorganism. Among the fungi found in the Atlantic Rainforest soil, are those of the order Mucorales. The physiological and biochemical properties make these fungi interesting for the production of enzymes, including tannase. It is an inducible extracellular enzyme, produced in the presence of tannic acid, used in the manufacture of beverages, cosmetics and medicines, and can be produced industrially through solid state fermentation. Mango waste may be a viable alternative to produce tannase through SSF using Mucorales. This study aimed evaluate the ecological indices of Mucorales communities in different ecosystems of the Atlantic Rainforest and characterize these species by production capability of tannase. Seven samplings were performed at five natural areas: rain forest, tabuleiro forest, salt marsh and mangrove, in the municipality of Tamandaré and Recife. 23 Mucorales taxa were reported at The Atlantic Rainforest ecosystems, distributed between genera: *Absidia*, *Backusella*, *Cunninghamella*, *Gongronella*, *Lichtheimia*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Syncephalastrum*. Eight new records are being reported for this domain. Of these taxa, three are new species for science and a first report for South America. Diversity and richness of soil Mucorales varied among ecosystems. Rainforest and tabuleiro showed a huge diversity and richness. All strains tested were tannase producers, and the isolate of *Absidia pseudocylindrospora* was the best producer of the enzyme.

Keywords: Mucoromycotina. Taxonomy. Ecology. Tannase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto da floresta ombrófila densa na Reserva Ecológica Dois Irmãos, Recife-PE.	35
Figura 2 - Aspecto da floresta ombrófila densa na Reserva Biológica de Saltinho, Tamandaré-PE.	36
Figura 3 - Aspecto do tabuleiro na Reserva Ecológica Dois Irmãos, Recife-PE.	36
Figura 4 - Aspecto da restinga na APA de Guardalupe, Tamandaré-PE.....	37
Figura 5 - Aspecto do manguezal na na APA de Guardalupe, Tamandaré-PE.....	37
Figura 6 - Estimadores de riqueza Chao 1 e Jacknife 1 de Mucorales na floresta ombrófila densa da Reserva Biológica de Saltinho.....	49
Figura 7 - Estimadores de riqueza Chao 1 e Jacknife 1 de Mucorales no tabuleiro da Reserva Biológica de Saltinho.	49
Figura 8 - Estimadores de riqueza Chao 1 e Jacknife 1 de Mucorales na restinga da Reserva Biológica de Saltinho.	49
Figura 9 - Estimadores de riqueza Chao 1 e Jacknife 1 de Mucorales no mangue da Reserva Biológica de Saltinho.	50
Figura 10 - Dendograma de Similaridade de Bray-Curtis entre as áreas de floresta ombrófila densa (FOD), tabuleiro (TAB), restinga (RES) e mangue (MAN) da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe.....	51
Figura 11 - Dendograma de proximidade entre as espécies de Mucorales dos ecossistemas da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe. Análise estatística baseada no índice Bray-Curtis; Método de ligação ponderal proporcional (WPGM: Método de Grupo Ponderado-bGroup; Média Aritmética). Análise coperetica: Rf = 0,8. Asp: <i>Absidia</i> sp; Csimpl: <i>C.simplex</i> (<i>M.circinatus</i>); Mluteu: <i>M. luteus</i> ; Celega: <i>C.elegans</i> ; Mindic: <i>M. indicus</i> ; Rmicro: <i>R. microsporus</i> ; Cblas: <i>C. blaskeneana</i> ; Lramos: <i>L. ramosa</i> ; Cbert: <i>C. bertholletiae</i> ; Cechi: <i>C. echinulata</i> ; Lbrasi: <i>L. brasiliensis</i> ; Acylin: <i>A. cylindrospora</i> ; Cphaeo: <i>C. phaeospora</i> ; Bcons: <i>B. constricta</i> ; Mhiema: <i>M. hiemalis</i> ; Mirreg: <i>M. irregularis</i> ; Rarrhi: <i>R. arrhizus</i> ; Rstolo: <i>R. stolonifer</i> ; Gbrasi: <i>G. brasiliensis</i> ; Sracem: <i>S. racemosum</i> ; Gbutle: <i>G.</i>	

butleri; Apseu: *A. pseudocylindrospora*; Mcirci: *M. circinelloides* f. *lusitanicus*.52

Figura 12 - Projeção bidimensional da Análise de Componentes Principais de amostras do solo de áreas dos ecossistemas da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe. .53

Figura 13 - *Absidia cylindrospora* var. *cylindrospora*: A. esporangióforo simples com columela e projeção apical; A1. esporangiosporos. *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*: B. esporangióforo simples com esporângio; B1 - esporangiosporos. *Cunninghamella phaeospora*: C. esporangióforo simples com esporangiolo; C1. esporangiolo. *Gongronella butleri*: D. esporangióforo simples com esporângio apofisado; D1. esporangiosporos. *Circinella simplex*: E. esporangióforo circinado com esporângio; E1. esporangiosporos. *Mucor hiemalis*: F. esporangióforo simples com columela; F1. esporangiosporos. *Rhizopus microsporus*: G. esporangióforo simples com columela e rizóides; G1. esporangiosporos. *Syncephalastrum racemosum*: H. merosporangióforo simples com merosporângio; H1 - merosporangiosporos. *Backusella constricta*: I. esporangióforo simples com columela apresentando uma constricção central; I1. Esporangiosporos55

Figura 14 - Estimador de riqueza Chao 1 da área de Mata Atlântica do Parque Horto dos Dois Irmãos.56

Figura 15 - *Absidia* sp nov. (holótipo URM 7219). A. esporangióforo ramificado; B,C. esporangióforo simples exibindo uma projeção na columela; D. esporangióforo simples com duas projeções na columela; E. esporangióforo simples sem projeção; F. esporangióforo simples em estolão; G. esporangiósporos cilíndricos e cuneiformes.58

Figura 16 - Árvore filogenética da família Cunninghamellaceae gerada a partir de seqüências da região LSU do rDNA. Valores de suporte são de análise bayesiana. Os isolados utilizados estão em negrito. *Mortierella parvispora* foi utilizado como outgroup.59

Figura 17 - *Backusella constricta* (URM 7323) A. Aspecto da colônia; B, C. esporângio com esporangiósporo; D, E, F. esporangióforos com columela; G. esporangiolo multi-esporado; H: esporangiolo uni-esporado; I. Esporangiosporos.62

Figura 18 - Árvore filogenética de Backusellaceae construída utilizando seqüências da região ITS do rDNA. *Rhizopus microsporus* foi utilizado como grupo externo. Seqüências são rotuladas com os seus números de acesso no Genbank. Valores de suporte são das análises de interferência Bayesiana e verossemelhança (valores acima e abaixo dos ramos, respectivamente). As seqüências obtidas neste estudo são indicadas em negrito. Seqüências

derivadas a partir de linhagens ex tipo são indicados por ^T.....63

Figura 19 - Árvore filogenética de Backusellaceae construída utilizando sequências da região LSU rDNA. *Mortierella longicollis*, *Rhizopus microsporus*, *Mucor indicus*, *Pilobolus umbonatus* e *Actinomucor elegans* foram utilizados como grupo externo. Sequências são rotuladas com os respectivos números de acesso no Genbank. Valores de suporte são das análises de interferência Bayesiana e verossemelhança (valores acima e abaixo dos ramos, respectivamente). As sequências obtidas neste estudo são indicadas em negrito. Sequências derivadas a partir de linhagens ex tipo são indicados por ^T.....64

Figura 20 - Árvore filogenética de Backusellaceae construída utilizando sequências das regiões ITS e (LSU) do rDNA. *Rhizopus microsporus* e *Mucor indicus* foram utilizados como grupo externo. Sequências são rotuladas com os respectivos números de acesso no Genbank. Valores de suporte são das análises de interferência Bayesiana e máxima verossemelhança (valores acima e abaixo dos ramos, respectivamente). As sequências obtidas neste estudo são indicadas em negrito. Sequências derivadas a partir de linhagens ex tipo são indicados por ^T.....65

Figura 21 - *Mucor circinatus* (URM 7218). A – G. esporangióforos circinados; H. esporangiosporos angulares; I. Filamentos semelhantes à rizóides. Escala: a – g, i = 50 µm, h = 10 µm.68

Figura 22 - Árvores filogenéticas de espécies de Mucorales baseadas em três diferentes marcadores. A. árvore baseada na região D1/D2 do LSU. B. árvore baseada na região ITS. C. árvore baseada no gene MCM7. Ramos com valores de bootstrap de 75 % ou maior são destacados em negrito. Culturas ex-tipo são designadas por: T = ex-tipo, ET = ex-epitipo, IT = ex-isotipo strain, NT = ex-neotipo, PT = ex-paratipo, ST = ex-sintipo, e AUT = material autêntico.69

Figura 23 - *Mucor irregularis* (URM 7723). A. Aspecto da colônia; B. esporangióforo com ramificação simples; C. esporangióforo com a esporângio; D. columela globosa; E. columela cônica; F. columela elipsoidal para cilíndrica; G. clamidósporos; H. esporangiosporos.....72

Figura 24 - Árvore filogenética de *Mucor irregularis* e espécies relacionadas baseada em sequências da região ITS. *Mucor gigasporus* foi usado como outgroup. As sequências estão com seus números de acesso do banco de dados do genbank. Valores de suporte são de inferência Bayesiana e máxima verossimilhança. As sequências

obtidas nesse trabalho estão em negrito.73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Análise de fatores abióticos de amostras de solo de áreas de floresta ombrófila densa, tabuleiro, restinga e mangue do solo da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe.....	40
Tabela 2 - Número de unidades formadora de colônia por grama de solo (UFC.g ⁻¹) de Mucorales nas áreas de floresta ombrófila densa, tabuleiro, restinga e mangue do solo da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe.....	44
Tabela 3 - Frequência de ocorrência (Fi,%) e abundância relativa (AR, %) de Mucorales nas áreas de floresta ombrófila densa (FOD), tabuleiro (TAB), restinga (RES) e mangue (MAN) do solo da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe.	46
Tabela 4 - Riqueza (S), índice de diversidade de Shannon Wiener (H'), equitabilidade de Pielou's e índice de Margalef das comunidades de Mucorales em áreas de floresta ombrófila densa (FOD), tabuleiro (TAB), restinga (RES) e mangue (MAN) da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe, PE.	48
Tabela 5 - Riqueza observada (Sobs) e riqueza estimada pelos estimadores Chao 1 e Jackknife 1 das comunidades de Mucorales em áreas de floresta ombrófila densa (FOD), tabuleiro (TAB), restinga (RES) e mangue (MAN) da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe.....	48
Tabela 6 - Análise de similaridade de Bray-Curtis da composição de Mucorales entre as áreas de floresta ombrófila densa (FOD), tabuleiro (TAB), restinga (RES) e mangue (MAN) da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe.....	50
Tabela 7- Análise de variância entre as comunidades de Mucorales entre as áreas de floresta ombrófila densa (FOD), tabuleiro (TAB), restinga (RES) e mangue (MAN) da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe. ANOVA: F(3, 24) = 103.6; p > 0.001 Tukey.	51
Tabela 8 - Número de unidades formadora de colônia por grama de solo (UFC.g ⁻¹), frequência de ocorrência (Fi %) e abundância relativa (AR %) de Mucorales nas amostras de solo da Reserva Ecológica Dois Irmãos.	54

Tabela 9 - Atividade de tanase com extrato enzimático bruto de espécimes de Mucorales isolados de solo de Mata Atlântica utilizando resíduo de manga (<i>Mangifera indica</i> L.).....	74
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1.	OBJETIVOS.....	19
1.1.2.	Objetivo geral.....	19
1.1.3.	Objetivos específicos.....	19
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1.	MUCOROMYCOTA DOWELD.....	20
2.2.	MUCOROMYCOTINA BENNY	20
2.3.	MUCORALES SCHRÖTER.....	21
2.4.	DOMÍNIO MATA ATLÂNTICA.....	24
2.5.	MUCORALES EM SOLO DE MATA ATLÂNTICA E DE ECOSISTEMAS ASSOCIADOS	26
2.6.	ENZIMAS E MUCORALES	28
2.7.	TANASE	30
2.8.	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)	31
2.9.	MANGA (<i>MANGIFERA INDICA</i> L.)	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1.	ÁREAS DE ESTUDO	34
3.2.	COLETAS DOS SOLOS	38
3.3.	ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS MUCORALES	38
3.5.	FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DOS MUCORALES	39
3.6.	ABUNDÂNCIA RELATIVA MUCORALES	39
3.7.	INDÍCES ECOLÓGICOS	39
3.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
3.9.	PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DO SOLO	40
3.10.	EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO ..	42

3.11. SELEÇÃO DE CULTURAS DE MUCOROMYCOTINA PRODUTORAS DE TANASE POR FES.....	42
3.12. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA TANASE	43
4 RESULTADOS	44
4.1. MUCORALES ISOLADOS DE SOLO DA RESERVA BIOLÓGICA DE SALTINHO E DA ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DE GUARDALUPE	44
4.2. MUCORALES ISOLADOS DE SOLO DA RESERVA ECOLÓGICA DOIS IRMÃOS.....	53
4.3. TAXONOMIA	56
4.3.1. <i>Absidia</i> sp. nov.	56
4.3.2. <i>Backusella constricta</i> sp. nov.	60
4.3.3. <i>Mucor circinatus</i> sp. nov.	66
4.3.4. <i>Mucor irregularis</i>	70
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ESPÉCIMES DE MUCORALES QUANTO À CAPACIDADE DE PRODUZIR TANASE	74
5 DISCUSSÃO	76
5.1 ECOLOGIA DE COMUNIDADES DE MUCORALES EM DIFERENTES ECOSSISTEMAS NATURAIS DA MATA ATLÂNTICA DE PERNAMBUCO.....	76
5.2 DIVERSIDADE DE MUCORALES EM UMA ÁREA FRAGMENTADA DA MATA ATLÂNTICA DA RESERVA ECOLÓGICA DOIS IRMÃOS	79
5.3 DESCRIÇÃO DE <i>ABSIDIA</i> SP. NOV. PRESENTE NO SOLO DA MATA ATLÂNTICA DE PERNAMBUCO, BRASIL.....	81
5.4 DESCRIÇÃO DE <i>BACKUSELLA CONSTRICTA</i> SP. NOV. PRESENTE NO SOLO DA MATA ATLÂNTICA DE PERNAMBUCO, BRASIL	82
5.5 UMA NOVA INTERPRETAÇÃO DE <i>CIRCINELLA SIMPLEX</i> COM BASE EM ANÁLISES FILOGENÉTICA E MORFOLÓGICA RESULTOU NA DESCRIÇÃO DE <i>MUCOR CIRCINATUS</i> SP. NOV.	83
5.6 PRIMEIRO REGISTRO DE <i>MUCOR IRREGULARIS</i> NA AMÉRICA DO SUL	85
5.7 PRODUÇÃO DE TANASE POR ESPÉCIES DE MUCORALES UTILIZANDO RESÍDUO DE MANGA ATRAVÉS DE FES.....	87

6 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS.....	91
ANEXO A - ARTICLE PHYTOTAXA.....	115
ANEXO B - ARTICLE PHYTOTAXA	116

1 INTRODUÇÃO

O domínio Mata Atlântica é conhecido pela ampla biodiversidade e por apresentar um elevado número de espécies endêmicas de grupos taxonômicos variados (MYERS et al., 2000), incluindo os fungos. A Mata Atlântica está presente em áreas de planaltos, serras e áreas costeiras em todo litoral brasileiro, englobando conjuntos de ecossistemas que variam de acordo com o aspecto florístico, climático e geográfico (OLIVEIRA-FILHO & FONTES, 2000). A área desse domínio ocupa 13% do território nacional, abrangendo 17 estados brasileiros, mesmo que apresente apenas 8% da sua área original (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2008). A perda alarmante de 92% de seu território total forneceu à Mata Atlântica o status de “Hotspot” e colocou áreas desse domínio na lista prioritária para a conservação da biodiversidade global (GALINDO-LEAL & CÂMARA, 2003). Apenas 2% da superfície original das áreas de Mata Atlântica estão protegidas legalmente em unidades de conservação dos tipos Reserva Biológica e Áreas de Proteção Ambiental (CÂMARA, 1996). Trata-se de um domínio ameaçado, sobretudo devido ao contínuo desmatamento, que ocasiona a perda de diversidade e o desaparecimento de espécies de fungos, muitas ainda desconhecidas para a ciência (REIS et al., 1992).

A comunidade fúngica no solo desempenha um papel importante nos processos ecológicos globais, já que vários espécimes desses organismos são decompositores da matéria orgânica (MUMMEY et al., 2010). Os fungos que habitam o solo estão entre os micro-organismos mais abundantes em termos de biomassa, e estima-se que 7000 espécies de fungos sejam típicas desse substrato (BRIDGE & SPOONER, 2001). As estimativas do número dos fungos existentes são baseadas na riqueza de plantas vasculares (HAWKSWORTH, 2001; BLACKWELL, 2011) e, considerando a grande diversidade e endemismo das plantas na Mata Atlântica, é possível estimar que o conhecimento da estrutura e diversidade da comunidade desses micro-organismos nos solos da Mata Atlântica ainda são insuficientes.

Dentre os fungos presentes em solos de Mata Atlântica, destacam-se os da ordem Mucorales Schröter., filo Mucoromycota Doweld (BILLS et al., 2004), que desempenham grande importância ambiental, sendo pioneiros na colonização de vários substratos e iniciando o processo de sucessão ecológica (RICHARDSON, 2009). Como decompositores primários da matéria orgânica no solo e em outros substratos, esses fungos contribuem para o ciclo de nutrientes e para a manutenção de diversos ecossistemas (HILL et al., 2000; BILLS et al., 2004). Espécimes de Mucorales são caracterizados morfolologicamente pela produção de

estruturas assexuadas, como esporangiosporos merosporangiosporos, esporangiólos e pela formação do zigósporângio, estrutura de resistência de origem sexuada que comporta o zigósporo, formado pela fusão de dois gametângios, iguais ou não (KENDRICK, 2000).

A maioria dos espécimes de Mucorales são capazes de degradar fontes de carbono que variam de açúcares simples, à pectinas, hemiceluloses, lipídios e proteínas (DOMSCH et al., 2007; RICHARDSON, 2009; LIMA et al., 2016a). A biomassa dos espécimes dessa ordem contém quantidades significativas de proteínas, lipídios, ácidos graxos, aminoácidos, quitosana e quitina, os tornam adequados para serem utilizados na produção de alimentos para animais e humanos, bem como nas indústrias farmacêutica e de biocombustíveis (FERREIRA et al., 2013). As características fisiológicas e propriedades bioquímicas dos Mucorales, como a termotolerância, observada em alguns espécimes, bem como a produção de enzimas (como amilases e proteases) tornam esses fungos interessantes para de indústrias de alimentos e bebidas (KWASNA et al., 2006).

A tanase é uma enzima que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos, como ácido tânico, em glicose e ácido gálico (HELBIG, 2000; COSTA et al., 2008), sendo extracelular induzível, produzida na presença de ácido tânico por fungos filamentosos, bactérias e leveduras. Essa enzima possui uma vasta aplicação nas indústrias de bebidas, cosméticos e medicamentos (LEKHA & LONSANE, 1994), podendo ser produzida industrialmente através da fermentação em estado sólido (FES), que é o processo pelo qual o micro-organismo cresce em substratos sólidos ou úmidos, geralmente resíduos vegetais, na ausência de água livre (PANDEY, 2003). O interesse nesse método de fermentação para a produção de compostos de interesse biotecnológico vem crescendo devido à elevada demanda por insumos de menor custo (MACEDO et al., 2005). A FES apresenta vantagens por ser um meio de produção simples que reduz os riscos de contaminação devido à ausência de água livre, e econômico, por utilizar resíduos agroindustriais como substrato (LAGEMAAT & PYLE, 2001).

Os setores agroindustriais e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos como sólidos. Esses resíduos podem apresentar problemas de disposição final, além de serem potenciais poluentes, como é o caso dos resíduos gerados pelas indústrias produtoras de polpas de frutas, como a de manga (*Mangifera indica* L.). Estima-se que, anualmente, no Brasil, sejam produzidas cerca de 35 toneladas de resíduos de manga pelas indústrias de polpas. Tais resíduos, por conterem elevado teor de taninos, podem ser uma

alternativa viável para a produção de tanase através de FES, utilizando Mucorales (CHÁVEZ-GONZÁLEZ et al., 2012).

Considerando que existe apenas um inventário de Mucorales para o solo da Mata Atlântica no Nordeste do Brasil (MAIA et al., 2006), e que ecossistemas desse domínio não foram estudados com grande detalhe, essas áreas podem representar refúgios valiosos para novos taxóns. Diante da importância ecológica e biotecnológica dos Mucorales,

1.1. OBJETIVOS

1.1.2. Objetivo geral

Avaliar a diversidade de espécies de Mucorales isolados do solo de Mata Atlântica e caracteriza-lás quanto à produção de tanase utilizando resíduos de Mangifera indica como substrato.

1.1.3. Objetivos específicos

Determinar a riqueza, diversidade, frequência de ocorrência e abundância relativa de espécies de Mucorales em diferentes ecossistemas da Mata Atlântica localizado no Estado de Pernambuco. Testar um representante de cada espécie isolada quanto à capacidade de produzir tanase através de Fermentação em Estado Solido (FES).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. MUCOROMYCOTA DOWELD

A filogenia dos fungos zigospóricos tem sido amplamente discutida nas últimas décadas (O'DONNELL et al., 2001; HIBBETT et al., 2007; VOIGT & KIRK, 2014; BENNY, 2016; SPATAFORA et al., 2016). As mais recentes alterações na classificação desses fungos surgiram a partir do estudo de James et al. (2006), que sugeriram que o tradicional filo Zygomycota era polifilético. Em seguida, Hibbett et al. (2007), com base na morfologia e em relações filogenéticas, descreveu quatro subfilos com sede incerta para abrigar os espécimes dos fungos zigospóricos: Mortierellomycotina Kerst. Hoffm., K. Voigt & P.M. Kirk, Mucoromycotina Benny, Kickxellomycotina Benny e Zoopagomycotina Benny.

Após um estudo filogenético de escala genômica, Spatafora et al. (2016), propuseram uma nova classificação e descrição para os fungos zigospóricos, tendo dois filios sido propostos: Mucoromycota Doweld e Zoopagomycota Gryganskyi, M.E. Smith, Stajich & Spatafora. Mucoromycota abrange espécimes associados à produção de estruturas sexuais formadas a partir da copulação gametangial, denominada zigósporos. As estruturas assexuais podem incluir a formação de glomerosporos e esporos formados no interior de esporângios, esporangíolos, merosporângios, e/ou a formação de clamidósporos e/ou artrósporos. As hifas na maioria das vezes são cenocíticas, grandes em diâmetro, e tendem a possuir septos acidentais delimitando as estruturas reprodutivas (SPATAFORA et al., 2016). Esse filo compreende três subfilos, [Glomeromycotina (C. Walker & A. Schüßler) Spatafora & Stajich, Mortierellomycotina Kerst. Hoffm., Kerst. Voigt & P. M. Kirk e Mucoromycotina Benny], e nove ordens, (Archaeosporales C. Walker & A. Schüßler, Diversisporales C. Walker & A. Schüßler, Glomerales J. B. Morton & Benny, Paraglomerales C. Walker & A. Schüßler, Mortierellales Caval.-Sm., Endogonales, Mucorales Fr., Umbelopsidales Spatafora & Stajich,) (SPATAFORA et al., 2016).

2.2. MUCOROMYCOTINA BENNY

Mucoromycotina é um dos quatro subfilos propostos por Hibbett et al. (2007) para alocar espécies do antigo filo Zygomycota, atualmente desconsiderado por ser polifilético (JAMES et al., 2006). Esse subfilo, quando proposto, abrangia três ordens: Endogonales Moreau ex R. K. Benj., Mucorales Fr. e Mortierellales Caval.-Sm (HIBBETT et al., 2007). Endogonales abriga fungos sapróbios ou ectomicorrízicos, enquanto Mucorales abrange espécimes sapróbios e parasitas facultativos. Mortierellales comporta apenas espécies

sapróbias. Em seguida, com base em análises filogenéticas multigênicas e morfológicas, o subfilo *Mortierellomycotina* Kerst. Hoffm., Kerst. Voigt & P. M. Kirk foi proposto (HOFFMAN et al., 2011) e passou a abranger os espécimes de *Mortierellales*.

Representantes de *Mucoromycotina* são caracterizados por produzirem zigosporângio e zigósporo (KENDRICK, 2000), sendo esse último um esporo sexuado de parede lisa ou rugosa, geralmente escuro e que pode permanecer em estado latente por longos períodos, germinando em condições favoráveis (BENNY et al., 2001). A reprodução assexuada é desconhecida nos *Endogonales*, enquanto nos *Mucorales* ocorre pela produção de esporos formados no interior de esporângios, esporangíolos ou merosporângios (BENJAMIN, 1979; BENNY, 2009). A partenogênese é uma forma rara de reprodução assexuada que pode ocorrer em algumas espécies das duas ordens, em que os gametângios envolvidos não se unem na copulação, iniciando a formação de um azigósporo, esporo morfológicamente idêntico ao zigósporo, porém com metade do seu tamanho (BENJAMIN & MEHROTRA, 1963; BENNY, 2009).

Estima-se que espécimes *Mucoromycotina* tenham origem no período Pré-Cambriano (BLAIR, 2009) e, estando filogeneticamente inseridas dentre as linhagens basais dos fungos, linhagens de desse subfilo participaram da história evolutiva, adaptando-se e ocupando com sucesso os diferentes habitats (KRINGS et al., 2013). São fungos em maioria sapróbios, embora algumas espécies possam ser simbioses de plantas (*Endogonales*) ou parasitas de animais, plantas e fungos (*Mucorales*) (WHITE et al., 2006; RICHARDSON, 2009). São capazes de crescer em diversos substratos, como solos, frutos, folhas, grãos e alimentos estocados, excrementos de animais e em insetos (TRUFEM et al., 2006; SANTIAGO et al., 2008).

2.3. MUCORALES SCHRÖTER

A ordem *Mucorales* é a maior em número de espécies dentro de *Mucoromycotina*, possuindo mais 200 espécies descritas (HAWKSWORTH et al., 1995). Inicialmente, *Mucorales* possuía quatro famílias (VAN TIEGHEM, 1878), tendo outras sido adicionadas por outros autores. Algumas das famílias acrescentadas tornaram-se ordens, como *Dimargaritales* R. K. Benjamin, *Endogonales*, *Kickxellales* Kreisel ex R. K. Benjamin e *Zoopagales* Bessey ex R. K. Benjamin, enquanto outras famílias foram realocadas dentro dessas ordens por Benjamin (1979). Benny (2009) considerou apenas as famílias *Mucoraceae* Dumort. e *Umbelopsidaceae* W. Gams & W. Meyer. Todas as outras foram sinonimizadas

com Mucoraceae. No entanto, análises filogenéticas sugeriram que muitas das famílias deveriam ser separadas de Mucoraceae, dentro de Mucorales (VOIGT & OLSSON, 2008; VOIGT et al., 2009). Atualmente, Mucorales possui 55 gêneros distribuídos em 14 famílias: Umbelopsidaceae, Lentamycetaceae K. Voigt & P.M. Kirk; Syncephalastraceae Naumov ex R.K. Benj.; Lichtheimiaceae Kerst. Hoffm., G. Walther & K. Voigt, Phycomycetaceae Arx, Saksenaeaceae Hesselt. & J.J. Ellis, Radiomycetaceae Hesselt. & J.J. Ellis, Cunninghamellaceae Naumov ex R.K. Benj, Backusellaceae K. Voigt & P.M. Kirk, Pilobolaceae Corda, Rhizopodaceae K. Voigt & P.M. Kirk, Choanephoraceae J. Schröt., Mycotyphaceae Benny & R.K. Benj. e Mucoraceae (BENNY et al., 2009; HOFFMANN et al., 2013).

Espécimes de Mucorales são facilmente distintos dos outros fungos por apresentarem características marcantes, como o rápido crescimento micelial, mesmo em meios de cultura simples, produzindo estruturas assexuais em abundância, com exceção de *Umbelopsis* Amos & H.L. Barnett, que apresenta crescimento limitado (BENNY et al., 2001). O micélio geralmente é bem desenvolvido, de aspecto cotonoso com coloração variando entre branco, amarelo, cinza, marrom, preto e laranja (ALVAREZ, 2013). Apresentam hifas cenocíticas ou irregularmente septadas, com parede celular composta principalmente por quitina e quitosana, que podem se diferenciar em rizóides, estolões e esporangióforos (KIRK et al., 2008).

Os esporangióforos podem originar-se dos micélios aéreo ou imerso no substrato, podendo ser isolados ou agregados, eretos ou circinados, simples ou com ramificações cimosas, racemosas, simpodiais ou monopodiais (VIRIATO, 2003). Os esporangiosporos são produzidos em esporângios multi-esporados ou em suas variações morfológicas, como esporangiólos, que são esporângios pequenos com poucos esporos ou unisporados, ou em merosporângios, que são esporângios cilíndricos ou claviformes que portam merosporangiósporos (ou merósporos) dispostos em cadeia (ALVAREZ, 2013). A columela, estrutura presente no interior do esporângio, ou a vesícula, localizada na porção terminal dos esporóforos, são estruturas observadas nos representantes dessa ordem (HOFFMANN et al., 2013). As columelas apresentam formas variadas, podendo ser clavadas, cônicas, esféricas, espatuladas, hemisféricas, obovóides, ovóides ou piriformes. Podem ser lisas ou incrustadas, com ou sem projeções apicais (AINSWORTH et al., 1971; BENNY et al., 2001).

Em Mucorales, a reprodução sexuada se inicia com a copulação gametangial, sendo menos comum do que a assexuada e, em várias espécies, a presença do zigósporo (esporo de

origem sexuada) ainda não foi reportada (O'DONNELL et al., 2001). Vários autores apontam a importância do zigospório na taxonomia, sendo a presença ou ausência dessa estrutura, bem como o tipo de ornamentação e a presença de apêndices na mesma, que surgem a partir das células suspensoras, importantes fatores a serem considerados para ajudar na identificação de espécies de alguns gêneros, como *Absidia* Tiegh., *Lichtheimia* Vuill. e *Mycocladius* Beauverie (HOFFMANN et al., 2007).

A reprodução assexuada também ocorre por fragmentação das hifas, produção de clamidósporos ou por gemação, essa última observada nos espécimes dimórficos (ALEXOPOULOS et al., 1996). O dimorfismo pode ser observado em algumas espécies de Mucorales, principalmente de *Mucor* Fresen., em que algumas espécies são capazes de alternar entre as formas filamentosa e leveduriforme (ORLOWSKI, 1991). A forma de levedura pode ocorrer sobre determinadas temperaturas e variações dos níveis de glicose no substrato e de oxigênio disponível (BARTNICKI-GARCIA, 1963).

Mucorales abrange espécimes cosmopolitas, oligotróficos ou mesotróficos, conhecidos como “fungos do açúcar”, por degradarem carboidratos simples, sendo os primeiros a colonizarem o substrato (RICHARDSON, 2009). Representantes dessa ordem apresentam grande importância ecológica nos substratos em que vivem, decompondo matéria orgânica e iniciando o processo de sucessão ecológica. Esses fungos têm o solo como principal habitat, mas são capazes de colonizar diversos substratos de matéria orgânica animal ou vegetal. Sendo R estrategistas, investem em esporulação e crescimento micelial, colonizando os substratos rapidamente (DIX & WEBSTER, 1995; BILLS et al., 2004). A maioria dos espécimes da ordem são mesofílicos, com ótimo crescimento e esporulação entre 20 e 30 °C. Alguns gêneros, como *Lichtheimia*, *Rhizopus* Ehrenb. Rickia, *Rhizomucor* Lucet & Costantin e *Thermomucor* Subrahmanyam, B.S. Mehrotra & Thirum., abrangem espécimes termofílicos ou termotolerantes (SANTIAGO et al., 2014).

O rápido crescimento e a termotolerância facilitam a ação dos patógenos em hospedeiros endotérmicos (RICHARDSON, 2009). Dessa forma, muitos espécimes de Mucorales, principalmente de *Lichtheimia*, são causadores de mucormicose em seres humanos, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (RIBES et al., 2000; RODEN et al., 2005; SKIADA et al., 2011; HOFFMANN et al., 2013). Alguns representantes de Mucorales, como *Choanephora cucurbitarum* (Berk & Ravenel) Thaxt. e *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., são conhecidos por infectarem órgãos vivos de plantas, principalmente os

frutos (DENNIS, 1983), além de serem contaminantes de grãos e alimentos estocados. Outros podem ser encontrados parasitando outros fungos, sendo conhecidos como micoparasitas, como observado em táxons de *Parasitella* (PARTIDA-MARTINEZ & HERTWECK, 2005; BENNY, 2009).

Representantes de Mucorales são importantes para as indústrias farmacêutica, têxtil e de alimentos. Várias enzimas, como amilase, inulinase, lipases e proteases são produzidas por estes fungos para uso industrial (ALVES et al., 2005; SANTIAGO; SOUZA-MOTTA, 2006). Espécies de *Rhizopus* são utilizadas em fermentados à base de arroz, produzidos na Ásia e conhecidos como Tempeh (HESSELTINE, 1986; NOUT & KIERS, 2005; ALVAREZ, 2013). Muitas espécies também são utilizadas na aplicação de licopenos e quitosana, como *Blakeslea trispora* Thaxt. (WU et al., 2005; HOFFMAN et al., 2013), e na produção de ácidos orgânicos, como *Mucor* spp. (KAVADIA et al., 2001; MAGNUSON & LASURE, 2004). Espécies de *Cunninghamella* são comumente utilizadas em processos de biorremediação (YAN & VIRARAGHAVAN, 2003; ZAFAR et al., 2007).

2.4. DOMÍNIO MATA ATLÂNTICA

O Domínio de Mata Atlântica corresponde a um dos 25 “hotspots” do planeta que abrigam elevado número de espécies endêmicas, sendo considerado uma das áreas mais ricas em biodiversidade do planeta (MYERS et al., 2000; TABARELLI et al., 2005). A Mata Atlântica corresponde a um mosaico de florestas e ecossistemas associados que inclui Florestas Ombrófilas Densas, Ombrófilas Mistas, Ombrófilas Abertas, Estacionais Semidecíduais e Estacionais Deciduais, manguezais, restingas e campos de altitude associados, brejos interioranos e encaves florestais da Região Nordeste (IBGE, 2011; SOS MATA ATLÂNTICA, 2011). O domínio fitogeográfico da Mata Atlântica estende-se além da costa brasileira, até territórios da Argentina e Uruguai (LAGOS & MULLER, 2007).

No Brasil, esse domínio se estende por 1.306.000 km², o que representa 15% do território nacional, abrangendo 17 estados (SOS MATA ATLÂNTICA, 2011). Além da região litorânea, a Mata Atlântica está presente em regiões de planaltos e serras no interior do país (RIZZINI, 1963; RIZZINI, 1997). A variedade de formações e composição florística muda de acordo com a geografia e condições climáticas (BARBOSA, 1996). No Nordeste, a Mata Atlântica está distribuída nos estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí, sendo composta por formações pioneiras, porções de floresta ombrófila densa e aberta, floresta estacional semidecidual e decidual, brejo

nordestino, esse último composto por ilhas de floresta estacional encravadas no semi-árido. A vegetação da Mata Atlântica é fortemente influenciada pela distância em relação ao litoral, altitude e variação sazonal (TABARELLI et al., 2005).

A Floresta Ombrófila densa é a formação mais representativa da Mata Atlântica “*sensu lato*”, e tem como importante característica ecológica o fato da vegetação estar inserida em ambientes ombrófilos, ou seja, que possuem elevada precipitação ao longo do ano e temperaturas médias de 25 °C. O solo, em geral, é sempre raso e úmido, principalmente devido às árvores de grande porte que dificultam a entrada de luminosidade (CRUZ et al., 2007). A vegetação é diversificada, com árvores lenhosas que apresentam 20 metros de dossel, além de espécies herbáceas e epífitas (RODERJAN et al., 2002). Estima-se que existam mais de 700 espécies arbóreas, sendo a maioria exclusiva desse tipo vegetacional (REIS, 1995).

Florestas de Tabuleiros são ecossistemas que se desenvolvem às margens da Floresta Ombrófila, em solos arenosos e com vegetação aberta (TAVARES, 1964; ANDRADE LIMA, 1970). É uma das subdivisões da zona litoral presente em altitudes entre 100 e 150 metros. A fitofisionomia é bastante semelhante à do Cerrado central, sendo considerada por vezes como enclave de savana (OLIVEIRA-FILHO, 1993). No entanto, a formação vegetal é uma mistura de espécies litorâneas e do Cerrado, não podendo ser caracterizada como Cerrado (RIZZINI, 1979). Quando muito próximos do litoral, os tabuleiros formam um continuum vegetacional de difícil delimitação junto com a restinga, compartilhando várias espécies de plantas (TAVARES, 1964; ANDRADE LIMA, 1970).

As restingas são formações costeiras, com influência marinha, presentes em solos arenosos e que apresentam uma grande variedade na composição de comunidade vegetacional, apresentando desde tipos herbáceos até arbustivos e arbóreos (IBGE, 2011). Silva & Britez (2005) descreveram e caracterizaram a restinga de acordo com sua fisionomia. A formação com predomínio fisionômico de espécies herbáceas foi denominada de “campo de restinga”, enquanto “frutíceto” apresenta o predomínio de arbustos e algumas espécies arbóreas. A fitofisionomia com predominância de árvores e espécies epífitas foi denominada de “floresta de restinga”.

Os manguezais são considerados como um sistema intermediário de ecossistemas terrestres e aquáticos condicionados às variações da maré e expostos às diferentes condições extremas de salinidade. São ecossistemas ricos em matéria orgânica, servindo como abrigo e

berçário da fauna marinha. Nestes ambientes, os solos possuem baixa oxigenação com elevada concentração de salinidade e sulfetos (SCHAEFFER-NOVELLI, 2002). Os manguezais podem penetrar por quilômetros adentro do continente, não se restringindo apenas à orla marítima (LACERDA et al., 2006).

A Mata Atlântica é um dos domínios mais ameaçados do planeta. No Brasil, grande parte da população vive nesse “hotspot” que possui um histórico de exploração que se iniciou ainda no período colonial. A prática de ciclos extrativistas e o uso indiscriminado de seus recursos culminou na devastação e fragmentação da Mata Atlântica brasileira, o que ocasionou uma enorme perda de biodiversidade (RESENDE et al., 2002). No Nordeste, principalmente no estado de Pernambuco, os índices de desmatamento são mais graves, estando a maioria das florestas preservadas no Sul do País e na Bahia (SOS MATA ATLÂNTICA, 2011). Em Pernambuco, existem poucas áreas de endemismo, restando apenas 5% da floresta original (TABARELLI et al., 2005). A Mata Atlântica possui uma biota altamente diversificada, acreditando-se que abrigue 8% da biodiversidade mundial (CONSERVATION INTERNATIONAL DO BRASIL, 2000). Esse domínio abriga muitas espécies endêmicas de plantas, mamíferos, aves, répteis, anfíbios e micro-organismos, incluindo os fungos (MYERS et al., 2000).

2.5. MUCORALES EM SOLO DE MATA ATLÂNTICA E DE ECOSISTEMAS ASSOCIADOS

O solo de Mata Atlântica apresenta uma biota composta por micro-organismos variados, como algas, bactérias e fungos (MICHEREFF et al., 2005) que participam da sustentabilidade e manutenção desse substrato. Dentre os micro-organismos supracitados, os fungos são os mais abundantes (BILLS et al., 2004), desempenhando um papel importante nesse substrato, decompondo a matéria orgânica e realizando a ciclagem de nutrientes, disponibilizando-os para os demais organismos (HILL et al., 2000). Como principal habitat dos fungos, inclusive dos Mucorales, diversos trabalhos foram realizados sobre o isolamento e identificação desse grupo de fungos nesse substrato.

Warcup (1951) investigou a influência do tipo de solo de restingas na comunidade de fungos filamentosos em Lakenheath Warren, Inglaterra. Foram coletadas amostras de solo e o método de plaqueamento direto foi utilizado. Foram isoladas 33 espécies de Mucorales, sendo *Absidia*, *Mucor* e *Zygorhynchus* Vuill. os gêneros mais frequentes. Poucas espécies, como *A. glauca* Hagem, *A. orchidis* Bainier (= *A. caerulea* Bainier) e *M. lausannensis* Lendn.,

estiveram presentes na superfície do solo, sendo *A. cylindrospora* Hagem a espécie mais abundante.

Eicker (1969) isolou 17 espécies de Mucorales em duas florestas tropicais na África do Sul, similares às florestas úmidas da Mata Atlântica. Foram obtidas *A. cylindrospora*, *Backusella lamprospora* (Lendn.) Benny & R.K. Benj (Como *M. lamprospora*), *Cunninghamella elegans* Lendn., *C. echinulata* (Thaxt.) Thax, *Gongronella butleri* (Lendn.) Peyronel Dal Vesco, *Mucor circinatus* D.X. Lima, G.Walther & A.L. Santiago (como *Circinella simplex*), *M. circinelloides* Tiegh., *M. flavus* Bain., *M. fragilis* Bain., *M. hiemalis* Wehmer (como *M. vallesiacus*), *M. moelleri* (Vuill.) Lendn., *M. racemosus* Fresen., *M. strictus* Hagem, (como *M. varians*), *M. silvaticus* Hagem, *Rhizopus arrhizus* A. Fisch, (como *R. oryzae*) e *R. stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. O autor considera que fungos dessa ordem são comuns em solos ácidos. *Absidia cylindrospora*, *C. elegans* e *G. butleri* exibiram maior número de isolados, tendo *G. butleri* sido considerada abundante nesse ecossistema.

Em extensivas investigações sobre a relação ecológica de fungos filamentosos em solos com condições extremas, Lee & Baker (1972) isolaram fungos a partir de solos de manguezais no Havaí e realizaram estudos para avaliar os níveis de tolerância desses fungos à variação de temperatura e salinidade. Apenas *Mucor circinatus* (como *C. simplex*) foi isolada.

Varghese (1972) realizou estudo para caracterizar a comunidade de fungos solo em área natural e de plantações numa floresta tropical da Malásia, visando explorar as inter-relações dos fungos a esses respectivos habitats. A área natural de floresta tropical foi caracterizada como “florestas clímax climática”, com espécies comuns às florestas brasileiras. A partir do isolamento dos fungos do solo pelo método de diluições sucessivas, *C. echinulata*, *C. blakesleeana* Lendner e *R. microsporus* Tiegh. (como *M. microsporus*) foram isoladas e consideradas raras nas duas áreas.

Trufem (1981a,b,c) isolou e descreveu alguns gêneros de Mucorales em solos de Mata Atlântica do estado de São Paulo, como *Absidia*, *Circinella* van Tieghem & Le Monn., *Cunninghamella* Matr., *Gongronella* Ribaldi, *Mucor* e *Rhizopus*. Dentre as espécies descritas estão *A. cylindrospora*, *A. pseudocylindrospora* Hesselt. & J.J. Ellis, *A. repens* Tiegh., *A. spinosa* var. *biappendiculata* Rall & Solheim, *Circinella angarensis* (Schostak.) Zycha, *C. muscae* (Sorokīn) Berl. & De Toni, *C. rigida* G. Sm., *C. bainieri* Naumov, *C. echinulata*, *C. elegans*, *G. butleri*, *Mucor circinatus* (como *C. Simplex*), *M. corticolus* Hagem, *M. fuscus* Bainier, *M. fragilis*, *M. genevensis* Lendn., *M. heterosporus* A. Fisch., *M. hiemalis*, *M.*

mousanensis Baijal & B.S. Mehrotra, *M. piriformis* A. Fisch, *M. rufescens* A. Fisch., *M. suhagiensis* M.D. Mehrotra, *R. arrhizus* (como *R. oryzae*) e *R. stolonifer* (como *R. nigricans*).

Em trabalho realizado na reserva ecológica Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André, São Paulo, Schoenlein-Crusius & Milanez (1997) obtiveram 13 táxons de Mucorales em folheto, solo e água. *Mucor* foi mais frequente, sendo representado por quatro espécies e duas variedades, seguido por *Rhizopus* e *Mucor* (como *Zygorhynchus*). *Mucor hiemalis* e *M. circinelloides* foram consideradas frequentes nos solos de Mata Atlântica. Estes autores reportaram pela primeira vez *M. silvaticus* (como *M. hiemalis* f. *silvaticus*), *R. arrhizus*, *R. oligosporus* Saito, *M. japonicus* Komin (como *Z. japonicus*) e *M. macrocarpus* Y. Ling (como *Z. macrocarpus*) para a Mata Atlântica.

Santos et al. (1998) estudaram a diversidade de fungos do solo em três áreas, uma floresta de Eucaliptos, uma mata de interseção e uma área remanescentes da Mata Atlântica, na Ilha dos Eucaliptos, na Represa de Guarapiranga, em São Paulo. Foram reportados nove táxons de Mucorales, sendo *Cunninghamella phaeospora* Boedijn o táxon mais frequente.

Em trabalho realizado na estação ecológica de Juréia-Itatins, no estado de São Paulo, Tauk-Tornisielo et al. (2005) compararam a diversidade entre uma área natural e outra revegetada. Em ambas as áreas foram isolados espécimes de *C. simplex*, *C. elegans* e *M. hiemalis*. *Circinella simplex* foi mais frequente dentre os Mucorales.

Schoenlein-Crusius et al. (2006) obtiveram elevada diversidade de Mucorales de solo e folheto de Mata Atlântica, em Cubatão, São Paulo, tendo reportado 40 táxons entre 1993 e 1995. *Mucor amphibiorum* Schipper, *M. prayagensis* Mehrotra & Nand ex Schipper e *Parasitella parasitica* (Bain.) Syd. foram relatadas como primeiras ocorrências para o Brasil.

Com interesse em caracterizar as espécies de fungos como comuns ou ocasionais em solos da restinga, Deacon et al. (2006) obtiveram 48 isolados da restinga de Roxburghshire, Reino Unido. Dentre os Mucorales isolados, *M. hiemalis* (Fi=41,80%) e *A. cylindrospora* (11%) apresentaram elevadas frequências de ocorrência, sendo consideradas abundantes, enquanto *M. saturninus* (0,2%) e *M. silvaticus* (0,3%) mostraram baixa frequência de ocorrência, sendo consideradas ocasionais.

2.6. ENZIMAS E MUCORALES

Os fungos desempenham um importante papel ecológico, estando relacionados diretamente com a decomposição da matéria orgânica. Esses organismos são capazes de

sintetizar diversos compostos de interesse industrial, como ácidos graxos, antibióticos, vitaminas e enzimas (VELÁZQUEZ-CEDEÑO et al., 2002).

As enzimas são proteínas que catalizam reações químicas essenciais para o metabolismo dos organismos, auxiliando a degradação da matéria orgânica. Esses catalizadores podem ser classificados como: oxidoredutases (quando catalisam reações oxidoredutoras), transferases (catalisam a transferência entre moléculas), hidrolases (catalisam reações de hidrólise), liases (atuam na adição/remoção de ligações duplas), isomerases (quando um substrato transforma-se em um produto isômero) e ligases (catalisam a ligação covalente de moléculas, ocasionando a quebra de ligação de alta energia) (ORLANDELLI et al., 2012).

A estabilidade de uma enzima em elevadas temperaturas é um atributo muito importante para indústria. Por exemplo, celulasas termoestáveis exibem elevada capacidade degradar lignocelulose a 65 °C (VIAKARI et al., 2007). Enzimas produzidas por fungos mesofílicos geralmente possuem uma estabilidade até 50 °C, enquanto fungos termofílicos são capazes de produzir enzimas termoestáveis que suportam até 70 °C.

A ordem Mucorales apresenta gêneros termofílicos ou termotolerantes capazes de produzir enzimas termoestáveis (BERKA et al., 2011). Embora sejam conhecidos por degradarem preferencialmente açúcares solúveis, alguns espécimes de Mucorales também são capazes de degradar moléculas complexas como pectina, proteínas, lipídios e hemicelulose (SCHULEIN, 2000; DOMSCH et al., 2007) e, para isso, produzem enzimas de interesse biotecnológico, como amilases, pectinases, proteases, lipases, inulinases e celulasas (HOFFMANN et al., 2013; LIMA et al., 2016). No entanto, existem poucos trabalhos realizados quanto à produção de tanase produzida por representantes de Mucorales.

Em uma triagem em ensaio utilizando meio de cultura sólido contido em placas de Petri por fungos produtores de tanase, Bradoo et al., (1996) testaram 50 espécimes, dentre os capazes de produzir a enzima, foram encontrados *Cunninghamella* sp., *Syncephalastrum racemosum* e *Helicostylum* sp. Os autores reportaram o primeiro registro da produção de tanase extracelular por membros de Mucorales.

Kar & Banerjee (2000) utilizaram sementes de *Caesalpinia digyna*, como substrato rico em tanino, para produção de tanase por uma linhagem de *Rhizopus arrhizus* (como *R. oryzae*) isolada do solo. Os autores constataram que a melhor performance para produção

enzimática (30 U/mL) dessa espécie foi através do método de fermentação em estado sólido, com teor de umidade do substrato de 93% e incubada a 32°C por 72 horas.

Banerjee et al. (2005) utilizaram o método de co-culturas de *Rhizopus arrhizus* e *Aspergillus foetidus* para maximizar a produção de tanase através de fermentação em estado sólido, utilizando frutas de *Terminalia chebula* e pó de sementes *Caesalpinia digyna* como substrato. Os autores conseguiram otimizar o processo da produção obtendo um rendimento de 40 U/mL, utilizando um teor 80% de umidade do substrato incubado a 30°C por 48h. Utilizando uma linhagem geneticamente modificada de *A. foetidus* no método de co-cultura com *R. arrhizus*, Purohit et al. (2006) reportaram uma produção de 53.6 U/mL, sugerindo que a modificação genética de espécimes pode aumentar o desempenho na produção dessa enzima.

2.7. TANASE

A tanase foi descoberta em 1967, por van Thiegem, após observar o crescimento de *Penicillium glaucum* Link e *Aspergillus niger* Tiegh. em um experimento sobre a formação de ácido gálico em uma solução aquosa de taninos. Essa enzima hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis, como ácido tânico, em glicose e ácido gálico (HELBIG, 2000; COSTA et al., 2008), sendo extracelular induzível e produzida na presença de ácido tânico por fungos filamentosos, bactérias e leveduras. O mecanismo de ação da enzima para degradação do ácido tânico consiste na hidrólise de todas as ligações depsídicas do ácido tânico, em que irá ocorrer a liberação da 1,2,3,4,6-pentagaloilglicose e do ácido gálico. Em seguida, resíduos como galoil são removidos até antes da liberação total da glicose (PINTO et al., 2005b).

Os taninos são compostos fenólicos que provém do metabolismo secundário das plantas e representam o quarto constituinte vegetal mais abundante, depois da celulose, hemicelulose e lignina (SCALBERT, 1991). Presente na maioria das partes da planta, esse composto pode ocorrer desde em vacúolos celulares, folhas, casca, frutos, semente até na seiva. Os taninos são produzidos pelas plantas com a finalidade de defesa contra herbívoros e parasitas (PINTO et al., 2005b).

A tanase possui uma vasta aplicação nas indústrias de bebidas, cosméticos e medicamentos (LEKHA & LONSANE, 1997). Por causa dos taninos, que são capazes de formar compostos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcalóides, muitos frutos e outros produtos vegetais produzem uma sensação de adstringência no paladar (MONTEIRO

et al., 2005). Na indústria de sucos de frutas, o uso da tanase pode clarificar e reduzir adstringência de frutas ricas em taninos (ROUT & BANERJEE, 2006). A tanase também é empregada na produção de bebidas alcoólicas para reduzir a turbidez causada pelos compostos fenólicos, em que atuará quebrando os polifenóis presentes no vinho e no malte da cerveja (LEKHA & LONSANE, 1997). Outra aplicação bastante comum da tanase é na produção de ácido gálico e propil galato, utilizados como antioxidantes em alimentos e cosméticos (SHARMA & GUPTA, 2003). Na indústria alimentícia, essa enzima é utilizada contra a auto-oxidação de lipídios, em óleos e gorduras utilizados na fritura, produtos congelados e pré-cozidos, leite de soja, queijos e rações para animais (MAI et al., 1990). Nas rações a tanase atua aumentando a digestibilidade dos constituintes vegetais, ricos em taninos que animais jovens não conseguem digerir facilmente (MESCHONAT et al., 2001).

Vários micro-organismos têm sido relatados como produtores de tanase, destacando-se os fungos filamentosos. *Aspergillus* e *Penicillium* são considerados os melhores produtores desta enzima (AGUILLAR et al., 2007). Embora várias espécies de Mucorales sejam capazes de produzir enzimas de interesse biotecnológico, trabalhos experimentais que comprovem a produção potencial de tanases ainda são escassos (CORDEIRO NETO et al., 1997).

2.8. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

O processo de fermentação em estado sólido (FES) é caracterizado pelo crescimento do micro-organismo em substratos sólidos, geralmente resíduos vegetais e na ausência de água livre. Esse método apresenta como vantagens a redução nos custos energéticos e no volume do fermentador, permitindo a obtenção de metabólitos de forma concentrada, tornando a recuperação mais rápida e econômica, além de possuir um baixo risco de contaminação devido à baixa atividade de água (PANDEY, 2003).

A FES é utilizada há séculos para a produção de alimentos fermentados orientais (RADNAABAZAR et al., 2011; ZHANG et al., 2013). No entanto, a partir de 1980, esse tipo de fermentação vem despertando o interesse industrial, pois os custos nos processos de fermentação submersa (FS) são bastante elevados para a produção de enzimas (RAHARDJO et al., 2005). Apesar das vantagens da FES sobre a FS, principalmente do ponto de vista econômico sócio ambiental, ainda existem dificuldades na concepção de biorreatores e limitações em relação aos processos que envolvem os micro-organismos (YEGIN et al., 2011; RAVIKUMAR et al., 2012). Essa dificuldade se dá pelo pouco conhecimento da fisiologia dos fungos utilizados no processo, necessitando que as empresas invistam em pesquisadores

que dêem mais atenção para a parte microbiológica, como a quantidade de inóculo e temperatura ideal de crescimento do organismo utilizado (BARRIOS–GONZÁLEZ, 2012).

Higashio & Yoshioka (1982) demonstraram o quanto método da FES aumenta a eficiência na produção enzimática. Os autores utilizaram linhagens de *Mucor racemosus* Fresen. para a produção de protease coagulante e observaram que a FES atingiu a produção de 6500 U/g de substrato sólido, o que corresponde a 600-1000 U/mL, enquanto, utilizando a FS, obteve-se uma atividade enzimática entre 600 e 800 U/mL. Além da produtividade da enzima ser maior usando o sistema de FES, outros parâmetros, como taxa máxima de crescimento específico, nível de biomassa máxima, produção de enzima/biomassa e a taxa de produção secundária ou de decomposição, foram melhores com a FES em relação à FS (VINIEGRA-GONZÁLEZ, 2003).

O método de FES tem recebido crescente atenção também pelo fato de se apoiar na conscientização ecológica e sustentabilidade ambiental, pois desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos agrícolas para a produção das enzimas (PINTO et al., 2005a). Um critério importante para a produção de enzimas por FES é a seleção dos substratos, pois a reciclagem dos mesmos pode agregar valor e reduzir os custos na produção das enzimas (SILVA et al., 2009). O tamanho do substrato é outro fator importante para a produção, pois partículas de substrato menores fornecem uma menor área de superfície para o micro-organismo, resultando na aglomeração do substrato e proporcionando um crescimento limitado, enquanto partículas maiores propiciam uma melhor aeração (COUTO & SANROMÁN, 2006).

2.9. MANGA (*MANGIFERA INDICA* L.)

Os setores agroindustriais produzem grandes quantidades de resíduos que podem ser poluentes. Atualmente, os conceitos de minimização, aproveitamento e bioconversão de resíduos estão cada vez mais difundidos nos setores agroindustriais (LAUFENBERG et al., 2003).

A manga é um fruto da mangueira que pertence à família Anacardiaceae. É uma das frutas tropicais de maior expressão econômica nos mercados brasileiro e internacional. Essa fruta apresenta um aroma doce com aparência e cor exóticas, com tamanho e forma variáveis, além de possuir grande quantidade de polpa com abundância de carotenóides e carboidratos (BRANDÃO et al., 2003). A composição química do fruto depende da variedade e do estágio de maturação, assim como das condições de cultura. Em geral, a fruta *in natura* é constituída

principalmente por água, carboidratos, ácidos orgânicos, sais mineirais, proteínas, vitaminas (A, C e do Complexo B) e pigmentos, além de taninos (ROZANE et al., 2007).

O Brasil é um dos principais produtores de manga do mundo. Segundo a EMBRAPA (2004), houve uma produção em 2007 de 1.272.184 toneladas de fruta, com a exportação de 116.047 toneladas. O Nordeste é a principal região produtora do país, com uma participação de 76% no mercado, sendo Pernambuco o segundo maior produtor com cerca de 196.908 toneladas, perdendo apenas para a Bahia, onde a produção ocorre principalmente no Vale do São Francisco (EMBRAPA, 2011).

A manga é uma das frutas tropicais que compõem a dieta alimentar das classes média e alta brasileiras. O fruto é comercializado quase que exclusivamente na forma *in natura*, mas também pode ser encontrado como polpa congelada. Essa polpa pode ser empregada na elaboração de sucos e néctares, além de ser adicionada à sorvetes, licores e outros produtos (EMBRAPA, 2004). Estima-se que, anualmente, no Brasil, sejam produzidas cerca de 35 toneladas de resíduos de manga por indústria de polpas. Tais resíduos, por conterem elevado teor de taninos e celulose, são uma alternativa viável para a produção de tanase e celulase através da FES, utilizando fungos (CHÁVEZ-GONZÁLEZ et al., 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ÁREAS DE ESTUDO

A Reserva Ecológica Dois Irmãos (8°31'55.8"S 37°15'34.2"W) localiza-se em torno do perímetro urbano da cidade do Recife, Pernambuco, nordeste do Brasil (RIBEIRO et al., 2007). A área possui cerca de 387 ha e compreende uma Reserva Ecológica de Mata Atlântica. O clima é tropical costeiro quente e úmido com temperatura anual de 25 °C, com período chuvoso que se estende de março a agosto e precipitação anual de 2.460 mm (MOURA-JUNIOR et al., 2010). A Reserva Ecológica contém uma vegetação caracterizada como floresta ombrófila densa, incluindo estratos arbóreo e arbustivo, com um dossel que atinge 35 m em altura. O solo é composto principalmente de associações de latossolos, podzólicos e podzóis (COUTINHO et al., 1998).

A Reserva Biológica de Saltinho (8°43'09"S 8°44'13"S) e Área de Proteção Ambiental de Guardalupe (35°10'11"W 35°11'02"W) estão situadas na mesoregião da mata pernambucana, localizada a 100 km de Recife, abrangendo os Municípios de Tamandaré e Rio Formoso. O clima é caracterizado como úmido (As'), segundo Koppen, com temperatura média anual de 25° C. As chuvas são bem distribuídas ao longo do ano, não havendo uma estação verdadeiramente seca, com maior precipitação entre os meses de março e julho, enquanto o período de baixa precipitação ocorre nos meses de outubro, novembro e dezembro, apresentando precipitações médias anuais de 1.500 a 2.000 mm. Os solos predominantes na reserva são latissolo, argissolo e gleissolo (IBAMA, 2003). A vegetação é remanescente de Mata Atlântica, predominantemente composta por florestas ombrófilas. O domínio fitogeográfico é diversificado, principalmente na APA de Guardalupe, que envolve a REBIO, onde são observadas zonas florestais, zonas de tabuleiros, de restingas e de manguezais (IBAMA, 2003; RODRIGUES et al., 2010).

As amostras do solo foram coletadas na Reserva Ecológica Dois Irmãos, Reserva Biológica de Saltinho, duas áreas naturais com fitofisionomias de florestas ombrófilas densas (Figuras 1 e 2), e na APA de Guardalupe, em três áreas naturais com fitofisionomias diferentes: tabuleiro (Figura 3), restinga (Figura 4) e manguezal (Figura 5).

As florestas ombrófilas densas ou Mata Atlântica *senso latu* apresentam estruturas florestais bem desenvolvidas com dossel de 20 a 30 m e espécies chegando a 50 m de altura. Apresentam em sua composição florística espécies das famílias Anacardiaceae, Euphorbiaceae, Lauraceae, Mimosaceae, Moraceae, Myrtaceae e Sapotaceae (IBAMA, 2003).

O tabuleiro é um ecossistema que se desenvolve à margem da floresta atlântica, apresentando espécies vegetais do cerrado em áreas de solo arenoso próximas ao litoral. A vegetação do tabuleiro surge em áreas abertas em enclaves costeiros (ALMEIDA et al., 2009). Além disso, o tabuleiro pode formar um contínuo vegetacional com áreas de restinga, compartilhando espécies vegetais com esse ecossistema (ANDRADE LIMA, 1970).

Os ecossistemas de restingas apresentam uma comunidade biológica diversificada, como consequência do grau de exposição às brisas marinhas e ao tipo de solo. A vegetação de restinga pode variar em fisionomias, desde o tipo herbáceo praiano até o arbóreo fechado, em que plantas, como *Remirea maritima* Aubl. e *Canavalia rosea* (Sw.), são encontradas (SAMPAIO et al., 2005).

Os manguezais são ecossistemas expostos a condições de extrema salinidade, sendo considerados sistemas intermediários aquáticos e terrestres. Apresentam em sua composição *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae), *Laguncularia racemosa* (Combretaceae) e *Avicennia* spp. (Acanthaceae) (CASTIGLIONI & COELHO, 2011).

Figura 1 - Aspecto da floresta ombrófila densa na Reserva Ecológica Dois Irmãos, Recife-PE.



Fonte: Diogo Xavier Lima.

Figura 2 - Aspecto da floresta ombrófila densa na Reserva Biológica de Saltinho, Tamandaré-PE.



Fonte: Diogo Xavier Lima.

Figura 3 - Aspecto do tabuleiro na Reserva Ecológica Dois Irmãos, Recife-PE.



Fonte: Diogo Xavier Lima.

Figura 4 - Aspecto da restinga na APA de Guardalupe, Tamandaré-PE.



Fonte: Diogo Xavier Lima.

Figura 5 - Aspecto do manguezal na na APA de Guardalupe, Tamandaré-PE.



Fonte: Diogo Xavier Lima.

3.2. COLETAS DOS SOLOS

Entre junho e dezembro/2014 foram realizadas sete coletas de solo. Em cada área, foram distribuídos aleatoriamente oito quadrantes de 25m² (5 x 5m), respeitando uma distância mínima de 200m entre os mesmos. Em cada quadrante, foram coletadas seis subamostras de solo em pontos equidistantes a uma profundidade de 20cm, totalizando 48 subamostras de solo para cada área por coleta. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e conservadas em caixas de isopor com gelo durante o transporte. No laboratório de Micologia da UFPE, foram homogeneizados volumes iguais das seis subamostras de cada quadrante de coleta originando uma amostra composta por quadrante, totalizando oito amostras compostas por área de coleta. No total, 280 amostras compostas foram analisadas.

3.3. ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS MUCORALES

Para o isolamento dos Mucorales dos solos, 5mg desse substrato foram adicionadas ao meio de cultura de ágar gérmen de trigo (BENNY, 2008), adicionado de cloranfenicol (80mg.L⁻¹), contido em placas de Petri. Para cada amostra de solo foram preparadas placas em triplicata. O crescimento das colônias foi acompanhado por 72 horas a 28 ± 1 °C. Para a purificação dos Mucorales, fragmentos das colônias foram transferidos separadamente para o meio ágar malte (O'DONNELL, 1979) adicionado de cloranfenicol (80mg.L⁻¹), contido em placas de Petri e, depois de confirmada a pureza, transferidos para tubos de ensaio contendo batata dextrose ágar – BDA (LACAZ et al., 2002).

Os táxons foram identificados pela observação das características macroscópicas (coloração, aspecto e diâmetro das colônias) e microscópicas (microestruturas), de acordo com as descrições de Benny (1982), Benny & Benjamin (1975), Schipper (1978, 1984, 1990), Domsch et al. (2007), Hesseltine & Ellis (1964), Hesseltine & Fennel (1995), Hoffmann et al. (2007), Zheng & Chen (2001), Zheng et al. (2007).

3.4. EXPERIMENTO DE CRUZAMENTO E CINÉTICA DE CRESCIMENTO DOS MUCORALES

As temperaturas ideal e máxima para o crescimento dos isolados foi determinada para espécimes das espécies novas e primeiras ocorrências. Discos de 5 mm de diâmetro foram inoculados na porção central de placas e Petri contendo o meio de cultura AEM e BDA. As placas incubadas a 12, 15, 18, 20, 23, 25, 28, 30, 32 e 34°C tendo o crescimento sido acompanhado por nove dias. O diâmetro das colônias foi medido a cada dois dias.

As experiências de cruzamento foram realizadas em três placas contendo AEM a 20 e 25 °C. Dois discos de 5 mm de diâmetro foram retirados de cada colônia e inseridos em lados opostos das placas a 3 cm um do outro. Após três semanas, verificou-se a formação do zigosporo nas placas com auxílio de um estereomicroscópio (Leica EZ4). A fim de facilitar a observação de zigosporos, adicionou-se etanol 95% à cultura (LIMA et al., 2017).

3.5. FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DOS MUCORALES

A frequência de ocorrência (F_i) das espécies foi estimada segundo a equação: $F_i = J_i/k$, em que: F_i = frequência de ocorrência da espécie i ; J_i = número de amostras nas quais a espécie i ocorreu; K = número total de amostras de solo.

De acordo com essa fórmula as espécies foram classificadas como: muito frequentes ($F_i \geq 10\%$), frequentes ($> 5 < 10\%$), infrequetes ($> 1 < 5\%$), e raras ($\leq 1\%$) (HYDE & SARMA, 2001).

3.6. ABUNDÂNCIA RELATIVA MUCORALES

A abundância relativa de cada espécie de Mucorales nas quatro áreas foi calculada aplicando-se a fórmula: $Ar = (N_i/N) \times 100$, em que: Ar = abundância relativa da espécie i ; N_i = número de UFC da espécie i ; N = número total de UFC.

3.7. INDÍCES ECOLÓGICOS

Utilizando-se o programa Primer (CLARKE & GORLEY, 2006) foi determinada riqueza de espécies, diversidade (Shannon Wiener) e equitabilidade (Pielou's) dos Mucorales nos solos inventariados.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação da comunidade fúngica entre as áreas foi realizada através da Análise de Similaridade (ANOSIM), em que a matriz de similaridade Bray-Curtis foi representada graficamente através da ordenação não métrica por escalonamento multidimensional (MDS). Curvas de acumulação de espécies também foram calculadas para cada área, o que permitiu estimar a riqueza total de cada área através de estimadores como Chao 1 e Jackknife 1. Para essas análises multivariadas foi utilizado o programa Primer (CLARKE & GORLEY, 2006), enquanto as análises de variância (ANOVA) e comparação de médias, pelo teste de Tukey ($p = 0,05$), foram realizadas utilizando-se o programa Statistica (STATSOFT, 1997).

3.9. PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DO SOLO

O pH foi aferido a partir da mistura de solo em água na proporção de 1: 2,5, enquanto. O Al^{3+} , teores de Ca^{2+} e Mg^{2+} do solo foram extraídos utilizando uma solução de 1 mL L^{-1} KCl na proporção 1:10 e quantificados por titulação. Potássio, Na e P foram extraídos com solução de Mehlich-1 na proporção de 1: 1 (solo: solução). Os conteúdos de K e de Na foram determinados por fotometria de chama e o conteúdo de P foi determinado por um espectrofotômetro no comprimento de onda de 725 nm. A acidez potencial (H + Al) foi extraída com acetato de cálcio e quantificada por titulação (EMBRAPA, 2009). Todas as análises foram realizadas em triplicata (Tabela 1).

Tabela 1- Análise de fatores abióticos de amostras de solo de áreas de floresta ombrófila densa, tabuleiro, restinga e mangue do solo da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe.

	pH	P	Ca	Mg	Na	K	Al	H	S	CTC
C1FOD	5,6	6	1,25	1,4	0,07	0,16	0,7	8,95	2,9	12,5
C2FOD	5,5	8	1,3	1,4	0,07	0,18	0,7	8,9	2,9	12,4
C3FOD	5,4	6	1,2	1,55	0,08	0,25	0,8	8,8	2,86	12
C4FOD	5,6	10	1,25	1,3	0,08	0,18	0,73	8,85	2,88	12,6
C5FOD	5,6	14	1,28	1,4	0,07	0,2	0,8	9	2,6	12,9
C6FOD	5,5	7	1,25	1,5	0,09	0,18	0,75	8,5	2,5	12,2
C7FOD	5,6	8	1,3	1,4	0,07	0,18	0,73	8,8	2,4	12
C1TAB	5,4	2	0,6	0,65	0,06	0,05	0,3	4,56	1,4	6,2
C2TAB	5,3	3	0,65	0,65	0,06	0,05	0,33	4,5	1,45	6,2
C3TAB	5,2	3	0,7	0,6	0,06	0,03	0,35	5,1	1,3	6,2
C4TAB	5,4	5	0,6	0,7	0,05	0,04	0,3	4,3	1,35	6,5
C5TAB	5,3	2	0,65	0,65	0,06	0,05	0,3	4,57	1,37	6,3
C6TAB	5,4	2	0,6	0,6	0,06	0,05	0,35	4,3	1,4	6,4
C7TAB	5,4	4	0,75	0,6	0,05	0,04	0,37	4,5	1,5	6,3
C1RES	6,1	4	0,65	0,6	0,06	0,06	0	2,39	1,3	3,8

	pH	P	Ca	Mg	Na	K	Al	H	S	CTC
C1FOD	5,6	6	1,25	1,4	0,07	0,16	0,7	8,95	2,9	12,5
C2FOD	5,5	8	1,3	1,4	0,07	0,18	0,7	8,9	2,9	12,4
C3FOD	5,4	6	1,2	1,55	0,08	0,25	0,8	8,8	2,86	12
C4FOD	5,6	10	1,25	1,3	0,08	0,18	0,73	8,85	2,88	12,6
C5FOD	5,6	14	1,28	1,4	0,07	0,2	0,8	9	2,6	12,9
C6FOD	5,5	7	1,25	1,5	0,09	0,18	0,75	8,5	2,5	12,2
C7FOD	5,6	8	1,3	1,4	0,07	0,18	0,73	8,8	2,4	12
C1TAB	5,4	2	0,6	0,65	0,06	0,05	0,3	4,56	1,4	6,2
C2TAB	5,3	3	0,65	0,65	0,06	0,05	0,33	4,5	1,45	6,2
C3TAB	5,2	3	0,7	0,6	0,06	0,03	0,35	5,1	1,3	6,2
C4TAB	5,4	5	0,6	0,7	0,05	0,04	0,3	4,3	1,35	6,5
C5TAB	5,3	2	0,65	0,65	0,06	0,05	0,3	4,57	1,37	6,3
C6TAB	5,4	2	0,6	0,6	0,06	0,05	0,35	4,3	1,4	6,4
C2RES	6,1	4	0,6	0,6	0,04	0,05	0	2,6	1,35	3
C3RES	6	4	0,55	0,6	0,05	0,04	0,01	2,3	1,3	3,6
C4RES	6,2	5	0,55	0,75	0,05	0,04	0,01	2,34	1,4	3,2
C5RES	6,1	6	0,5	0,75	0,05	0,05	0	2,34	1,38	3,1
C6RES	6	5	0,6	0,6	0,06	0,06	0,01	2,35	1,4	3,9
C7RES	6	5	0,5	0,6	0,06	0,05	0	2,3	1,34	3,1
C1MAN	5,8	4	2,8	1	4,3	0,18	0	2,25	8,3	10,6
C2MAN	5,7	6	2,7	1,1	4,2	0,2	0	2,2	8,2	10,5
C3MAN	5,8	4	2,75	1,1	4,1	0,25	0	2,2	8,4	10,9
C4MAN	5,8	4	2,8	1	4,3	0,16	0	2,36	8,4	11
C5MAN	5,7	5	2,9	1	4,2	0,3	0	2,4	8,1	10,8
C6MAN	5,7	4	2,8	1,1	4,3	0,25	0,01	2,3	8,3	10,6
C7MAN	5,7	5	2,8	1	4,2	0,2	0	2,29	8,6	10,5

C1-C7FOD: coletas 1-7 na floresta ombrófila densa; C1-C7TAB: coletas 1-7 no tabuleiro; C1-C7RES: coletas 1-7 na restinga; C1-C7MAN: coletas 1-7 no mangue. CTC: capacidade de troca de cátions.

3.10. EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO

A extração do DNA foi realizada para confirmação molecular de espécies novas, primeiras citações para o Brasil e de isolados que não puderam ser identificados pelas características morfológicas. A biomassa foi obtida de culturas puras em meio AEM, em que o micélio foi transferido para microtubos de 2mL com tampa de rosca, acrescidos de 0,5g de pérolas de vidro para a trituração do material por agitação em alta velocidade em um FastPrep. Após a trituração do material, foi realizada a extração do DNA genômico conforme Góes-Neto et al. (2005). Os iniciadores ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990), NL4 (O'DONNELL et al., 1993) e LR3 (VILGALYS & HESTER, 1990), bem como Mcm7-709f e Mcm7-1348rev foram utilizados para a reação de seqüenciamento do ITS região, o rDNA LSU e o gene MCM7, respectivamente. (WHITE et al., 1990; VAN TUINEN et al., 1998; SANTIAGO et al., 2014; LIMA et al., 2017). Os produtos amplificados foram purificados com PureLink – PCR Purification Kit – Invitrogen e posteriormente clonados com o CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas; Carlsbad, USA) seguindo a metodologia do fabricante. As sequências foram enviadas para sequenciamento na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento e Expressão Gênica do Centro de Biociências da UFPE, sendo sequências gênicas comparadas às depositadas na biblioteca de genes (GenBank) utilizando o Blastn. A análise filogenética foi realizada utilizando as regiões ITS e LSU do rDNA e do gene MCM7. As sequências foram alinhadas no CLUSTALX (LARKIN et al., 2007) e editadas utilizando o BioEdit (HALL, 1999), tendo a Análise Bayesiana sido realizada pelo MrBayes 3.1.2 (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003).

3.11. SELEÇÃO DE CULTURAS DE MUCOROMYCOTINA PRODUTORAS DE TANASE POR FES

Um representante de cada espécie dos Mucorales isolados do solo foi selecionado. Cada isolado foi inoculado em ágar extrato de malte (AEM), contido em tubo de ensaio, e incubado a 30 °C. Para a preparação do inóculo, os esporos das culturas com 7 dias de crescimento em AEM foram suspensos em solução salina + Tween 80 (0,1%) e, em seguida, contados em câmara de Neubauer.

Resíduos de manga foram adquiridos de empresas produtoras de polpas de frutas em Recife - PE. Os resíduos atuaram como substratos indutores na produção da tanase. À

frascos de Erlenmeyers de 250 mL, foram adicionadas 10g do resíduo previamente tratado (lavado com água destilada e desidratado em estufa a 50 °C por 72 horas) e esterilizado a 120 °C por 15 min. Foram adicionados, em cada frasco, 10 mL de solução de sais na composição (g/L): KH_2PO_4 (1,0 g); NH_4NO_3 (2,0 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,02 g); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,004 g); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,002 g); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,0025 g) e ácido tânico (10 g), sendo o pH ajustado para 5,7.

Os frascos foram inoculados com 1mL da solução de esporos na concentração 5×10^8 esporos/mL e incubados a 30°C em BOD. Após 120 h de fermentação, foram adicionados 100 mL de solução NaCl (1,5%) e agitados a 200 rpm por 2 horas. A solução foi filtrada em papel de filtro (CELAB 22,15 micras) como o auxílio de uma bomba a vácuo e centrifugada a 12.300 g por 30 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante considerado o extrato enzimático bruto (MURUGAN et al., 2007, modificado).

3.12. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA TANASE

A atividade enzimática da tanase presente no extrato bruto foi determinada colorimetricamente de acordo com Mondal et al. (2001). A reação enzimática foi realizada com uma mistura contendo 5 mL da solução de ácido tânico (0,02% p/v) em tampão acetato de sódio (0,2 M pH 5,5) e 0,25 mL do extrato enzimático bruto, sendo incubada a 30 °C por 10 minutos. Em seguida, a mistura reacional foi transferida para tubos contendo 0,6 mL de solução etanólica de rodanina (0,667% p/v), sendo homogeneizada e deixada em repouso por 5 minutos para paralisar a reação. Foram adicionados 0,4 mL de solução de hidróxido de potássio (0,5 N) que foi homogeneizada e deixada em repouso por 2,5 minutos até desenvolver uma coloração rosa para ser lida pelo espectrofotômetro. Foram adicionados 8,6 mL de água destilada em cada tubo que foi deixado por 15 minutos a temperatura ambiente para a estabilização da cor. A absorbância foi lida a 520 nm contra o branco (sem ácido tânico). Uma unidade de atividade de tanase (u) foi definida como a quantidade de enzima requerida para hidrolisar 1µm de ácido tânico por minuto. O rendimento da enzima foi expresso em $\text{U mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (SHARMA et al., 2000). As atividades foram estimadas em triplicata.

4 RESULTADOS

4.1. MUCORALES ISOLADOS DE SOLO DA RESERVA BIOLÓGICA DE SALTINHO E DA ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DE GUARDALUPE

Dos solos das fitofisionomias de Mata Atlântica, foram isoladas 23 espécies de Mucorales (Tabela 2), distribuídas entre *Absidia* Tiegh., *Backusella* Hesselt. & J.J. Ellis, *Cunninghamella* Matr., *Gongronella* Ribaldi, *Lichtheimia* Vuill., *Mucor* Fresen., *Rhizopus* Ehrenb. e *Syncephalastrum* J. Schröt. A área de floresta ombrófila densa apresentou um maior número de unidades formadoras de colônia de Mucorales por grama de solo ($55,4 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ de solo).

Tabela 2 - Número de unidades formadora de colônia por grama de solo (UFC.g⁻¹) de Mucorales nas áreas de floresta ombrófila densa, tabuleiro, restinga e mangue do solo da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe.

Espécie	ÁREAS			
	FOD	TAB	RES	MAN
<i>Absidia</i> sp.	0	$1,2 \times 10^3$	0	0
<i>Absidia cylindrospora</i> Hagem	$0,8 \times 10^3$	0	0	0
<i>Absidia pseudocylindrospora</i> Hesselt. & J.J. Ellis	$1,6 \times 10^3$	0	0	0
<i>Backusella constricta</i> D.X. Lima, de Souza & A.L. Santiago	$0,4 \times 10^3$	0	0	0
<i>Circinella simplex</i> Tiegh.	$0,8 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	0	0
<i>Cunninghamella bertholletiae</i> Stadel	$0,8 \times 10^3$	0	0	0
<i>C. blakesleeana</i> Lendn.	0	2×10^3	1×10^3	0
<i>C. echinulata</i> Thaxt.	$1,2 \times 10^3$	3×10^3	0	0
<i>C. elegans</i> Lendn.	$0,8 \times 10^3$	$6,2 \times 10^3$	0	0

<i>C. phaeospora</i> Boedijn	1,2 x 10 ³	0	0	0
<i>Gongronella brasiliensis</i> C.A. de Souza, D.X. Lima & A.L. Santiago	10,6 x 10 ³	0	1,4 x 10 ³	0
<i>G. butleri</i> Peyronel & Dal Vesco	17,8 x 10 ³	11,8 x 10 ³	15,8 x 10 ³	0
<i>Lichtheimia brasiliensis</i> A.L. Santiago, Lima & Oliveira	0	2,8 x 10 ³	0	0
<i>L. ramosa</i> Vuill.	0	1,6 x 10 ³	0	0
<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>lusitanicus</i> (Bruderl.) Schipper	0,8 x 10 ³	0	0	0
<i>M. hiemalis</i> Wehmer	1,8 x 10 ³	0	0	0
<i>M. indicus</i> Lendn.	1,4 x 10 ³	5,8 x 10 ³	0	0
<i>M. irregularis</i> Stchigel, Cano, Guarro & E. Álvarez	3,4 x 10 ³	0	0	0
<i>M. luteus</i> Linnem. ex Wrzosek	0	3,2 x 10 ³	0	0
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i> A. Fisch	1,8 x 10 ³	1,2 x 10 ³	3,2 x 10 ³	0
<i>R. microsporus</i> Tiegh	4 x 10 ³	6,6 x 10 ³	9,4 x 10 ³	0
<i>R. stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.	0,6 x 10 ³	0	2,6 x 10 ³	0,4 x 10 ³
<i>Syncephalastrum racemosum</i> Cohn ex J. Schröt	5,6 x 10 ³	4 x 10 ³	0,6 x 10 ³	1 x 10 ³
Total	55,4 x 10 ³ a	50,8 x 10 ³ a	34 x 10 ³ b	1,4 x 10 ³ c

FOD = floresta ombrófila densa; TAB = tabuleiro; RES = restinga; MAN= mangue. Os valores seguidos de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey (p = 0.05).

Dentre os isolados, *Gongronella butleri* pode ser considerada muito frequente (Fi = 16,6%) e com maior abundância relativa (AR = 2,4%) na floresta ombrófila densa, seguida por *G. brasiliensis* (Fi = 7,14% e AR = 1,44%), *R. microsporus* (Fi = 5,35% e AR = 0,54%) e *M. irregularis* (Fi = 5,35% e AR = 0,46%), sendo esses três últimos considerados frequentes nesse ecossistema. No tabuleiro, foram observados quatro táxons frequentes, *G. butleri* (Fi = 8,92% e AR = 1,76%), *C. elegans*, (Fi = 5,95% e AR = 0,92%), *M. indicus* (Fi = 5,95% e AR

= 0,86%) e *S. racemosum* (Fi = 5,95% e AR = 0,59%). *Rhizopus microsporus* foi muito frequente na restinga (Fi = 16,6% e AR = 1,93%), seguida de *G. butleri* (Fi = 5,35% e AR = 1,56%), considerada frequente. No manguezal apenas duas espécies foram isoladas, *R. stolonifer* (Fi = 1,19% e AR = 0,26%) e *S. racemosum* (Fi = 2,90% e AR = 0,66%), ambas infrequentes (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequência de ocorrência (Fi,%) e abundância relativa (AR, %) de Mucorales nas áreas de floresta ombrófila densa (FOD), tabuleiro (TAB), restinga (RES) e mangue (MAN) do solo da Reserva Biológica de Salinho e da APA de Guardalupe.

Espécie	ÁREAS							
	FOD		TAB		RES		MAN	
	Fi	AR	Fi	AR	Fi	AR	Fi	AR
<i>Absidia</i> sp.	0	0	2,97	0,17	0	0	0	0
<i>Absidia cylindrospora</i> Hagem	1,78	0,1	0	0	0	0	0	0
<i>Absidia pseudocylindrospora</i> Hesselt. & J.J. Ellis	1,78	0,21	0	0	0	0	0	0
<i>Backusella constricta</i> D.X. Lima, de Souza & A.L. Santiago	1,19	0,05	0	0	0	0	0	0
<i>Circinella simplex</i> Tiegh.	1,78	0,1	1,78	0,2	0	0	0	0
<i>Cunninghamella bertholletiae</i> Stadel	1,78	0,1	0	0	0	0	0	0
<i>C. blakesleeana</i> Lendn.	0	0	3,57	0,29	1,78	0,2	0	0
<i>C. echinulata</i> Thaxt.	1,19	0,16	4,76	0,44	0	0	0	0
<i>C. elegans</i> Lendn.	2,38	0,1	5,95	0,92	0	0	0	0
<i>C. phaeospora</i> Boedijn	3,57	0,16	0	0	0	0	0	0

<i>Gongronella brasiliensis</i> C.A. de Souza, D.X. Lima & A.L. Santiago	7,14	1,44	0	0	1,78	0,28	0	0
<i>G. butleri</i> Peyronel & Dal Vesco	16,66	2,4	8,92	1,76	5,35	1,56	0	0
<i>Lichtheimia brasiliensis</i> A.L. Santiago, Lima & Oliveira	0	0	2,97	0,41	0	0	0	0
<i>L. ramosa</i> Vuill.	0	0	4,16	0,23	0	0	0	0
<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>lusitanicus</i> (Bruderl.) Schipper	1,78	0,1	0	0	0	0	0	0
<i>M. hiemalis</i> Wehmer	1,73	0,24	0	0	0	0	0	0
<i>M. indicus</i> Lendn.	1,19	0,18	5,95	0,86	0	0	0	0
<i>M. irregularis</i> Stchigel, Cano, Guarro & E. Álvarez	5,35	0,46	0	0	0	0	0	0
<i>M. luteus</i> Linnem. ex Wrzosek	0	0	4,76	0,47	0	0	0	0
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i> A. Fisch	2,38	0,24	3,57	0,17	3,57	0,65	0	0
<i>R. microsporus</i> Tiegh	5,35	0,54	4,16	0,98	16,60	1,93	0	0
<i>R. stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.	1,19	0,08	0	0	2,97	0,53	1,19	0,26
<i>Syncephalastrum racemosum</i> Cohn ex J. Schröt	0	0	5,95	0,59	1,78	0,15	2,90	0,66

A diversidade e riqueza de Mucorales foram maiores no solo da área de floresta ombrófila densa ($H' = 2,249$; $S = 18$), seguida pelo tabuleiro ($H' = 2,322$; $S = 13$), restinga ($H' = 1,437$; $S = 7$) e mangue ($H' = 0,593$; $S = 2$). Entretanto, de acordo com a análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias pelo teste de Tukey ($p = 0,05$), houve diferenças significativas na riqueza e diversidade entre solos dos diferentes ecossistemas, exceto entre a floresta ombrófila densa e tabuleiro, com relação à diversidade (Tabela 4). A equitabilidade entre solos de todas as áreas foi similar, exceto no tabuleiro, que apresentou maior equitabilidade. O estimador Chao 1 indicou que a riqueza esperada foi alcançada em todas as áreas. No entanto, Jackknife 1 indicou que a riqueza poderia ter sido maior nas áreas de estudo (Figuras 6, 7, 8 e 9). Na floresta ombrófila e no mangue, os estimadores variam,

respectivamente, de 18 (Chao 1) a 21 espécies (Jackknife 1) e 2 (Chao 1) a 3 espécies (Jackknife 1), enquanto no tabuleiro e na restinga os estimadores exibiram valores semelhantes (Tabela 5).

Tabela 4 - Riqueza (S), índice de diversidade de Shannon Wiener (H'), equitabilidade de Pielou's e índice de Margalef das comunidades de Mucorales em áreas de floresta ombrófila densa (FOD), tabuleiro (TAB), restinga (RES) e mangue (MAN) da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe, PE.

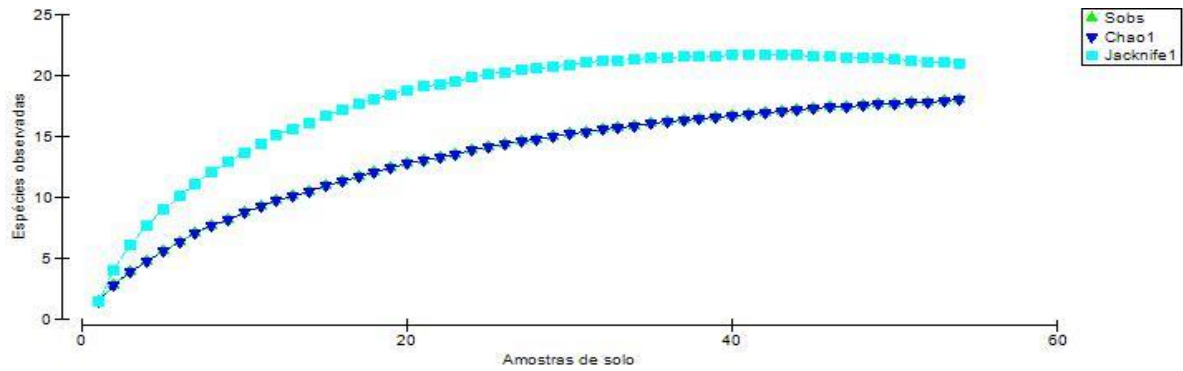
Áreas	S	H'	J'
FOD	18a	2,249a	0,7779b
TAB	13b	2,322a	0,9053a
RES	7c	1,437b	0,7384b
MAN	2d	0,5983c	0,8631b

Os valores seguidos de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey (p = 0.05).

Tabela 5 - Riqueza observada (Sobs) e riqueza estimada pelos estimadores Chao 1 e Jackknife 1 das comunidades de Mucorales em áreas de floresta ombrófila densa (FOD), tabuleiro (TAB), restinga (RES) e mangue (MAN) da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe.

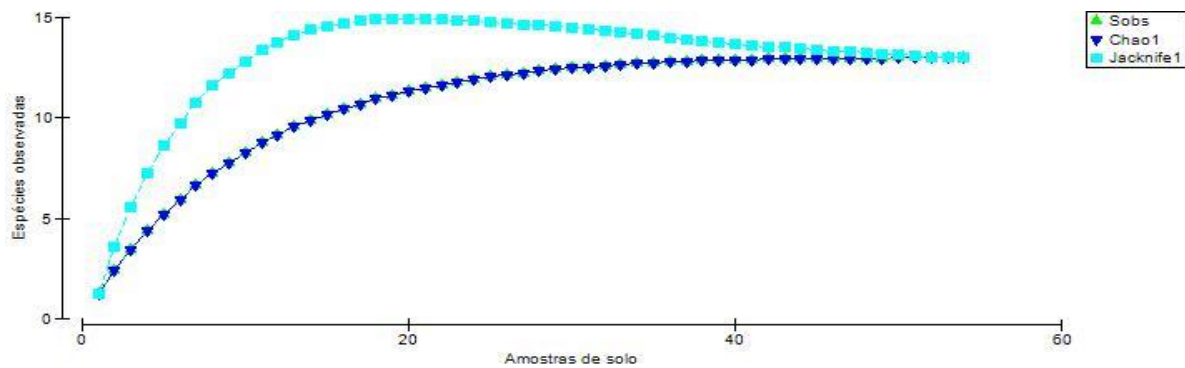
Áreas	Chao 1	Jackknife 1
FOD	18	20,946 (±2,96)
TAB	13	13
RES	7	7
MAN	2	2,9815 (±0,96)

Figura 6 - Estimadores de riqueza Chao 1 e Jacknife 1 de Mucorales na floresta ombrófila densa da Reserva Biológica de Saltinho



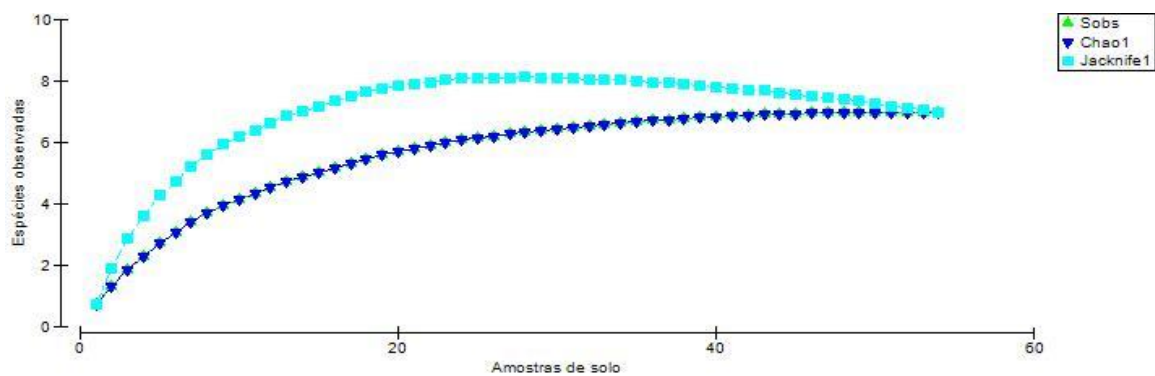
Fonte: Diogo Xavier Lima.

Figura 7 - Estimadores de riqueza Chao 1 e Jacknife 1 de Mucorales no tabuleiro da Reserva Biológica de Saltinho.



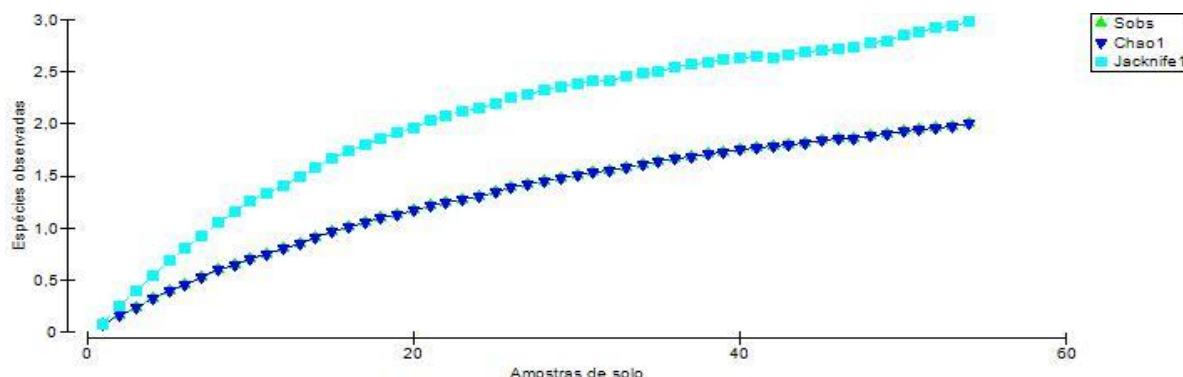
Fonte: Diogo Xavier Lima.

Figura 8 - Estimadores de riqueza Chao 1 e Jacknife 1 de Mucorales na restinga da Reserva Biológica de Saltinho.



Fonte: Diogo Xavier Lima.

Figura 9 - Estimadores de riqueza Chao 1 e Jacknife 1 de Mucorales no mangue da Reserva Biológica de Saltinho.



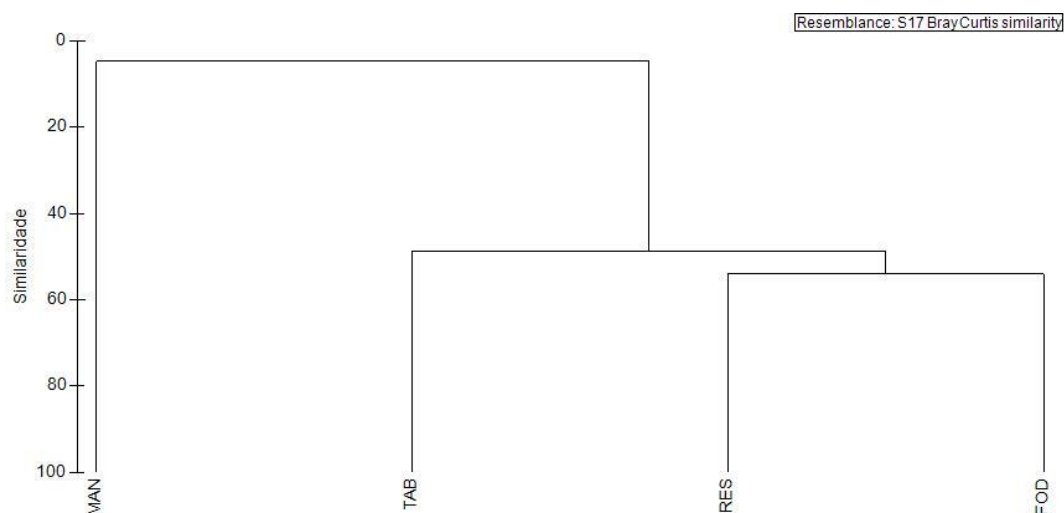
Fonte: Diogo Xavier Lima.

A similaridade da comunidade dos Mucorales foi maior entre as áreas de floresta ombrófila densa e restinga (54,13%), seguida pelas áreas de restinga e tabuleiro (50%), e floresta ombrófila densa e tabuleiro (47,45%). A comunidade do mangue mostrou baixa similaridade com todas áreas (Tabela 6, Figura 10). Entretanto, de acordo com a análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias pelo teste de Tukey ($p = 0,05$), as comunidades da restinga e tabuleiro não diferem entre si (Tabela 7).

Tabela 6 - Análise de similaridade de Bray-Curtis da composição de Mucorales entre as áreas de floresta ombrófila densa (FOD), tabuleiro (TAB), restinga (RES) e mangue (MAN) da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe.

Áreas	FOD	TAB	RES	MAN
FOD	-	-	-	-
TAB	47,45%	-	-	-
RES	54,13%	50,00%	-	-
MAN	4,92%	3,83%	5,64%	-

Figura 10 - Dendrograma de Similaridade de Bray-Curtis entre as áreas de floresta ombrófila densa (FOD), tabuleiro (TAB), restinga (RES) e mangue (MAN) da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe.



Fonte: Diogo Xavier Lima.

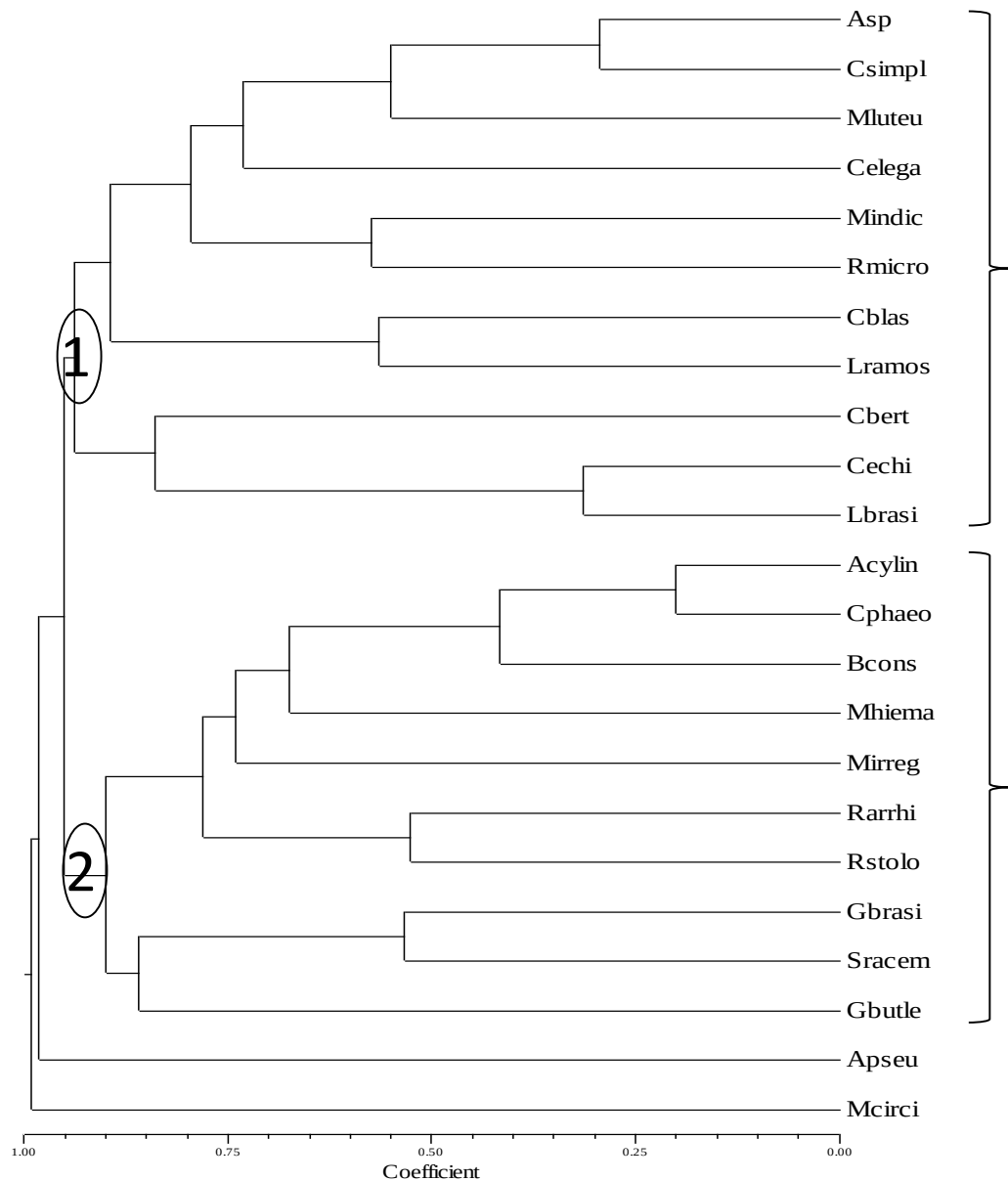
Tabela 7- Análise de variância entre as comunidades de Mucorales entre as áreas de floresta ombrófila densa (FOD), tabuleiro (TAB), restinga (RES) e mangue (MAN) da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe. ANOVA: $F(3, 24) = 103.6$; $p > 0.001$ Tukey.

Áreas	TUKEY Pos-hoc
FOD-MAN	0.0000001
RES-MAN	0.0000025
TAB-MAN	0.0000034
RES-FOD	0.0000000
TAB-FOD	0.0000000
TAB-RES	0.9992235

Os valores de $p > 0.001$ são estatisticamente similares.

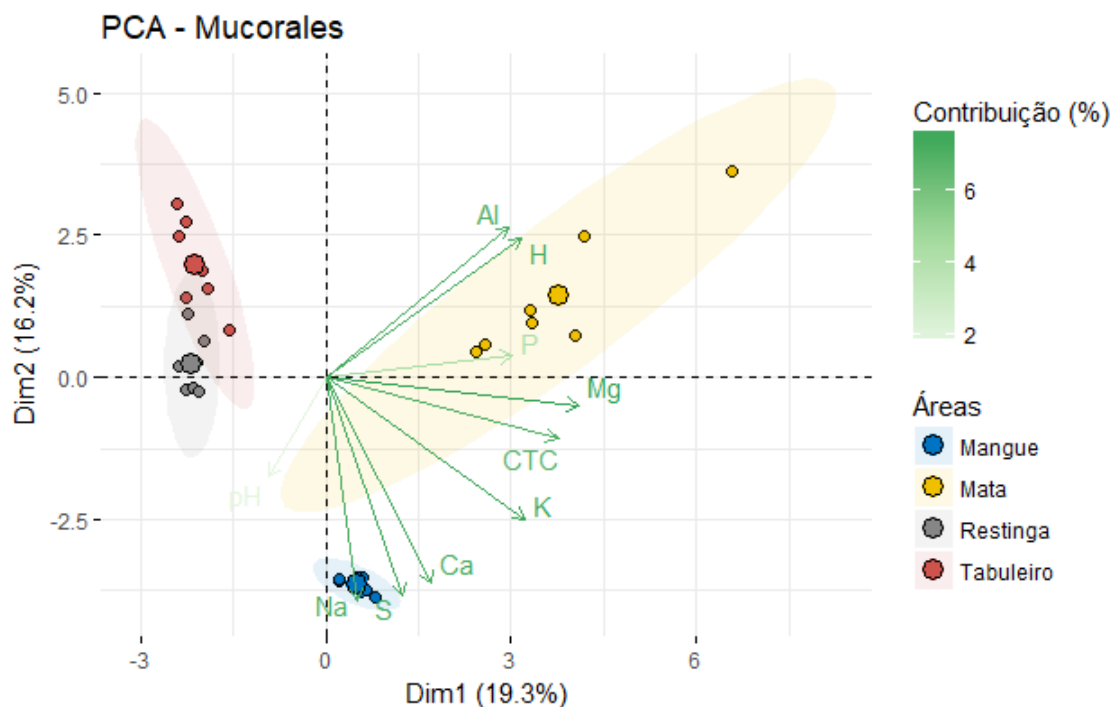
Através do ANOSIM (análise de silimlaridade) baseado na distância de Bray Curtis, foi gerado um dendrograma da relação entre as espécies de Mucorales do solo das áreas, que resultou na formação de três grupos distintos (Figura 11). Análise de componente principal (PCA) revelou que a porcentagem de explicação dos componentes foi baixa. No total, 35.5% da variação pode ser explicada pelas duas primeiras dimensões. Com isso, as porcentagens de contribuição dos atributos físico químicos do solo variam entre 7% e 8% (Figura 12).

Figura 11 - Dendrograma de proximidade entre as espécies de Mucorales dos ecossistemas da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe. Análise estatística baseada no índice Bray-Curtis; Método de ligação ponderal proporcional (WPGM: Método de Grupo Ponderado-bGroup; Média Aritmética). Análise coperetica: $R_f = 0,8$. Asp: *Absidia* sp; Csimpl: *C.simplex* (*M.circinatus*); Mluteu: *M. luteus*; Celega: *C.elegans*; Mindic: *M. indicus*; Rmicro: *R. microsporus*; Cblas: *C. blaskeneana*; Lramos: *L. ramosa*; Cbert: *C. bertholletiae*; Cechi: *C. echinulata*; Lbrasi: *L. brasiliensis*; Acylin: *A. cylindrospora*; Cphaeo: *C. phaeospora*; Bcons: *B. constricta*; Mhiema: *M. hiemalis*; Mirreg: *M. irregularis*; Rarrhi: *R. arrhizus*; Rstolo: *R. stolonifer*; Gbrasi: *G. brasiliensis*; Sracem: *S. racemosum*; Gbutle: *G. butleri*; Apseu: *A. pseudocylindrospora*; Mcirci: *M. circinelloides* f. *lusitanicus*.



Fonte: Diogo Xavier Lima.

Figura 12 - Projeção bidimensional da Análise de Componentes Principais de amostras do solo de áreas dos ecossistemas da Reserva Biológica de Saltinho e da APA de Guardalupe.



Fonte: Diogo Xavier Lima.

4.2. MUCORALES ISOLADOS DE SOLO DA RESERVA ECOLÓGICA DOIS IRMÃOS

Do solo da Reserva Ecológica Dois Irmãos foram obtidas $25,4 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ de solo e isoladas nove espécies de Mucorales: *Absidia cylindrospora* var. *cylindrospora*, *Backusella constricta*, *Circinella simplex*, *Cunninghamella phaeospora*, *Gongronella butleri*, *Mucor hiemalis*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, *R. microsporus* e *Syncephalastrum racemosum* (Figura 13). *Gongronella butleri* exibiu o maior número de UFC.g⁻¹ de solo ($11,8 \times 10^3$), seguida por *A. cylindrospora* var. *cylindrospora* (4×10^3) (Tabela 8).

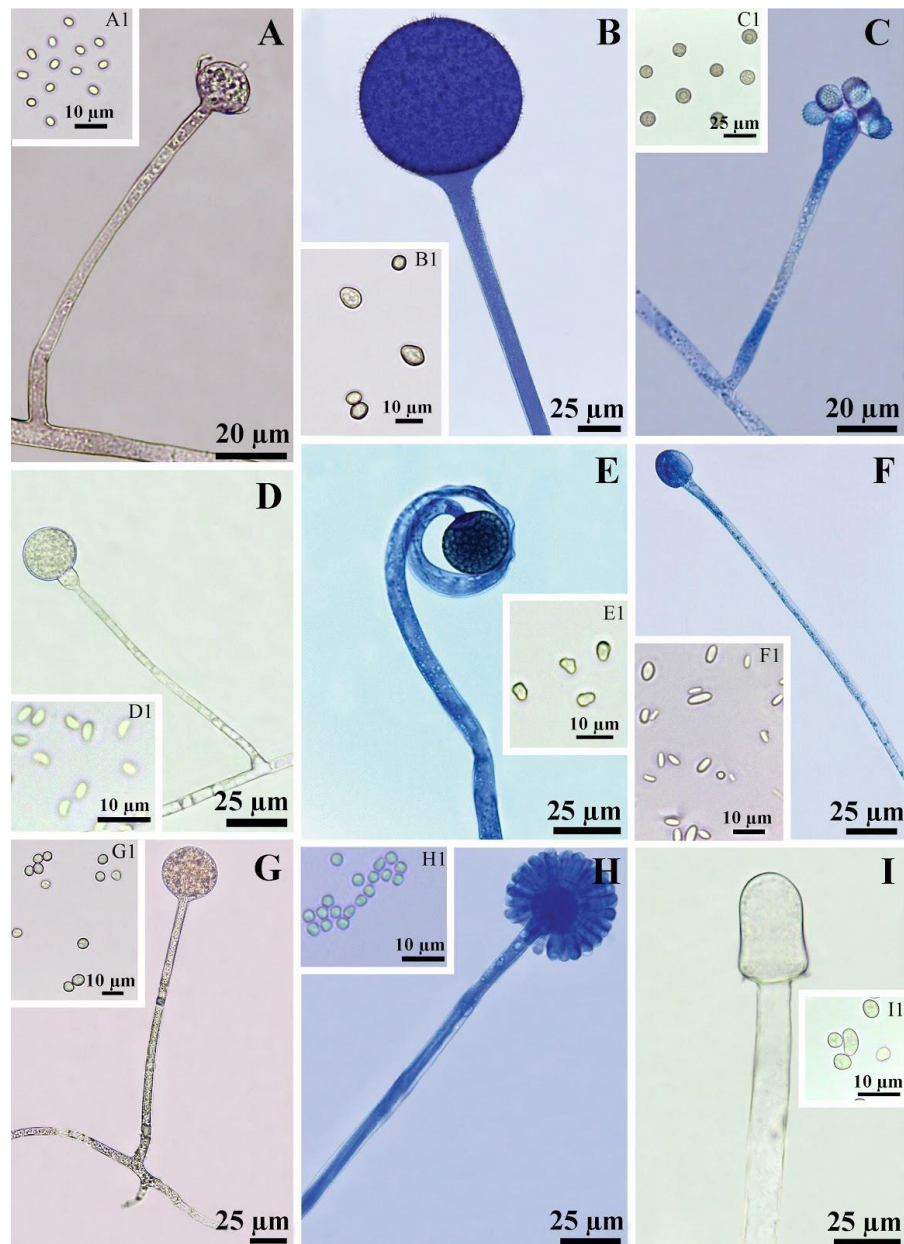
Dentre as espécies isoladas, *G. butleri* e *A. cylindrospora* foram consideradas muito frequentes (Fi = 28,12 e 10,41%, respectivamente), enquanto *Circinella simplex* foi frequente (6,24 %). As demais espécies foram consideradas infrequentes (Tabela 8). Todos os táxons isolados demonstraram baixa abundância relativa, com menos de 1%, exceto *G. butleri* que exibiu a maior abundância relativa AR (1,67%), comparada com as outras espécies (Tabela 8).

A diversidade de Mucorales estimada no solo da Reserva ecológica Dois Irmãos foi: $H=1.691$, e os estimadores (Chao 1 = 9; Jackknife 1 = 9,062; Figura 14) confirmaram que a riqueza esperada foi alcançada.

Tabela 8 - Número de unidades formadora de colônia por grama de solo (UFC.g⁻¹), frequência de ocorrência (Fi %) e abundância relativa (AR %) de Mucorales nas amostras de solo da Reserva Ecológica Dois Irmãos.

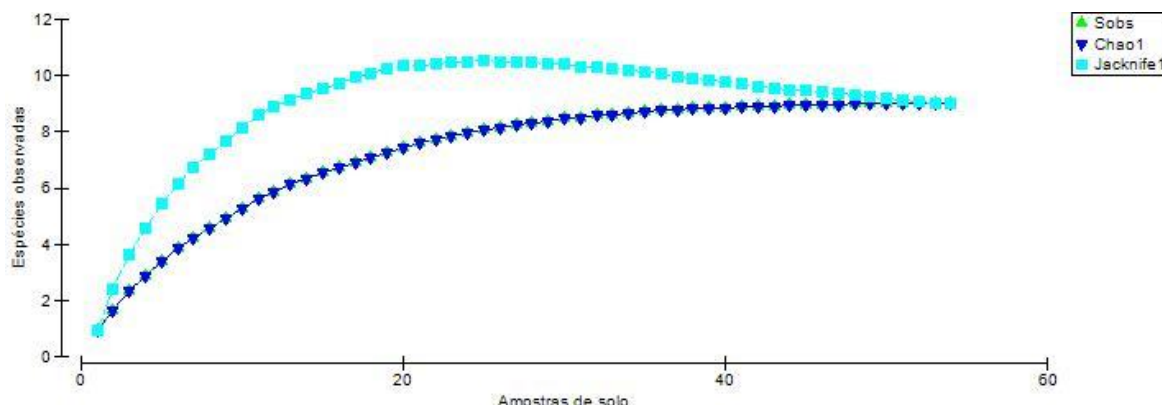
Espécies	UFC.g ⁻¹	Fi	AR
<i>Absidia cylindrospora</i> var. <i>cylindrospora</i> Hagem	4,0 x 10 ³	10,41	0,56
<i>Backusella constricta</i> D.X. Lima, C.A. de Souza, C.M. Souza-Motta & A.L. Santiago.	1,0 x 10 ³	3,12	0,14
<i>Circinella simplex</i> van Tieghem	2,4 x 10 ³	6,25	0,33
<i>Cunninghamella phaeospora</i> Boedijn	2,4 x 10 ³	4,16	0,33
<i>Gongronella butleri</i> (Lendn.) Peyronel & Dal Vesco	11,8 x 10 ³	28,12	1,67
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	1,8 x 10 ³	4,16	0,25
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i> A. Fisch.	0,4 x 10 ³	2,08	0,05
<i>R. microsporus</i> Tiegh.	0,8 x 10 ³	3,12	0,11
<i>Syncephalastrum racemosum</i> Cohn ex J. Schröt.	0,8 x 10 ³	3,12	0,11
Total	25,4 x 10³	-	-

Figura 13 - *Absidia cylindrospora* var. *cylindrospora*: A. esporangióforo simples com columela e projeção apical; A1. esporangiosporos. *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*: B. esporangióforo simples com esporângio; B1 - esporangiosporos. *Cunninghamella phaeospora*: C. esporangióforo simples com esporangiolo; C1. esporangiolo. *Gongronella butleri*: D. esporangióforo simples com esporângio apofisado; D1. esporangiosporos. *Circinella simplex*: E. esporangióforo circinado com esporângio; E1. esporangiosporos. *Mucor hiemalis*: F. esporangióforo simples com columela; F1. esporangiosporos. *Rhizopus microsporus*: G. esporangióforo simples com columela e rizóides; G1. esporangiosporos. *Synccephalastrum racemosum*: H. merosporangióforo simples com merosporângio; H1 - merosporangiosporos. *Backusella constricta*: I. esporangióforo simples com columela apresentando uma constricção central; I1. Esporangiosporos



Fonte: Diogo Xavier Lima.

Figura 14 - Estimador de riqueza Chao 1 da área de Mata Atlântica do Parque Horto dos Dois Irmãos.



Fonte: Diogo Xavier Lima.

4.3. TAXONOMIA

4.3.1. *Absidia* sp. nov.

Holótipo: URM7219

Colônias brancas tornando-se cinzas escuras (MP 16B6), cobrindo a placa de Petri (9 cm diam.) em 5 dias e tocando a tampa da placa (1,5 cm alt.) em alguns pontos; reverso creme (MP 12H3). Sem odor; esporangióforos (65) 85–220 (240) × 2.5–5 µm, eretos, lisos e hialinos, crescendo em estolões ou na porção final deles, geralmente em verticilos de 2 a 5 (6), frequentemente com um septo abaixo do esporângio. Estolões lisos, hialinos, com até 5–10 µm de diâm. Rizoides pouco ramificados, crescendo em uma única direção, tipo vassoura. Esporângios subglobosos a piriformes, 25–35 diâm., apresentando apófise em forma de funil ou de sino, com parede lisa; Columelas em maioria subglobosas, algumas ovóides, 15–20 µm diâm, lisas ou com até duas projeções na parte central, podendo apresentar colar; projeção solitária presente geralmente nas columelas subglobosas, 3.5–6.5 × 1.2–2.5 µm, e projeções duplas geralmente nas columelas ovóides, 3–5. × 1.5–2 µm. Esporangiosporos cilíndricos e alguns levemente cuneiformes 3.5–5 × 1.5–2.5 µm. Clamidosporos ausentes. Zigosporos não observados. Provavelmente heterotática.

Habitat: Solo.

Distribuição: Tamandaré, Pernambuco (Brasil).

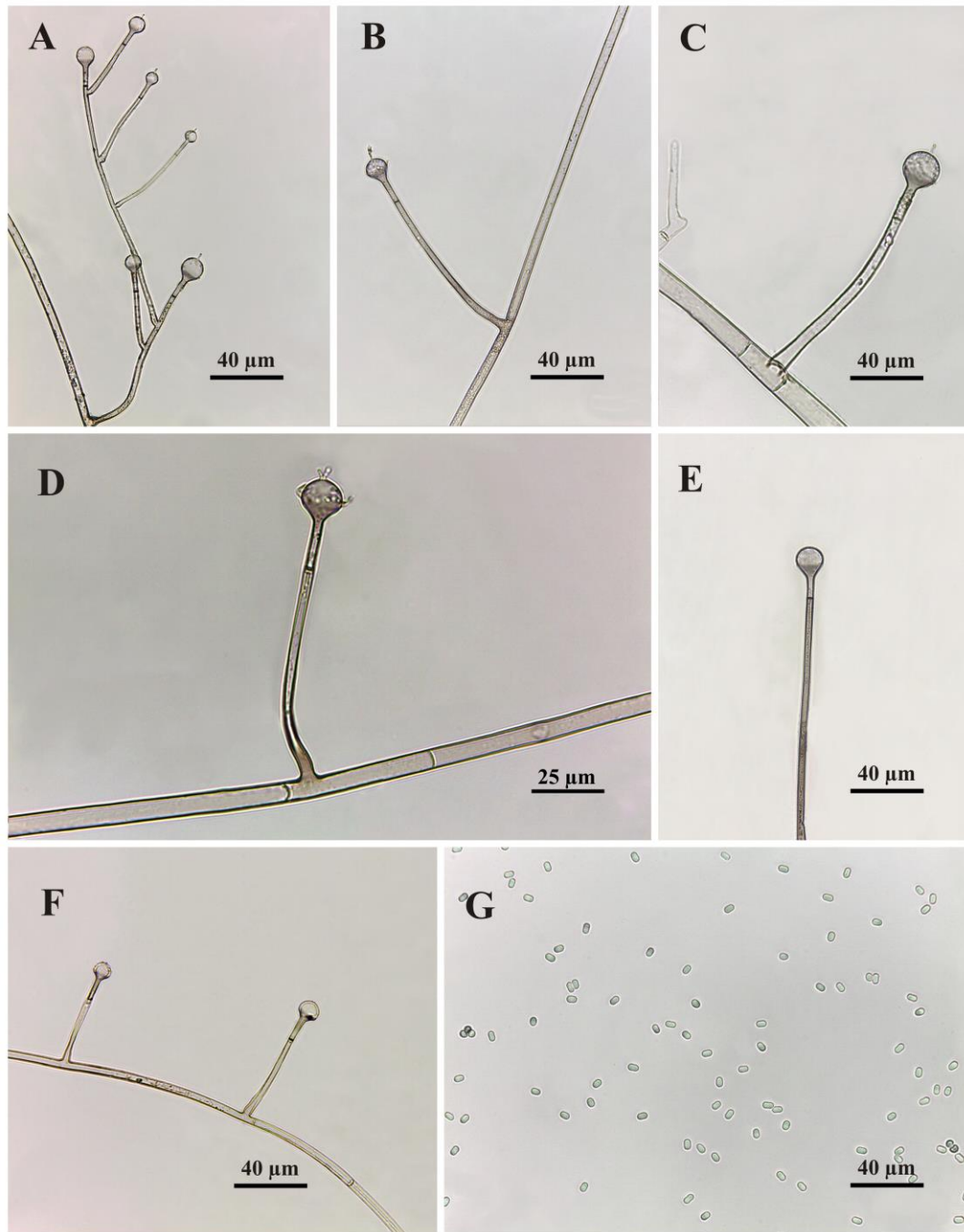
Notas: *Absidia* sp. nov difere das outras espécies do gênero por apresentar frequentemente columelas com duas projeções apicais e também por produzir esporangiosporos cilíndricos e cuneiformes.

Material examinado: Brasil. Pernambuco: Recife, Reserva Biológica de Saltinho (8°43'09"S 8°44'13"S), em amostras de solo. (10 Jul 2016) D.X. Lima. Holótipo (URM 7219).

Meios de cultura, testes de temperatura e testes de cruzamento: Em AEM. A 15 °C – crescimento lento (4,7 cm em 192 horas) e boa esporulação. A 20 °C – melhor crescimento que a 15 °C (7,9 cm em 96 horas) e boa esporulação. A 25 °C – bom crescimento (9 cm em 96 horas) e excelente esporulação. A 30 °C – crescimento mais lento que a 25 °C (9 cm em 120 horas) e boa esporulação. A 35 °C – ausência de crescimento e esporulação. Em 25 e 30 °C o crescimento de *Absidia* sp. nov em BDA foi um pouco mais lento do que em AEM, com baixa esporulação em todas as temperaturas. A influência da luz não foi detectada.

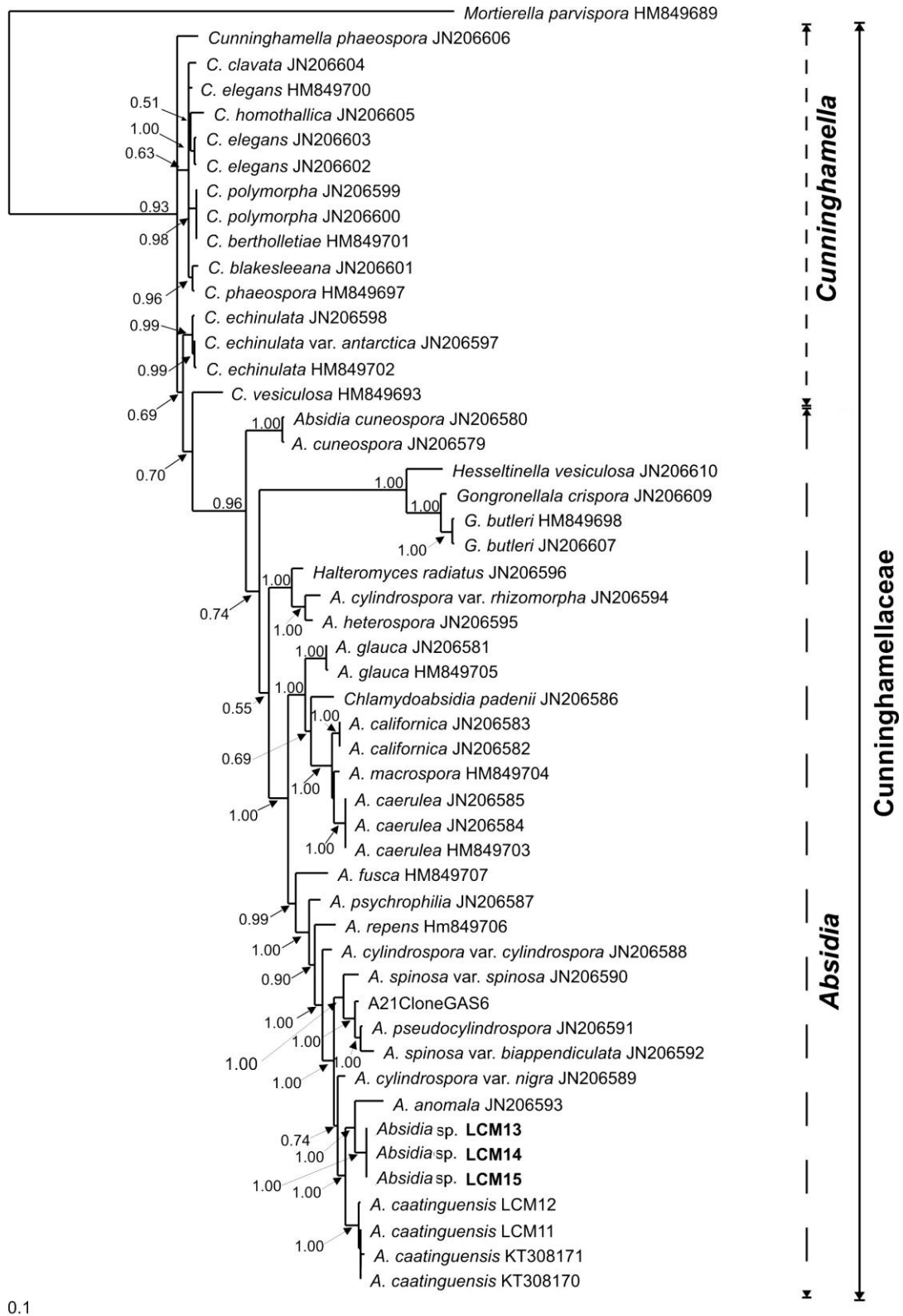
As análises com a região LSU do rDNA demonstraram que as espécies do gênero *Absidia* estão dentro da família Cunninghamellaceae, composta por espécies mesofílicas (Figura 15). Nossas análises filogenéticas mostram que *Absidia* sp. difere geneticamente das outras dentro de *Absidia*, sendo, portanto, nova.

Figura 15 - *Absidia* sp nov. (holótipo URM 7219). A. esporangióforo ramificado; B,C. esporangióforo simples exibindo uma projeção na columela; D. esporangióforo simples com duas projeções na columela; E. esporangióforo simples sem projeção; F. esporangióforo simples em estolão; G. esporangiósporos cilíndricos e cuneiformes.



Fonte: Diogo Xavier Lima.

Figura 16 - Árvore filogenética da família Cunninghamellaceae gerada a partir de seqüências da região LSU do rDNA. Valores de suporte são de análise bayesiana. Os isolados utilizados estão em negrito. *Mortierella parvispora* foi utilizado como outgroup.



0.1

Fonte: Diogo Xavier Lima.

4.3.2. *Backusella constricta* sp. nov.

Backusella constricta D.X. Lima, C.A. de Souza, C.M. Souza-Motta & A.L. Santiago sp. nov.

Figura 17

Index fungorum number: IF551655;

Holótipo: URM7323

Colônias inicialmente brancas, tornando-se amarelo pálidas (MP 111B), alcançando 9,4 cm in diâm. e 9 mm em altura após três dias em MEA a 25 °C. Reverso amarelo (MP 102L). Esporangióforos até 15 µm em diâm., eretos ou levemente recurvados, ocasionalmente simpodialmente ramificados, com ramos recurvados, hialinos para amarelados, com ou sem pigmento amarelo. Esporângios amarelos para amarronzados, globosos; parede com aspecto vítreo e deliquescente, levemente espinulada, 50–100 µm em diâm. Columelas usualmente cônicas, ocasionalmente cilíndricas, algumas levemente ou fortemente constrictas no centro, 17.5–45.5 × 17.5–35 µm; parede lisa, com pigmento amarelado. Esporangíolos multi-esporados, globosos para subglobosos, produzidos em esporangióforos simples ou simpodialmente ramificados, 20–32 µm diâm.; parede persistente, espinulosa e hialina, contendo 2–8 esporos. Columelas dos esporangíolos subglobosas e cônicas, algumas levemente constrictas no centro com até 15 µm diâm. Esporangíolos uni-esporados, globosos a levemente achatados, minuciosamente espinulados com até 17 µm diâm. Colar pequeno e incomum. Esporangiosporos subglobosos à elipsoides, alguns levemente irregulares, com pigmento amarelo e parede lisa, 7.5–15 × 5.5–10 µm em diâm. Clamidosporos e zigospórangios não observados. Provavelmente heterotática.

Etimologia: *constricta*. Referindo-se à forma da columela.

Habitat: solo.

Distribuição: América do Sul (Brasil).

Notas: *Backusella grandis*, *B. indica*, *B. oblongielliptica*, *B. recurva*, *B. tuberculispora* e *B. variabilis* também podem apresentar columela cônica, mas nunca com uma constrição central. Espécimes dessas espécies produzem esporangiosporos elípticos, diferindo dos produzidos por *B. constricta*. Semelhante à *B. constricta*, *B. circina* e *B. lamprospora* também produzem esporangiosporos subglobosos, mas columelas cônicas não são observadas nas duas últimas espécies.

Material examinado: Brasil. Pernambuco: Recife, Reserva Ecologica Dois Irmãos (8°31'55.8"S 37°15'34.2"W), em amostras de solo. (10 Jul 2013) D.X. Lima. Holótipo (URM7323). Um ex-tipo foi depositado como JMRC:SF:12310 na Jena Microbial Resource Collection (JMRC at the Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Jena, Alemanha).

Meios de cultura, testes de temperatura e testes de cruzamento: Em AEM. A 15 °C – crescimento lento (5 cm em 120 horas) e boa esporulação. A 20 °C – melhor crescimento que a 15 °C (7 cm em 120 horas) e boa esporulação. A 25 °C – bom crescimento (9 cm em 96 horas) e boa esporulação. A 30 °C – crescimento mais lento que a 25 °C (9 cm em 120 horas) e boa esporulação. A 35 °C – crescimento e esporulação restritos. A 40 °C – sem crescimento. A 25 e 30 °C o crescimento de *B. constricta* em BDA foi um pouco mais lento do que em AEM, com baixa esporulação a 30 °C. A influência da luz não foi detectada. A 15 °C, em BDA, alguns esporos mostraram-se mais largos (até 20 × 12,5 µm) do que em outras temperaturas, especialmente os irregulares em forma. A influência da luz não foi detectada.

A análise filogenética dos conjuntos de dados das sequências ITS e LSU rDNA mostrou que *Backusella constricta* sp. nov. forma um clado distinto de outras espécies de *Backusella* (Figuras 19 e 20). Análises filogenéticas com base em dados concatenados das duas regiões sequenciadas também confirmaram a distinção de *B. constricta* (Figura 21). A comparação das sequências LSU pelo BLASTn mostrou que as espécies relacionadas mais próximas à *B. constricta* são *B. indica* (JN206526) e *B. grandis* (como *M. grandis*) (JN206527), com 99% de similaridade, *B. variabilis* (JN206528) e *B. circina* (JN206529), com 98% de similaridade. Na comparação da sequência ITS, pelo BLASTn, as espécies com maior similaridade com *B. constricta* foram *B. grandis* (JN206252), com 91% e *B. indica* (JN206255), com 90% de similaridade. As outras sequências mostraram-se com identidade máxima inferior a 86% (ex: *B. circina* NR_103649 e *B. variabilis* JN206253). Sequências de *B. constricta* foram similares à *B. lamprospora* (JN206271), *B. oblongispora* (JN206251) e *B. oblongielliptica* (JN206278) apenas em relação à região 5.8S, com 95, 94 e 91% de similaridade, respectivamente.

Figura 17 - *Backusella constricta* (URM 7323) A. Aspecto da colônia; B, C. esporângio com esporangiósporo; D, E, F. esporangióforos com columela; G. esporângio multi-esporado; H: esporângio uni-esporado; I. Esporangiosporos.



Fonte: Diogo Xavier Lima.

Figura 18 - Árvore filogenética de Backusellaceae construída utilizando sequências da região ITS do rDNA. *Rhizopus microsporus* foi utilizado como grupo externo. Sequências são rotuladas com os seus números de acesso no Genbank. Valores de suporte são das análises de interferência Bayesiana e verossemelhança (valores acima e abaixo dos ramos, respectivamente). As sequências obtidas neste estudo são indicadas em negrito. Sequências derivadas a partir de linhagens ex tipo são indicados por ^T.



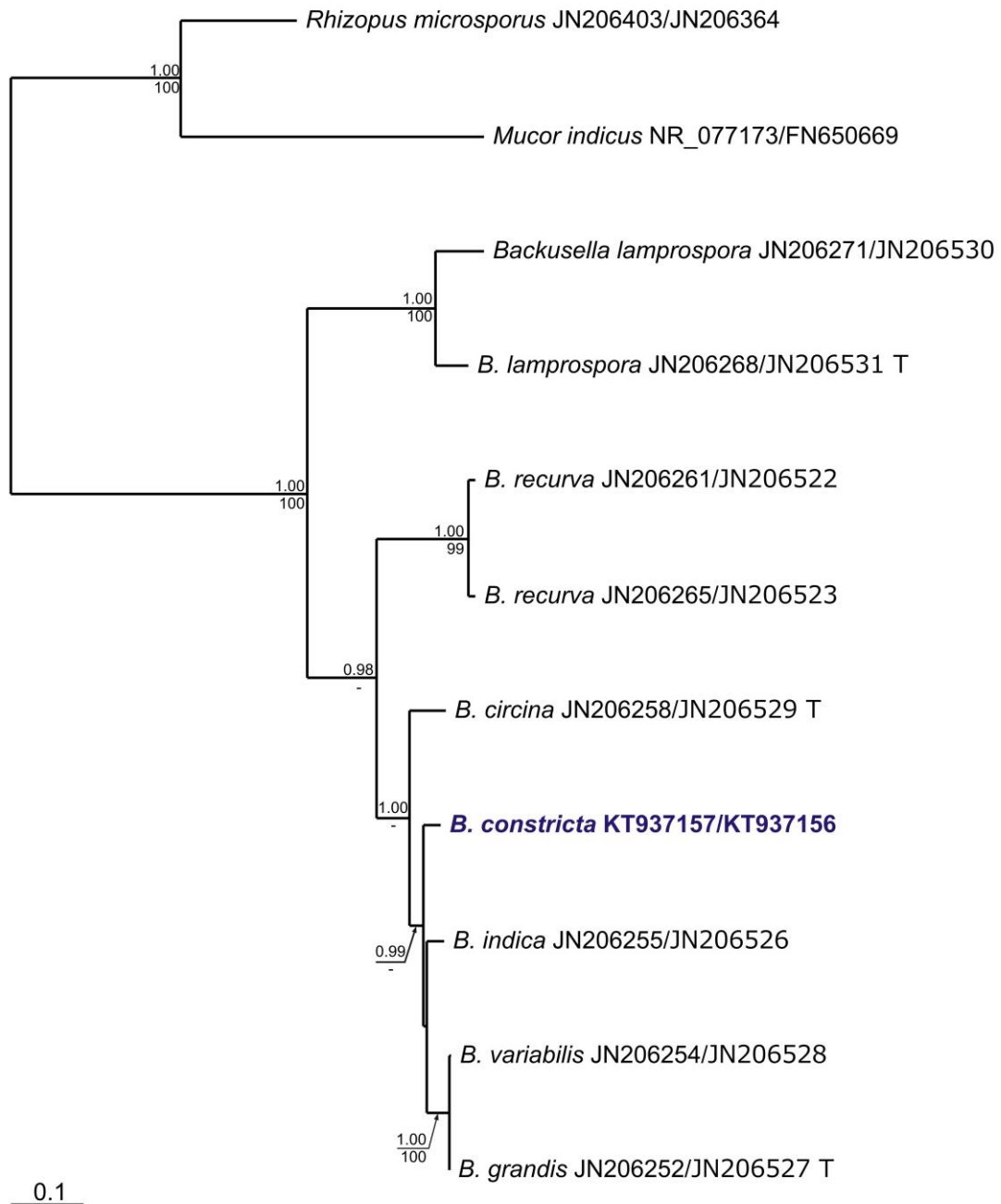
Fonte: Diogo Xavier Lima.

Figura 19 - Árvore filogenética de Backusellaceae construída utilizando sequências da região LSU rDNA. *Mortierella longicollis*, *Rhizopus microsporus*, *Mucor indicus*, *Pilobolus umbonatus* e *Actinomucor elegans* foram utilizados como grupo externo. Sequências são rotuladas com os respectivos números de acesso no Genbank. Valores de suporte são das análises de interferência Bayesiana e verossemelhança (valores acima e abaixo dos ramos, respectivamente). As sequências obtidas neste estudo são indicadas em negrito. Sequências derivadas a partir de linhagens ex tipo são indicados por ^T.



Fonte: Diogo Xavier Lima.

Figura 20 - Árvore filogenética de Backusellaceae construída utilizando sequências das regiões ITS e (LSU) do rDNA. *Rhizopus microsporus* e *Mucor indicus* foram utilizados como grupo externo. Sequências são rotuladas com os respectivos números de acesso no Genbank. Valores de suporte são das análises de interferência Bayesiana e máxima verossemelhança (valores acima e abaixo dos ramos, respectivamente). As sequências obtidas neste estudo são indicadas em negrito. Sequências derivadas a partir de linhagens ex tipo são indicados por ^T.



Fonte: Diogo Xavier Lima.

4.3.3. *Mucor circinatus* sp. nov.

Mucor circinatus D.X. Lima, G.Walther & A.L. Santiago, sp. nov.

Figura 22

Index fungorum number: IF551671;

Holótipo: URM 7218

Colônias inicialmente brancas, tornando-se marrons amareladas (MP 13D1), cobrindo a placa Petri (9cm in diâm. e 0,5 cm em altura) após quatro dias em AEM a 25 °C. Reverso creme (MP 13K3). Sem odor. Esporangióforos recurvados, simpodialmente ramificados, 2.5–12.5 (–18) µm diâm., hialinos, com parede levemente rugosa, crescendo diretamente do substrato, usualmente com um septo abaixo do esporângio; ramificações simpodiais circinadas frequentemente surgindo na curvatura do ramo anterior próximo ao septo. Esporângios inicialmente amarelos, tornando-se marrons, globosos e com parede lisa, não deliquescente, levemente persistente, (17.5–) 20 × 36 (–56) µm em diâm. Columelas hialinas, com parede lisa, frequentemente globosas para aplanadas (12.5–) 17.5 × 30 (–43) µm diâm. Colar evidente. Esporangiosporos angulares (3.8–) 5 × 6.2 (–7.5) µm, hialinos, com parede lisa. Filamentos como rizoides observados. Clamidosporos em forma de barril para cilíndricos. Zigosporângios não observados. Provavelmente heterotática.

Etimologia: *circinatus*. Referindo se à ramificação circinada dos esporangióforos.

Habitat: solo.

Distribuição: Brasil (ZYCHA, 1935; SCHOENLEIN-CRUSIUS et al., 2006; DE SOUZA et al., 2011), Colômbia (GUALDRÓN-ARENAS et al., 1997) e Sri Lanka (PERIES et al., 1979).

Notas: *Mucor circinatus* difere das outras espécies de *Mucor* pela produção concomitante de ramificações circinadas e esporangiosporos angulares. A cultura descrita por Hesseltine & Fennel (1955), como *Circinella simplex*, é, de fato, *M. circinatus*.

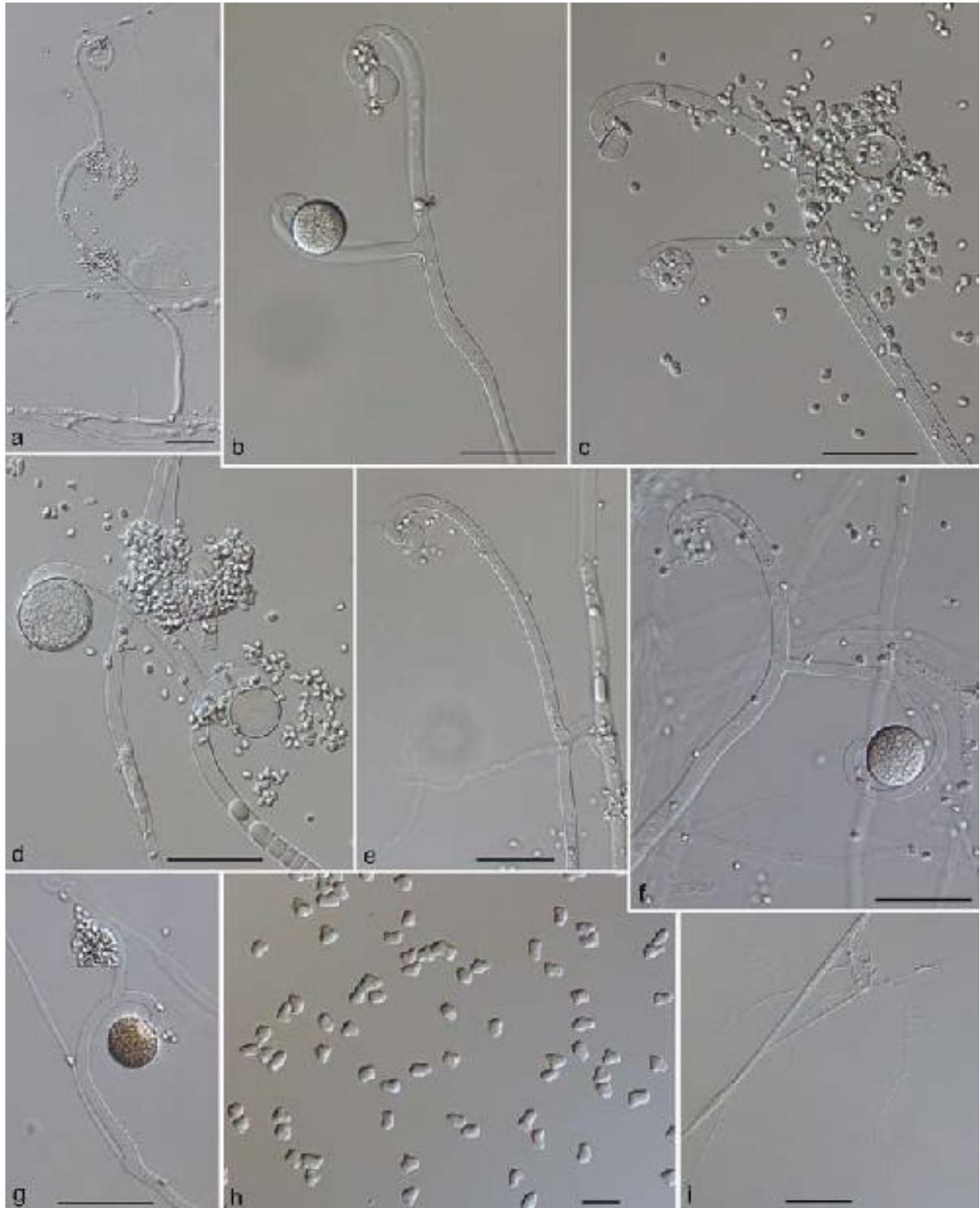
Material examinado: Brazil, Pernambuco: Tamandaré, Reserva Biológica de Saltinho (8°43'09"S 35°10'11"W), solo., 2013, D.X. Lima. Holótipo (URM 90063). Uma cultura ex-tipo foi depositada como JMRC:SF: 012298 na Jena Microbial Resource Collection (JMRC at the Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Jena, Germany).

Outros espécimes examinados: CBS 142.35, CBS 284.92, CBS 428.80, CBS 540.80, CBS 548.89.

Meios, testes de temperatura e testes de cruzamento: crescimento reduzido (5.3 cm em 9 dias) e pouca esporulação a 12°C; a 15 °C – crescimento lento (5 cm em 5 dias) e boa esporulação. A 20 °C – melhor crescimento que a 15 °C (7 cm em 5 dias); a 25°C boa esporulação e crescimento ótimo (9 cm em 4 dias); temperatura máxima de crescimento a 30°C; crescimento similar nos meios BDA e AEM em todas as temperaturas, testadas com discreta melhora na esporulação em AEM. A influência da luz não foi detectada.

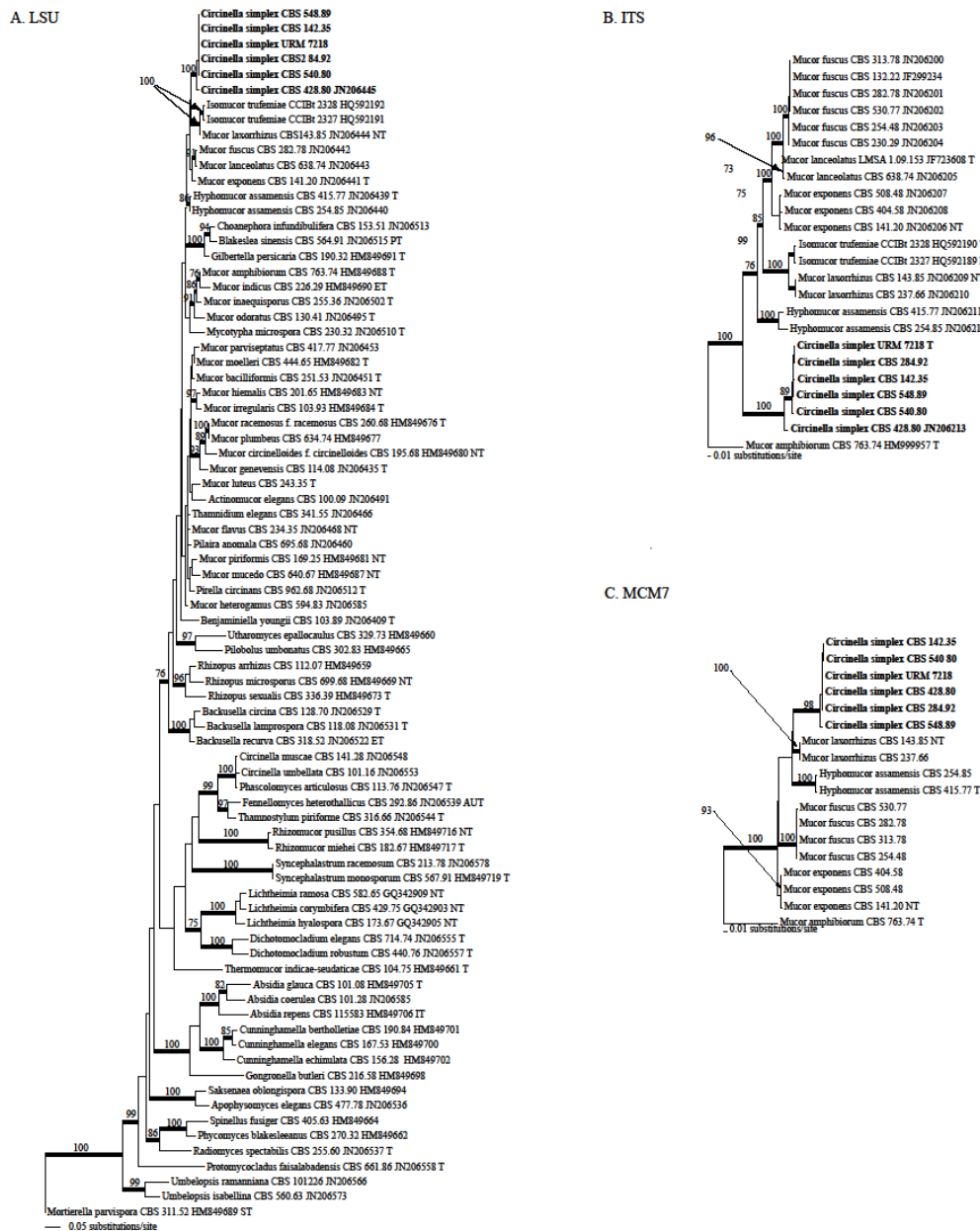
A análise filogenética do conjunto de dados das sequências das regiões ITS e LSU do rDNA, bem como do gene MCM7 (Figura 23), mostrou que nosso isolado formou um clado monofilético com todos os outros isolados da CBS de *C. simplex*, incluindo CBS 142.35 (= NRRL 2407), descrito como *C. simplex* por Hesseltine & Fennell (1955).

Figura 21 - *Mucor circinatus* (URM 7218). A – G. esporangióforos circinados; H. esporangiosporos angulares; I. Filamentos semelhantes à rizóides. Escala: a – g, i = 50 μ m, h = 10 μ m.



Fonte: Diogo Xavier Lima.

Figura 22 - Árvores filogenéticas de espécies de Mucorales baseadas em três diferentes marcadores. A. árvore baseada na região D1/D2 do LSU. B. árvore baseada na região ITS. C. árvore baseada no gene MCM7. Ramos com valores de bootstrap de 75 % ou maior são destacados em negrito. Culturas ex-tipo são designadas por: T = ex-tipo, ET = ex-epítipo, IT = ex-isotipo strain, NT = ex-neotipo, PT = ex-paratipo, ST = ex-sintipo, e AUT = material autêntico.



Fonte: Diogo Xavier Lima.

4.3.4. *Mucor irregularis*

Mucor irregularis Stchigel, Cano, Guarro & Ed. Álvarez

Colônias inicialmente brancas, tornando-se amarelas para creme (MP 19D1), alcançando 9,4 cm in diâm. e 9 mm em altura após quatro dias em MEA a 25 °C. Reverso amarelo (MP 11J6). Esporangióforos eretos, simpodialmente e monopodialmente ramificados, surgindo de hifas aéreas, (3–) 5–15.5 (–26.5) µm diâm., hialinos. Esporângios globosos para subglobosos, (16–) 28–40 (–50) µm diâm., marrons para acizentados, com parede deliquescente. Columelas globosas 12.5–26.5 µm diâm., ou elipsoidais para cilíndricas, 30–33.5 × 22–30 µm, raramente cônicas 25–40 × 20–35 µm, algumas variadas em forma, amarronzadas, de parede lisa; colar pouco evidente. Esporangiosporos hialinos, de parede lisa, maioria elipsóides 2.5–11 × 2–4.8 (–10) µm, subesféricos para ovóides, 3.7–9.5 × 2.5–7 µm ou globosos, 2.5–9.5 µm diâm., alguns irregulares em tamanho e forma, até 12 µm diâm. Rizoides, clamidosporos e oídios observados. Zigosporângios não visualizados. Provavelmente heterotática.

Habitat: solo.

Distribuição: Pernambuco, Brasil, Austrália (RIBEIRO et al., 2010), China (ZHENG & CHEN, 1991; LU et al., 2009; ZHAO et al., 2009; LI & LUN, 2012), Japão (TOMITA et al., 2011), Índia (HEMASHETTAR et al., 2011), Nigéria (LU et al., 2013) and USA (SCHELL et al., 2011). Esse é o primeiro registro para a América do Sul.

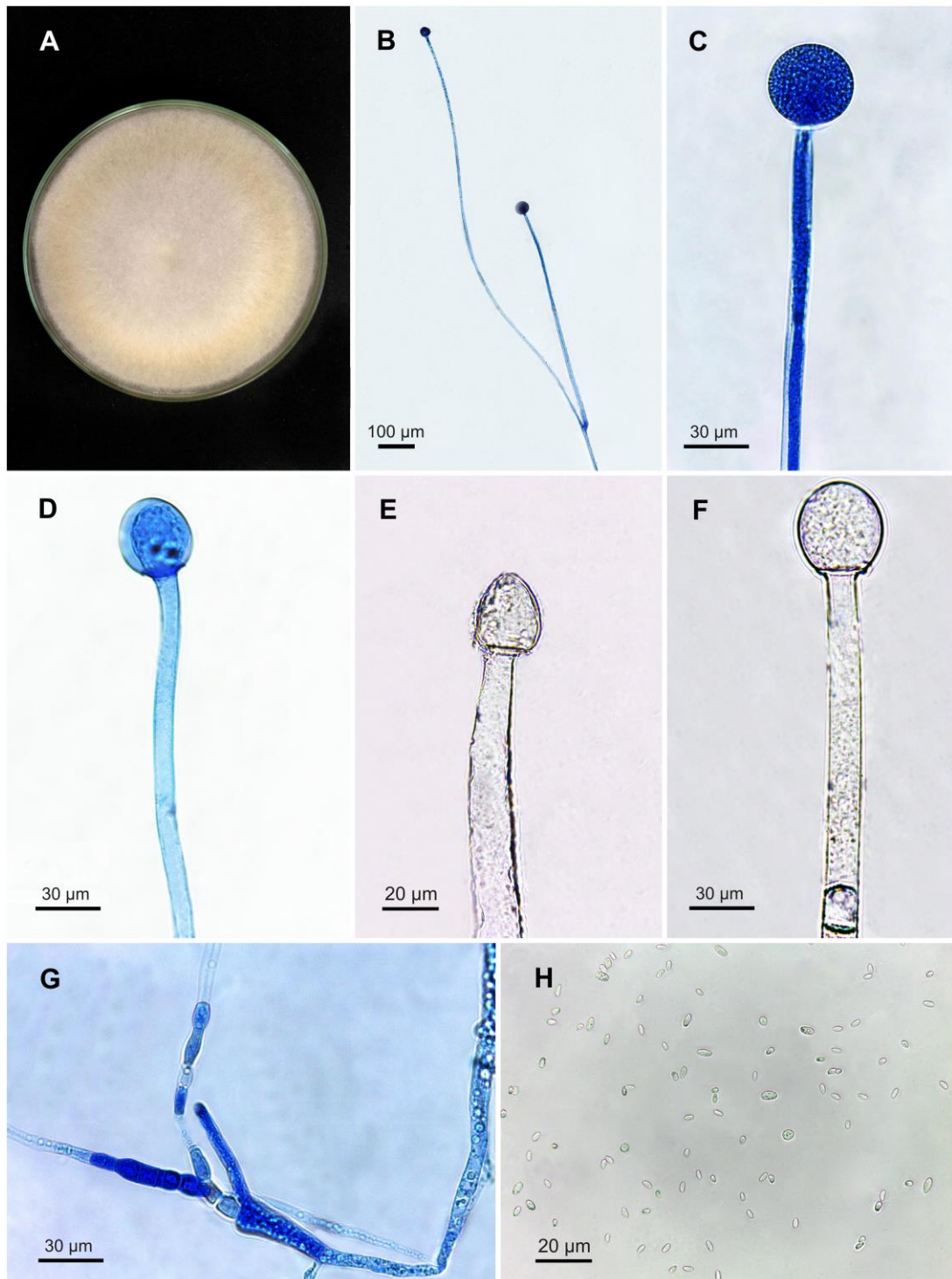
Notas: *Mucor irregularis* foi descrito por Zheng & Chen (1991) como *Rhizomucor variabilis* var. *variabilis* R.Y. Zheng & G.Q. Chen, tendo sido isolada de infecção cutânea primária de um paciente em Jiangsu, China. Análises filogenéticas das regiões ITS e LSU rDNA mostraram que *R. variabilis* var. *variabilis* pertence a *Mucor*, sendo atualmente referida como *M. irregularis* (ÁLVAREZ et al., 2011).

Material examinado: Brazil, Pernambuco: Tamandaré, Reserva Biológica de Saltinho (8°43'09"S 35°10'11"W), solo, 2013, D.X. Lima. (URM 7723).

A ferramenta BLASTn mostrou que as sequências do nosso isolado (URM 7723) apresentaram 99% de identidade com a sequência tipo de *M. irregularis* (JX976259 - CBS 700.71) e 96% identidade com sequência do isolado de *M. irregularis* (JN206150 - CBS 103.93), primeiramente descrito como *Rhizomucor variabilis*. As análises filogenéticas do

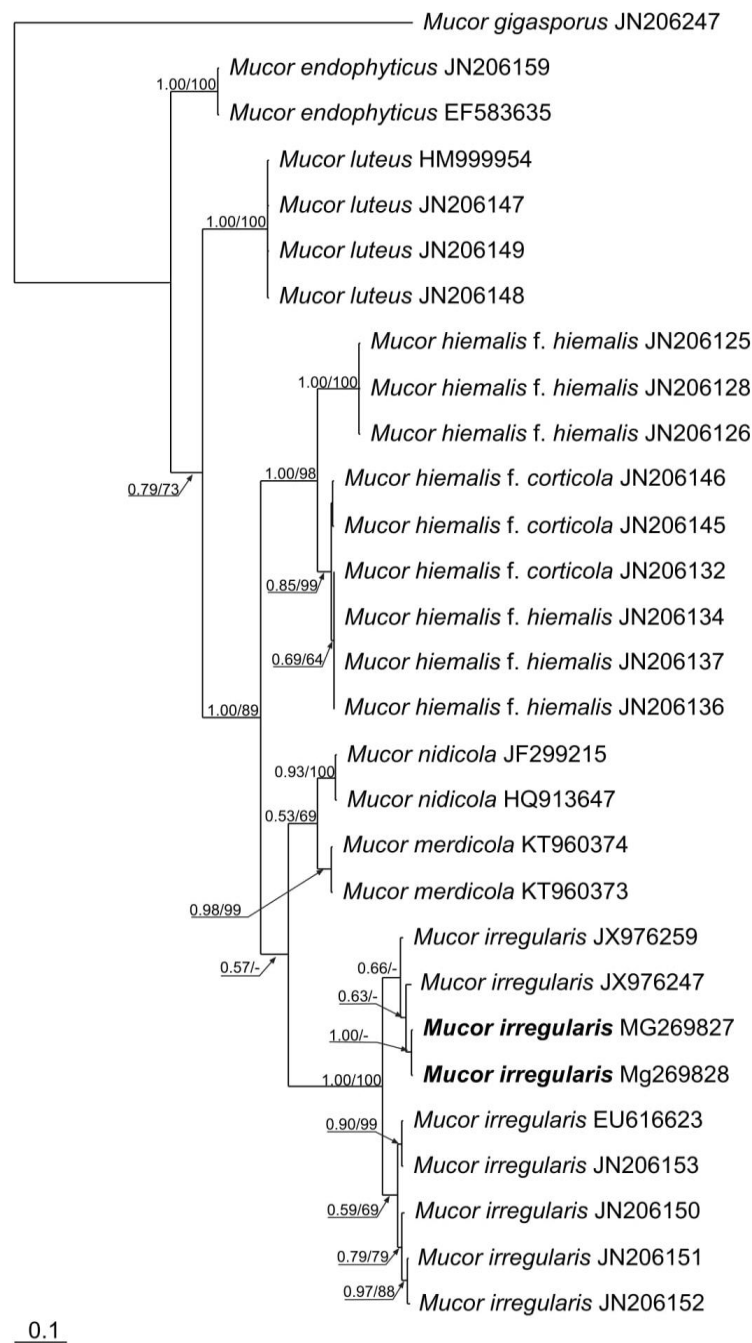
conjunto de dados (Figura 25) mostraram que nossas sequências (MG269827 e MG269828) foram agrupadas com sequências de *M. irregularis*.

Figura 23 - *Mucor irregularis* (URM 7723). A. Aspecto da colônia; B. esporangióforo com ramificação simples; C. esporangióforo com a esporângio; D. columela globosa; E. columela cônica; F. columela elipsoidal para cilíndrica; G. clamidósporos; H. esporangiosporos.



Fonte: Diogo Xavier Lima.

Figura 24 - Árvore filogenética de *Mucor irregularis* e espécies relacionadas baseada em sequências da região ITS. *Mucor gigasporus* foi usado como outgroup. As sequências estão com seus números de acesso do banco de dados do genbank. Valores de suporte são de inferência Bayesiana e máxima verossimilhança. As sequências obtidas nesse trabalho estão em negrito.



4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ESPÉCIMES DE MUCORALES QUANTO À CAPACIDADE DE PRODUZIR TANASE

Os 23 espécimes de Mucorales testados quanto à capacidade de produzir tanase em resíduo de manga apresentaram capacidade para a produção da enzima (Tabela 8). *Absidia pseudocylindrospora* foi o espécime mais promissor (18,00 U.mL⁻¹), seguido de *C. echinulata* var. *echinulata* (14,00 U.mL⁻¹) e *Lichtheimia brasiliensis* (13,98 U.mL⁻¹).

Tabela 9 - Atividade de tanase com extrato enzimático bruto de espécimes de Mucorales isolados de solo de Mata Atlântica utilizando resíduo de manga (*Mangifera indica* L.).

Espécie	U/mL ⁻¹	U/gbu	U/gbs
<i>Absidia</i> sp.	11,88	118,776	228,414
<i>A. cylindrospora</i> var. <i>cylindrospora</i>	9,49	94,898	182,496
<i>A. pseudocylindrospora</i>	18,63	186,327	358,320
<i>Backusella constricta</i>	10,02	100,204	192,700
<i>Circinella simplex</i>	10,96	109,592	210,754
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	10,57	105,714	203,297
<i>C. blakesleeana</i>	10,24	102,449	197,017
<i>C. echinulata</i>	14,00	140,000	269,231
<i>C. elegans</i>	11,88	118,776	228,414
<i>C. phaeospora</i>	12,65	126,531	243,328
<i>Gongronella brasiliensis</i>	13,63	136,327	262,166
<i>G. butleri</i>	12,59	125,918	242,151
<i>Lichtheimia brasiliensis</i>	13,98	139,796	268,838

<i>L. ramosa</i>	10,80	107,959	207,614
<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>lusitanicus</i>	12,57	125,714	241,758
<i>M. hiemalis</i>	10,65	106,531	204,867
<i>M. indicus</i>	8,82	88,163	169,545
<i>M. irregularis</i>	12,43	124,286	239,011
<i>M. luteus</i>	11,47	114,694	220,565
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>	10,57	105,714	203,297
<i>R. microsporus</i>	9,33	93,265	179,356
<i>R. stolonifer</i>	11,86	118,571	228,022
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	11,37	113,673	218,603

Unidade de atividade enzimática por ml (U/mL^{-1}), Unidade de atividade enzimática por por gramas base úmido (U/gbu) e Unidade de atividade enzimática por gramas base sólido (U/gbs).

5 DISCUSSÃO

5.1 ECOLOGIA DE COMUNIDADES DE MUCORALES EM DIFERENTES ECOSSISTEMAS NATURAIS DA MATA ATLÂNTICA DE PERNAMBUCO

A Mata Atlântica brasileira abriga um grande número de espécies endêmicas, acreditando-se que seja detentora de 8% da biodiversidade mundial (IBGE, 2011). Esse domínio é extremamente ameaçado devido aos ciclos contínuos de práticas extrativistas que culminaram no desmatamento e fragmentação de áreas florestais, sendo por isso considerada uma das áreas de “hotspot” prioritária para conservação da biodiversidade (MITTERMEIER et al., 1999). Em Pernambuco, restam apenas 5% de áreas florestais desse domínio que mesmo assim abrigam centros de endemismos (IBGE, 2011). A costa Pernambucana é considerada a “região verde” do estado, por apresentar diversos ecossistemas que se entrelaçam como os remanescentes de Mata Atlântica, restingas, estuários de manguezais, zonas de tabuleiro, entre outros (IBGE, 2011).

A maioria dos isolados citados nesse trabalho já haviam sido reportados em outros trabalhos em solo de Mata Atlântica (SCHOENLEIN-CRUSIUS et al., 1996, 2006; SCHOENLEIN-CRUSIUS & MILANEZ 1997, 1998). Entretanto oito novos registros estão sendo reportados para esse domínio: *Absidia* sp., *Backusella constricta*, *Gongronella brasiliensis*, *Lichtheimia ramosa*, *Mucor indicus*, *M. irregularis* e *Syncephalastrum racemosum*. Atualmente, a Mata Atlântica brasileira conta com 66 registros de espécies de Mucorales, enquanto a Caatinga e o Cerrado, 23 e 16 respectivamente (FLORA DO BRASIL, 2020), o que indica que a riqueza dos Mucorales em solos desse domínio é bem maior quando comparada à riqueza do grupo em solos de outros domínios. Além disso, esse estudo é pioneiro sobre a comunidade de Mucorales em ecossistemas de tabuleiro e mangue.

Os tabuleiros são ecossistemas que se desenvolvem às margens da floresta ombrófila, com uma formação vegetal que mistura espécies litorâneas e do Cerrado (RIZZINI, 1979). No presente estudo, foram isolados 13 táxons do grupo: *Absidia* sp., *Circinella simplex*, *C. blakesleeana*, *C. echinulata*, *C. elegans*, *G. butleri*, *Lichtheimia brasiliensis*, *L. ramosa*, *M. indicus*, *M. luteus*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, *R. microsporus* e *Syncephalastrum racemosum*. Espécies de *Lichtheimia* foram isoladas exclusivamente nesse ecossistema, e são comuns em regiões semiáridas, e as que foram isoladas no presente estudo foram igualmente citadas em solos da Caatinga (CAVALCANTI et al., 2006; SANTIAGO & SOUZA-MOTTA, 2006; SANTIAGO et al., 2014; LIMA et al., 2016). *Lichtheimia*

brasiliensis foi descrita a partir de isolados dos solos de Araripina e Mataraca, sendo a última área um ecossistema de restinga (SANTIAGO et al., 2014). Assim como as restingas, as florestas de tabuleiros se desenvolvem em solos arenosos, com uma vegetação aberta e com intensa radiação solar (TAVARES, 1964; ANDRADE LIMA, 1970). Espécies de *Rhizopus* foram mais frequentes na restinga do que em outros ecossistemas. Assim como *Lichtheimia* e *Cunninghamella*, espécies de *Rhizopus* otimizam seu crescimento em elevadas temperaturas (DOLATABADI et al., 2014). A termotolerância de alguns gêneros de Mucorales e o fato desses serem organismos ruderais têm sido considerados determinantes para colonização de diferentes habitats (DOLATABADI et al., 2014).

O manguezal é considerado um ecossistema extremo, com baixa oxigenação do solo e elevada concentração de salinidade e sulfetos (SCHAEFFER-NOVELLI, 2002), fator que pode ter sido determinante para baixa riqueza e diversidade Mucorales nessas áreas. *Rhizopus stolonifer* e *Syncephalastrum racemosum*, isoladas nesse trabalho, estão sendo reportadas pela primeira vez em sedimento de manguezal para o Brasil. Devido às características particulares do solo, como elevada salinidade, aeração pobre e alta temperatura, o manguezal se torna um interessante habitat para exploração dos fungos termofílicos/termotolerantes, halofílicos/halotolerantes (JAITLEY & RAI, 1982). Espécimes desses gêneros têm sido comumente reportados em ambientes extremos, até mesmo impactados (ZIBILSKÉ & WAGNER, 1982; SANTIAGO et al., 2006), o que indica a elevada adaptabilidade dos mesmos aos diferentes habitats.

Poucos trabalhos têm explorado a riqueza e ocorrência de Mucorales nos ecossistemas da Mata Atlântica no Brasil, sendo esses estudos exclusivos em áreas de floresta ombrófila densa (SCHOENLEIN-CRUSIUS & MILANEZ, 1997; TAUKE-TORNISIELO et al., 2005; SCHOENLEIN-CRUSIUS et al., 2006). Nesse trabalho, a comunidade de Mucorales presente na área de floresta ombrófila apresentou número de unidades formadoras de colônia, riqueza e diversidade superior aos demais ecossistemas estudados. O fato pode ser justificado devido aos solos de floresta ombrófila apresentarem elevada disponibilidade de nutrientes e matéria orgânica (TABARELLI et al., 2005; CRUZ et al., 2013), fator determinante para elevar o número de indivíduos e a diversidade de um ecossistema (BEGON et al., 1990). Embora a riqueza de Mucorales no tabuleiro tenha sido inferior à da floresta ombrófila, a diversidade em ambos ecossistemas foi estatisticamente similar. Esse resultado ocorreu devido à comunidade de Mucorales do solo do tabuleiro possuir mais elevada equitabilidade, ou seja, a distribuição das espécies nessa área é mais homogênea do que nas

demais áreas. Outro fator é a predominância de espécies raras na floresta ombrófila, como *B. constricta*, que teve dois indivíduos (doubleton), *C. bertholletiae* isolada de apenas uma amostra (unique), *M. circinatus* e *M. circinelloides* f. *lusitanicus*, isoladas em duas amostras (duplicates).

Utilizar diferentes estimadores pode selecionar qual deles é mais adequado para estimar a riqueza de uma comunidade (PALMER, 1990). Chao 1 e Jackknife 1 são estimadores não paramétricos de riqueza de espécies, ou seja, se baseiam na raridade das espécies utilizando variáveis como singletons, doubletons, uniques e duplicates (COLWELL et al., 2004). O Jackknife 1 projetou estimativas diferentes na floresta ombrófila e no manguezal, além de ter uma grande ascensão nas primeiras amostras de todas as áreas. Por outro lado, Chao 1 forneceu estimativas precisas do número de espécies observadas. Esse fato também foi observado por Lima et al. (2016), que, ao estimarem a riqueza de espécies da comunidade de Mucorales em diferentes ecossistemas do semiárido, obtiveram uma estimativa mais concisa através do Chao 1. Um bom estimador deve alcançar ou aproximar-se da assíntota com número igual ou menor de amostras do que a curva de acumulação de espécies observadas (Sobs) (GOTELLI & COLWELL, 2001), o que sugere que Chao 1 seja o estimador mais eficaz para comunidades de Mucorales.

Apesar dos Mucorales estarem presentes no solo de todos os ecossistemas estudados a frequência de ocorrência e abundância relativa da maioria das espécies observadas foi bem inferior, quando comparadas às dos demais fungos filamentosos, sendo geralmente considerados infrequentes (OLIVEIRA et al., 2013; LIMA et al., 2016). Esse resultado já era esperado, já que é comum existirem poucos táxons com elevada frequência de ocorrência, enquanto a maioria possui uma baixa frequência (RICHARDSON, 2001).

As comunidades dos Mucorales nos ecossistemas estudados variaram em relação à composição de espécies. A distância de Bray-Curtis foi utilizada para visualizar a proximidade entre essas comunidades e o quanto elas são similares. A dissimilaridade entre as espécies foi observada através da formação de dois grupos distintos (Figura 11), embora não bem definidos. Cada grande grupo é formado por espécies exclusivas ou que apresentam maior frequência, do tabuleiro (Grupo 1) e da floresta ombrófila densa (Grupo 2) e, dentro de cada grupo são observadas espécies da restinga e do mangue. Esses agrupamentos podem indicar que as espécies mais próximas têm nichos ecológicos similares na comunidade.

A ocorrência de uma espécie em um determinado solo é influenciada por fatores abióticos como temperatura, pH, salinidade, quantidade de matéria orgânica e nutrientes (moléculas contendo C e N) (CRUZ et al., 2017). As variáveis do solo analisadas no presente estudo não apresentam elevada influência sobre a composição da comunidade de Mucorales, embora juntas representem 1/3 da variação. Mas é possível dizer que algumas dessas variáveis estão correlacionadas com a estrutura das comunidades, visto que Na, S, Ca parecem influenciar negativamente no mangue, enquanto que, Al, H e Mg positivamente na floresta ombrófila, evidenciando uma tendência para a separação desses ecossistemas (Figura 12). Mudanças na comunidade de plantas de um ecossistema, bem como a variação de fatores edáficos e condições climáticas influenciam na composição microbiana na rizosfera (SCHMIT & MUELLER, 2007; PANDEY & PALNI, 2007). Além disso, a fisiologia dos fungos e a competição por matéria orgânica dentro desses habitats são fatores importantes para heterogeneidade dessas comunidades (BILLS et al., 2004).

5.2 DIVERSIDADE DE MUCORALES EM UMA ÁREA FRAGMENTADA DA MATA ATLÂNTICA DA RESERVA ECOLÓGICA DOIS IRMÃOS

A maioria das espécies de Mucorales isolados nesse estudo, como *Absidia cylindrospora* var. *cylindrospora*, *Circinella simplex*, *M. hiemalis*, *R. arrhizus* var. *arrhizus* e *R. microsporus*, já foram reportadas em solos de Mata Atlântica (SCHOENLEIN-CRUSIUS et al., 1996, 2006; SCHOENLEIN-CRUSIUS & MILANEZ 1997, 1998) do Brasil. Até o presente estudo, haviam sido reportadas 66 espécies de Mucorales para Mata Atlântica no Brasil, tendo 48 sido isoladas do solo. Esses registros foram realizados principalmente na região Sudeste, já que a maioria dos estudos sobre o grupo na região Nordeste estão concentrados em solos do semi-árido (CAVALCANTI et al., 2006; SANTIAGO & SOUZA-MOTTA, 2006; OLIVEIRA et al., 2013; SANTIAGO et al., 2013; LIMA et al., 2016).

Syncephalastrum racemosum é uma espécie comumente encontrada no solo (DOMSCH et al., 2007) e, no Brasil, foi isolada exclusivamente de amostras de solo do semi-árido (SANTIAGO et al., 2013; LIMA et al., 2016a). Nesse sentido, esse é o primeiro registro dessa espécie em solos de áreas de Mata Atlântica brasileiras. Espécies de *Cunninghamella* são principalmente encontradas em solo de regiões subtropicais (DOMSCH et al., 2007), estando *C. phaeospora* presente nos solos de Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (MAIA et al., 2006; DE SOUZA et al., 2008; SANTIAGO et al., 2013) do Brasil. *Backusella constricta*

foi isolada nesse estudo e descrita como nova (LIMA et al., 2016b), sendo essa a única espécie do gênero endêmica da Mata Atlântica. Todas as espécies de *Backusella* anteriormente reportadas no Brasil haviam sido isoladas de excrementos na Mata Atlântica ou da serrapilheira do Cerrado (SANTIAGO et al., 2011; DE SOUZA et al., 2014).

Nossos resultados apontaram baixa abundância relativa de todas as espécies de Mucorales isoladas das amostras de solo inventariadas, com exceção de *G. butleri*. Santiago et al. (2013) também relataram resultados similares para Mucorales em solos de áreas semi-áridas no Brasil. Esses resultados corroboram o modelo de abundância de espécies da série log, já que estamos relatando uma pequena assembléia de espécies com um pequeno número de espécies abundantes e uma grande quantidade de espécies raras (THOMAS & SHATTOCK, 1986). A maioria dos Mucorales são infrequentes no solo e apresentam baixa frequência em suas comunidades (SANTIAGO et al., 2013, LIMA et al., 2016). Como fungos ruderais, os propágulos das espécies desse grupo chegam em intervalos aleatórios e com distribuição muito dispersa em todo o solo (PUGH, 1980).

De todas as espécies isoladas no presente estudo, apenas *G. butleri* e *A. cylindrospora* var. *cylindrospora* foram muito frequentes. *Absidia cylindrospora* var. *cylindrospora* é comum em regiões temperadas e tropicais (PFENNING & DE ABREU, 2006), incluindo a Mata Atlântica brasileira (SCHOENLEIN-CRUSIUS & MILANEZ, 1998), enquanto *G. butleri* é frequente em florestas tropicais da África do Sul (EICKER, 1969), Malásia (VARGHESE, 1972), Nigéria (OGBONNA & PUGH, 1982), Costa do Marfim (RAMBELLI et al., 1984), Uruguai (BETTUCI & ROQUEBERT, 1995) e na Mata Atlântica brasileira (MAIA et al., 2006). Em estudos sobre comunidades de Mucorales em solos de áreas semi-áridas (LIMA et al., 2016a; SANTIAGO et al., 2013), *G. butleri* foi relatada como rara ou ausente, enquanto *A. cylindrospora* var. *cylindrospora* apresentou menor frequência de ocorrência do que nos solos de floresta tropical. Supõe-se que essas espécies tenham uma maior distribuição em ecossistemas da floresta tropical. *Circinella simplex* tem sido isolada de florestas tropicais no Brasil e na Colômbia (SCHOENLEIN-CRUSIUS et al., 2006; de SOUZA et al., 2011; GUALDRÓN-ARENAS et al., 1997), como também em outros países tropicais. As comunidades de fungos do solo em florestas tropicais compreendem muitas espécies cosmopolitas e várias espécies com distribuição tipicamente tropical têm sido comumente reportadas como infrequentes (PFENNING & DE ABREU, 2006).

A diversidade de Mucorales nos solos da Reserva Ecológica Dois Irmãos foi maior do que o relatado por Cabello & Arambarri (2002) ($H'=0.49$) em florestas em Buenos Aires, Argentina. No entanto, a diversidade de Mucorales foi menor quando comparada à de outros fungos filamentosos ($H = 2,45$) encontrados pelos autores acima mencionados. O aumento da diversidade está intimamente correlacionado com a riqueza das espécies, como sugerido por Magurran (1988). A riqueza das espécies obtidas neste estudo é suportada pelo resultado da curva de acumulação de espécies com estimador Chao 1, o qual é baseado no número de espécies raras que são comumente observadas nas comunidades de Mucorales. Embora os Mucorales sejam comumente encontrados em amostras de solo, a riqueza do grupo geralmente representa apenas 10% de todos os fungos filamentosos isolados do solo (CABELLO & ARAMBARRI, 2002; OLIVEIRA et al., 2013)

5.3 DESCRIÇÃO DE *ABSIDIA* SP. NOV. PRESENTE NO SOLO DA MATA ATLÂNTICA DE PERNAMBUCO, BRASIL

Recentes análises com as regiões 5.8S e ITS rDNA demonstraram que as espécies do gênero *Absidia* estão dentro da família Cunninghamellaceae, composta por espécies mesofilicas (HOFFMANN et al., 2013). Nossas análises filogenéticas de *Absidia* sp. mostram que essa espécie difere geneticamente das outras dentro de *Absidia*, sendo, portanto, nova para esse gênero.

Morfológicamente o isolado apresenta características gerais encontradas em todos os táxons do gênero, como esporangióforos eretos, crescendo solitários ou em verticilos a partir de estolões, geralmente com um septo abaixo de esporângios piriformes. Assim como o observado *Absidia* sp, várias espécies desse gênero, como *A. anomala* Hesselt. & J.J. Ellis, *A. cylindrospora*, *A. fusca* Linnem, *A. heterospora* Y.ling, *A. psychrophilia* Hesselt. & J.J. Ellis, *A. pseudocylindrospora* e *A. spinosa* produzem esporos cilíndricos (HESELTIME & ELLIS, 1964). No entanto, *Absidia* sp diferencia-se das outras espécies do gênero por produzir esporos cilíndricos e alguns levemente cuneiformes (nunca globosos como os de *A. heterospora* (HESELTIME & ELLIS, 1964) e por apresentar frequentemente columelas com duas projeções apicais. A presença de projeções nas columelas de várias espécies de *Absidia* foi reportada por Hesseltine & Ellis (1964), Ellis & Hesseltine (1965) e Hesseltine & Ellis (1966). No entanto, apenas *A. macrospora* descrita por Vánová (1968) pode apresentar projeções que se ramificam em duas, porém a coloração esverdeada da colônia e os esporos exclusivamente globosos da *A. macrospora* a distinguem de *Absidia* sp. Columelas com mais

de uma projeção também são comuns na maioria das espécies de *Lichtheimia*, tratadas até 2007 como espécies de *Absidia* (HOFFMANN et al., 2007).

Absidia sp. nov apresenta características morfológicas e genéticas significativas que a diferenciam das outras espécies do gênero. No entanto, a elevada semelhança morfológica entre as espécies de *Absidia* que produzem esporos exclusivamente cilíndricos muitas vezes dificulta a correta identificação dos táxons sem o auxílio da biologia molecular. Fato também observado em *Lichtheimia corymbifera* e *L. ramosa*, antigamente pertencente ao gênero *Absidia*, que são geneticamente diferentes, porém diferenciam se apenas por uma leve variação na forma dos esporos (GARCIAHERMOSO et al., 2009).

5.4 DESCRIÇÃO DE *BACKUSELLA CONSTRICTA* SP. NOV. PRESENTE NO SOLO DA MATA ATLÂNTICA DE PERNAMBUCO, BRASIL

Nesse estudo é descrita uma nova espécie de *Backusella*, atribuída como *B. constricta*. Essa nova espécie exibe características morfológicas que a diferenciam de qualquer outra espécie do gênero, como as columelas cônicas e cilíndricas, algumas possuindo uma constrição central e os esporangiosporos subglobosos $7.5\text{--}15 \times 5.5\text{--}10 \mu\text{m}$, servindo como caracteres sinapomórficos para as novas espécies. *Backusella constricta* apresenta esporângios uni- e multi esporados, sendo estes últimos observados com maior frequência. A produção de esporângios e esporângios pode ser observada em outros gêneros de Mucorales, como *Blakeslea* Thaxt., *Choanephora* Curr., *Chaetocladium* Fresen., *Dichotomocladium* Benny & R. K. Benj., *Dicranophora* Schröt., *Isomucor* J.I. De Souza, Pires-Zottarelli & Harakava, *Mycotypha* Fenner, *Radiomyces* Embree, *Thamnidium* Link e *Thamnostylum* Arx & H.P Upadhyay. No entanto, esses gêneros têm apenas esporângios multispórados (BENNY, 2005). Embora a presença de esporângios como única característica distintiva não deva ser utilizada para distinguir gêneros de Mucorales (WALTHER et al., 2013), a presença ou ausência de esporângios uni e/ou multispórados pode ser um critério útil para diferir entre algumas espécies de *Backusella*, como *B. grandis*, *B. oblongispora*, *B. oblongielliptica*, *B. variabilis* e *B. recurva*, em que essa estrutura não é reportada (BENNY & BENJAMIN, 1975; SCHIPPER, 1990; BENNY 2005, 2012). De acordo com Schipper (1990), os esporângios podem ser observados em *B. tuberculispora* (citada como *M. tuberculisporus*) e em culturas envelhecidas de *B. indica* (citadas como *M. recurvus* var. *indica*). Benny & Benjamin (1975) relataram a presença de esporângios em *B.*

circina e *B. lamprospora*, sendo os esporângios uni e mult esporados frequentes na primeira espécie, enquanto esporângios uni esporados são infrequentes em *B. lamprospora*. De Souza et al. (2014) também relataram a produção de esporângios mult esporados em *B. gigacellularis*.

Na árvore de LSU rDNA, *B. constricta* ficou próxima a um subclado com *B. indica*, *B. variabilis* e *B. grandis*. Na ferramenta BLASTn, as espécies mais próximas relacionadas à *B. constricta* foram *B. indica* e *B. grandis*. No entanto, a análise filogenética da região ITS rDNA mostrou que *B. constricta* formou um clado separado. Morfologicamente e fisiologicamente, *B. constricta* difere dessas espécies pela produção de esporangiosporos subglobosos e pela capacidade de crescimento em até 35°C, enquanto *B. indica*, *B. variabilis* e *B. grandis* produzem esporangiosporos elipsoidais e são capazes de crescer em até 40°C.

Nossas análises filogenéticas foram realizadas com base em Walther et al. (2013), incluindo sequências de *B. gigacellularis*. As sequências de *B. oblongispora* (JN206251) e *B. oblongielliptica* (JN206278) não foram utilizadas na reconstrução filogenética da região ITS devido ao alto nível de variação das regiões ITS1 e ITS2, o que resultou em dificuldades para alinhar as sequências, um fenômeno que também foi observado por de Souza et al. (2014). No entanto, ambas as espécies em questão foram incluídas na árvore filogenética LSU (Figura 18) e na matriz de similaridade mostrada na Tabela 7. Todas as sequências usadas para gerar a árvore LSU nesse manuscrito representam os domínios D1-D2 do rDNA LSU de cada espécime. No entanto, as sequências de *B. gigacellularis* disponíveis no GenBank não estão relacionadas a esses domínios, o que torna impossível alinhá-las com as outras sequências de *Backusella* durante a reconstrução filogenética da árvore LSU. Nenhuma das espécies descritas de *Backusella* possui todas as características morfológicas encontradas em *B. constricta*. Geneticamente, as regiões ITS1-5.8-ITS2 e D1-D2 do LSU divergem de outras espécies conhecidas dentro do gênero em <95% e <98%, respectivamente, satisfazendo o pressuposto molecular para designação de novas espécies designado por Hoffmann et al. (2009).

5.5 UMA NOVA INTERPRETAÇÃO DE *CIRCINELLA SIMPLEX* COM BASE EM ANÁLISES FILOGENÉTICA E MORFOLÓGICA RESULTOU NA DESCRIÇÃO DE *MUCOR CIRCINATUS* SP. NOV.

Circinella simplex foi isolada pela primeira vez de excrementos de cães, na França, por van Tieghem (1875). Vários anos depois, considerando *Circinella* como um subgênero de

Mucor, Migula (1910) transferiu *C. simplex* para *Mucor* [como *M. simplex* (Tiegh.) Mig]. Durante o presente estudo, foi obtido um isolado da mata atlântica que exibiu características morfológicas e moleculares descritas para *C. simplex*. No entanto, durante o estudo, foram encontradas diferenças entre o protólogo de *C. simplex* de van Tieghem (1875) e a descrição de *C. simplex* por Hesseltine & Fennell (1955) que se encaixam no isolado obtido no presente trabalho, resultando em uma nova interpretação de *C. simplex* e na descrição de uma nova espécie *Mucor*.

As árvores filogenéticas obtidas no presente estudo suportam os resultados de Walther et al.(2013), colocando as linhagens CBS 142.35, CBS 284.92, CBS 428.80, CBS 540.80, CBS 548.89 e URM 7218 próximo de *Mucor fuscus* e *M. laxorrhizus*. Embora *Isomucor trufemiae* e *Hyphomucor assamensis* estejam posicionadas dentro do clado de *Mucor* em nossas árvores filogenéticas da região ITS e LSU do rDNA. São necessários mais marcadores moleculares para resolver a posição taxômica correta desses táxons.

Morfologicamente, o isolado obtido de Mata Atlântica e as cinco culturas da CBS estudadas (CBS 142.35, CBS 284.92, CBS 428.80, CBS 540.80, CBS 548.89) correspondem à descrição de *C. simplex* dada por Hesseltine & Fennell (1955), ao produzirem esporangiosporos irregulares (angulares) com 3–5,5 µm de comprimento (Figura 20). No entanto, van Tieghem (1875) descreveu e ilustrou *C. simplex* como produzindo esporangiosporos globosos com até 3 µm de diâmetro. Callen (1949) mencionou que as figuras de *C. simplex* exibidas no trabalho de van Tieghem (1875) mostraram um único esporângio com um “espinho” estéril, característica compartilhada entre várias espécies de *Circinella*. Na nossa opinião, van Tieghem ilustrou uma seção de todo o esporangióforo, e o suposto espinho estéril representaria uma parte do esporangióforo que não foi desenhado, embora seja difícil reconhecer isso já que os contornos desta estrutura não estão claros na figura. Além disso, van Tieghem descreveu apenas os ramos primários dos esporangióforos, enquanto Hesseltine & Fennell (1955) frequentemente observaram ramos secundários nas cepas consideradas como *C. simplex*. No presente trabalho, foi admitido que os ramos secundários dos esporangióforos e os esporangiosporos angulares (Figura 20) são características morfológicas fortes que dificilmente teriam sido ignorados por van Tieghem e, portanto, as cepas com esporangiosporos angulares foram consideradas como sendo uma espécie diferente da *C. simplex* originalmente descrita.

Esta suposição é ainda suportada pela distribuição geográfica das cepas com esporangiosporos angulares, que foram isoladas de países tropicais. No entanto, a *Circinella simplex* descrita por van Tieghem (1875) foi isolada na França. Na literatura, existem alguns relatos de *C. simplex* proveniente da Europa: República Tcheca (SLADKA et al., 1968), Reino Unido (DENNIS & GEE, 1973), Alemanha (KLOPOTEK, 1979) e Hungria (NOVÁKOVÁ, 2009), mas, em apenas um desses casos, a cepa foi depositada em uma coleção de cultura. O sequenciamento dessa cepa (ATCC 48382), isolada na Alemanha (KLOPOTEK, 1979), identificou-a como *C. muscae* (dados não publicados). Sladka et al. (1968) descreveram *C. simplex* semelhante ao descrito por van Tieghem (1875), com pequenos esporos globosos de cerca de 3 µm de diâmetro. Os isolados da Hungria e do Reino Unido não foram descritos e nem depositadas em coleções de cultura. Portanto, não temos certeza da identidade dos mesmos. No entanto, até agora, não existe nenhum relato sobre uma espécie de *Circinella simplex* com esporo angular de países com um clima temperado.

Em nossa opinião, a diferença marcante na forma dos esporos e a ramificação dos esporangióforos, juntamente com a distribuição geográfica de *C. simplex*, sugere fortemente que as espécies descritas por van Tieghem (1875) e as cepas de esporos angulares, incluindo CBS 142.35 (NRRL 2407), isolado por Zycha (1935) e descrito por Hesseltine & Fennel (1955), representam duas espécies diferentes não descritas. Dessa forma, nós estamos propondo *Mucor circinatus* sp. nov. para os isolados de esporos angulares. Até o presente, *C. simplex* descrita por van Tieghem, em 1875, está perdida para a ciência. A mudança de identidade dos espécimes com esporos angulares não altera a posição taxômica da verdadeira *C. simplex* que, apesar de não existir nenhum material disponível, não precisa ser excluída do gênero *Circinella*. Portanto, esse gênero atualmente consiste nas seguintes espécies: *C. angarensis*, *C. chinensis*, *C. minor*, *C. mucoroides*, *C. muscae*, *C. simplex* e *C. umbellata*.

5.6 PRIMEIRO REGISTRO DE *MUCOR IRREGULARIS* NA AMÉRICA DO SUL

As características morfológicas de *M. irregularis* descritas aqui mostram boa correspondência com a descrição de Zheng & Chen (1991). No entanto, as columelas de forma variável e irregular citadas na descrição original não foram observadas no nosso isolado, com ambos os espécimes exibindo columelas globosas e elipsoidais à cilíndricas e, principalmente, esporangiosporos elipsoidais, alguns dos quais cilíndricos ou globosos, conforme relatado por Lu et al. (2009, 2013) e Schell et al. (2011). Na árvore filogenética da

região ITS do rDNA do presente estudo, as sequências de *M. irregularis* foram colocadas próximas às de *M. hiemalis* (Figura 20), que possui características morfológicas semelhantes à *M. irregularis*. No entanto, os esporangióforos de *M. hiemalis* são levemente simpodialmente ramificados, enquanto *M. irregularis* produz esporangióforos monopodial e simpodialmente ramificados. Os esporângios de *M. irregularis* são esféricos para globosos com coloração do marrom para acinzentado, com paredes difluentes, em contraste com o esporângio de aspecto vítreo amarelado para castanho escuro e de parede deliquescente observado em *M. hiemalis*. *Mucor irregularis* produz columelas predominantemente globosas e elipsoidais à cilíndricas que diferem do tipo elipsoidal com a base truncada encontrado em *M. hiemalis*. Além disso, *M. hiemalis* produz esporangiosporos com poucos grânulos, elipsoidais, alguns achatados de um lado, enquanto os esporangiosporos de *M. irregularis* são de parede lisa, principalmente elipsoidais, cilíndricos ou globosos (SCHIPPER, 1973).

Mucor irregularis foi descrito como um fungo oportunista emergente, especialmente nos países asiáticos. A infecção clínica causada por esse fungo afeta os rostos e as extremidades expostas de pacientes imunocompetentes, sendo uma micose principalmente cutânea ou subcutânea, tornando-se crônica e levando a mutilação severa ou morte do paciente (LI & LUN, 2012; LU et al., 2013). Os relatos de casos dessa espécie começaram inicialmente na China, onde *M. irregularis* foi isolada pela primeira vez das lesões de um paciente e descrito como *Rhizomucor variabilis* var. *variabilis* (ZHENG & CHEN, 1991). Os casos foram posteriormente relatados na Austrália (RIBEIRO et al., 2010), Japão (TOMITA et al., 2011), Índia (HEMASHETTAR et al., 2011) e Estados Unidos (SCHELL et al., 2011). *Mucor irregularis* também foi isolada do solo e como endófito de *Rhizophora stylosa* Griff. (LU et al., 2013; GAO et al., 2016).

Lu et al. (2013) forneceram um estudo taxonômico e filogenético detalhado baseado em quatro genes locus de *M. irregularis*, com foco na distribuição geográfica dessa espécie. De acordo com esses autores, *M. irregularis*, predominantemente encontrado no leste da Ásia, também é distribuído em todo o mundo. Entretanto, a presença dessa espécie ainda não havia sido confirmada na Europa e América do Sul. Esse é o primeiro registro de *M. irregularis* na América do Sul.

5.7 PRODUÇÃO DE TANASE POR ESPÉCIES DE MUCORALES UTILIZANDO RESÍDUO DE MANGA ATRAVÉS DE FES

Trabalhos sobre a produção de tanase por representantes de Mucorales ainda são escassos, tendo sido relatados como produtores dessa enzima apenas espécimes dos gêneros *Cunninghamella* sp., *Helicostylum* sp., *Rhizopus* e *Syncephalastrum* (BRADDOO et al., 1996; KAR & BANERJEE, 2000; BANERJEE et al., 2005; PUROHIT et al., 2006; LONDONO-HERNÁNDEZ et al., 2017).

Através da FES, todas as 23 espécies de Mucorales analisadas no presente estudo foram capazes de produzir tanase. De acordo com Banerjee et al. (2005), a fermentação em estado sólido tem alcançado um rendimento maior do que fermentação submersa convencional na produção dessa enzima. Além disso, esse tipo de fermentação apresenta vantagens sobre o método convencional devido à redução na utilização de água e riscos de contaminação e por ser um método de produção simples que utiliza resíduos agroindustriais como substrato (PINTO et al., 2011).

Nos últimos anos, os trabalhos sobre a produção de tanase através de FES têm utilizado resíduos agroflorestais e agroindustriais ricos em taninos como indutores da produção dessa enzima (SABU et al., 2005; KUMAR et al., 2007; MANJIT et al., 2008; CRUZ et al., 2013). Utilizando resíduos de tamarindo e do dendê como substrato, Sabu et al. (2005) obtiveram valores entre 6,44 U/g e 13,03 U/g de tanase produzidos por *Aspergillus niger*, pelo uso de cada resíduo, respectivamente. A maioria dos isolados de Mucorales testados nesse trabalho foram capazes de produzir valores elevados de tanase, entre 93,26 U/g e 186,327 U/g, indicando o potencial do substrato de manga na produção dessa enzima por Mucorales.

Os poucos trabalhos que existem sobre a produção de tanase por Mucorales através de FES focam no consórcio entre *R. arrhizus* e *Aspergillus foetidus* (BANERJEE et al., 2005; PUROHIT et al., 2006). Até o presente estudo, Kar & Banerjee (2000) tinham avaliado separadamente uma espécie de Mucorales através de FES. Utilizando uma linhagem de *R. arrhizus* isolada do solo, os autores constataram que a melhor performance para produção enzimática (30 U.mL^{-1}) dessa espécie, foi utilizando sementes de *Caesalpinia digyna* com um teor de umidade de 93%, incubadas a 32°C por 72 horas. A produção de tanase por *R. arrhizus* obtida pelos autores supracitados foi melhor do que a observada no presente estudo ($10,57 \text{ U.mL}^{-1}$). Essa diferença nos valores na produção enzimática pode ser possivelmente explicada pelo teor de tanino presente nos substratos testados, visto que as sementes de

Caesalpinia digyna possuem 58% de taninos em sua biomassa (KAR & BANERJEE, 2000), enquanto os caroços são constituídos de 12 a 18% de taninos (ROZANE et al., 2004).

Kumar et al. (2007) avaliaram a produção de tanase por *Aspergillus ruber* utilizando folhas de jameloeira, enquanto Manjit et al. (2008) utilizaram folhas de cinco árvores frutíferas para produção de tanase através da FES, por *A. fumigatus*. Em ambos trabalhos, respectivamente, os autores obtiveram 69 U.g⁻¹ e 174,32 U.g⁻¹ como atividade máxima de tanase. Embora *Aspergillus* seja referido como um dos gêneros mais promissores na produção dessa enzima (AGUILLAR et al., 2007), *Absidia pseudocylindrospora* testada no presente trabalho obteve 186,327 U.g⁻¹ de atividade máxima de tanase, resultado superior aos dos trabalhos supracitados.

Em um trabalho realizado por Cruz et al. (2013) utilizando folhas de manga como substrato, os autores relataram que a atividade taninolítica das espécies de *Penicillium* varia entre 14,48 e 89,48 U.mL⁻¹. Embora os resultados obtidos no presente estudo tenham sido inferiores (entre 8,82 e 18,63 U.mL⁻¹) ao dos autores supracitados, esses dados reforçam o potencial de espécies de Mucorales para a produção de tanase, devido ao fato de que existem diferentes variáveis a serem estudadas, como exemplo, tipo de substrato, quantidade de ácido tânico, temperatura ou tempo de incubação, de modo a otimizar produção dessa enzima. Além disso, *Absidia cylindrospora* var. *cylindrospora*, *A. pseudocylindrospora*, *B. constricta*, *Circinella simplex*, *Cunninghamella bertholletiae*, *C. blakesleeana*, *C. echinulata*, *C. elegans*, *C. phaeospora*, *Gongronella brasiliensis*, *G. butleri*, *Lichtheimia brasiliensis*, *L. ramosa*, *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus*, *M. hiemalis*, *M. indicus*, *M. irregulares*, *M. luteus*, *Rhizopus microsporus* e *R. stolonifer* estão sendo relatadas pela primeira vez como produtoras desta enzima.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, dentro das condições experimentais estabelecidas, conclui-se que:

- *Absidia cylindrospora* var. *cylindrospora*, *A. pseudocylindrospora*, *Backusella constricta*, *Cunninghamella bertholletiae*, *C. echinulata*, *C. elegans*, *C. phaeospora*, *Gongronella brasiliensis*, *G. butleri*, *Mucor circinatus*, *M. circinelloides* f. *lusitanicus*, *M. hiemalis*, *M. indicus*, *M. irregularis*, *Rhizopus arrhizus*, *R. microsporus*, *R. stolonifer* e *Syncephalastrum racemosum* fazem parte da comunidade de Mucorales na área de floresta ombrófila densa da Reserva Biológica de Saltinho;
- *Absidia* sp. nov., *Cunninghamella blaskeneana*, *C. echinulata*, *C. elegans*, *Gongronella butleri*, *Lichtheimia brasiliensis*, *L. ramosa*, *Mucor circinatus*, *M. indicus*, *M. luteus*, *Rhizopus arrhizus*, *R. microsporus*, e *Syncephalastrum racemosum* fazem parte da comunidade de Mucorales na área de tabuleiro da Reserva Biológica de Saltinho;
- *Cunninghamella blaskeneana*, *Gongronella brasiliensis*, *G. butleri*, *Rhizopus arrhizus*, *R. microsporus*, *R. stolonifer* e *Syncephalastrum racemosum* fazem parte da comunidade de Mucorales na área de restinga da APA de Guardalupe;
- *Rhizopus stolonifer* e *Syncephalastrum racemosum* fazem parte da comunidade de Mucorales na área de mangue da APA de Guardalupe;
- *Absidia cylindrospora* var. *cylindrospora*, *Backusella constricta*, *Cunninghamella phaeospora*, *Gongronella butleri*, *Mucor circinatus*, *M. hiemalis*, *Rhizopus arrhizus*, *R. microsporus* e *S. racemosum* fazem parte da comunidade de Mucorales do solo da Reserva ecológica dos Dois Irmãos.
- A riqueza de Mucorales em solos de floresta ombrófila densa é mais elevada do que nos solos de tabuleiro, restinga e manguezal;
- A equitabilidade Mucorales em solos de tabuleiro é mais elevada do que nos solos de floresta ombrófila densa, restinga e manguezal;
- A diversidade de Mucorales é mais elevada nos solos da floresta ombrófila densa e do tabuleiro, em relação aos solos de restinga e manguezal;

- O manguezal da APA de Guardalupe apresenta baixas riqueza e diversidade de Mucorales em relação aos solos de floresta ombrófila densa, restinga e tabuleiro;
- *Gongronella butleri* é muito frequente nos solos de áreas de floresta ombrófila densa e tabuleiro da Reserva Biológica de Saltinho;
- *Gongronella brasiliensis*, *R. microsporus* e *M. irregularis* são frequentes no solo de floresta ombrófila densa da Reserva Biológica de Saltinho;
- *Gongronella butleri*, *C. elegans*, *M. indicus* e *S. racemosum* são frequentes no solo de tabuleiro da Reserva Biológica de Saltinho;
- *Rhizopus microsporus* é muito frequente em solos de restinga da APA de Guardalupe;
- A composição de Mucorales é mais similar entre áreas de restinga e tabuleiro;
- O manguezal apresenta elevada dissimilaridade com as áreas de floresta ombrófila densa, tabuleiro e restinga;
- *Absidia* sp., *Backusella constricta* e *M. circinatus* são novas espécies;
- *Mucor irregularis* ocorre na América do Sul, mais especificamente no solo de Tamandaré-PE;
- *Absidia cylindrospora* var. *cylindrospora*, *Absidia* sp., *A. pseudocylindrospora*, *B. constricta*, *M. circinatus*, *Cunninghamella bertholletiae*, *C. blakesleeana*, *C. echinulata*, *C. elegans*, *C. phaeospora*, *Gongronella brasiliensis*, *G. butleri*, *Lichtheimia brasiliensis*, *L. ramosa*, *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus*, *M. hiemalis*, *M. indicus*, *M. irregularis*, *M. luteus*, *Rhizopus microsporus* e *R. stolonifer* são produtoras de tanase.
- *Absidia pseudocylindrospora* é o melhor produtor de tanase, dentre os espécimes testados.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, C. N.; RODRÍGUEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; AUGUR, C.; FAVELATORRES, E.; PRADO-BARRAGAN, L.A.; RAMÍREZ-CORONEL, A.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C. Microbial tannases: advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 47-59, 2007.
- AINSWORTH, G. C.; BISBY, G. R. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi Dictionary of the Fungi**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 1971.
- ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; HOFFMANN, K.; DE HOOG, G. S.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; VOIGT, K.; BIBASHI, E.; WALTHER, G. Species Recognition and Clinical Relevance of the Zygomycetous Genus *Lichtheimia* (syn. *Absidia Pro Parte*, *Mycocladius*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 2154-2170, 2010.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4^o Edição. New York: John Wiley & Sons, 1996. 870 p.
- ALMEIDA JR, E. B.; ZICKEL, C. S.; PIMENTEL, R. M. M. Caracterização e espectro biológico da vegetação do litoral arenoso do Rio Grande do Norte. **Revista de Geografia**, Recife, ISSN: 2238-6211, v. 23, n. 3, p. 66-85, 2009.
- ÁLVAREZ, E.; CANO, J.; STCHIGEL, A. M.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; SALAS, V.; RINALDI, M. G.; GUARRO, J. Two new species of *Mucor* from clinical samples. **Medical mycology**, v. 49, n. 1, p. 62-72, 2011.
- ALVAREZ, E. D. El Subphylum Mucoromycotina: generalidades y aspectos taxonómicos recientes (Mucoromycotina Subphylum: overview and recent taxonomic aspects). **Boletín micológico**, v.28, n.1, p.16-25, 2013.
- ALVES, M. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; OKADA, K.; PESSOA, I. H. F.; MILANEZ, A. I. Detection of extracellular protease in *Mucor* species. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 22, p. 114-117, 2005.
- ANDRADE LIMA, D. Recursos vegetais de Pernambuco. **Instituto de Pesquisas Agronômicas**, 1970.

BANERJEE, R.; MUKHERJEE, G.; PATRA, K. C. Microbial transformation of tannin-rich substrate to gallic acid through co-culture method. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 8, p. 949-953, 2005.

BARBOSA, M. R. D. V. **Estudos Florísticos e Fitossociológicos da Mata do Buranquinho, Remanescente da Mata Atlântica em João Pessoa, PB**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 135, 1996.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 175-185, 2012.

BARTNICKI-GARCÍA, S. Symposium on biochemical bases of morphogenesis in fungi. mold-yeast dimorphism of *Mucor*. **Bacteriological Review**, v.1 p. 2, 1963.

BEGON, M.; HARPER, J. L.; TOWNSEND, C. R. **Ecology: Individuals, Population and Communities**. Inglaterra: Blackwell Sci Publ, 1990.

BENJAMIN, R. K.; MEHROTRA, B. S. Obligate azygospore formation in two species of *Mucor* (Mucorales). **Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany**, v. 5, n. 3, p. 235-245, 1963.

BENJAMIN, R. K. Zygomycetes and their spores. In: Kendrick, B. (Ed.). The Whole Fungus. **National Museum of Natural Sciences and National Museum of Canada**, Ottawa, v. 2, p. 573-622, 1979.

BENNY, G.L & R.K. BENJAMIN. Observations on Thamnidaceae (Mucorales). New taxa, new combinations, and notes on selected species. – **Aliso** 8(3): 301–351, 1975.

BENNY, G.L. Zygomycetes. in Benny GL (ed.). Synopsis and Classification of Living Organisms. McGraw - Hill Book Co. Inc., New York. pp 184-195. 1982.

BENNY, G. L.; HUMBER, R. A.; MORTON, J. B. The Zygomycota: Zygomycetes. In: McLaughlin, D. J.; McLaughlin, E. G.; Lemke, P. A. (Eds.). The Mycota. Systematics and Evolution. **Springer-Verlag Berlin**, pp.184-195, 2001.

BENNY, G. L. Backusella. 2005. Disponível em: <http://zygomycetes.org/index.php?id=105>. Acesso em: 22/01/2018.

BENNY, G.L. The methods used by Dr. R.K. Benjamin, and other Mycologists to isolate Zygomycetes. **Aliso** 26: 37-6, 2008.

BENNY, G. L. Zygomycetes. 2009. Disponível em: <http://www.zygomycetes.org>. Acesso em: 22/01/2018.

BENNY, G. L. Current systematics of Zygomycota with a brief review of their biology. In: Misra JK, Tewari JP, Deshmukh SK (eds.) Systematics and evolution of Fungi. **Science, Enfield**, pp. 55-105, 2012.

BENNY, G.L, et al. Challenges and Future Perspectives in the Systematics of Kickxellomycotina, Mortierellomycotina, Mucoromycotina, and Zoopagomycotina. In: LI, D.-W. (org.) Biology of Microfungi, Fungal Biology. Switzerland: Springer International Publishing, pp. 65–126, 2016.

BERKA, R. M.; GRIGORIEV, I. V.; OTILLAR, R.; SALAMOV, A.; GRIMWOOD, J.; REID, I. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 922-927, 2011.

BETTUCCI, L.; ROQUEBERT, M. Studies on microfungi from tropical rain forest litter and soil. A preliminary study. **Nova Hedwigia**, v. 61, n. 1-2, p. 111-118, 1995.

BILLS, G. F.; CHRISTENSEN, M.; POWELL, M.; THORN, G. Saprobic soil fungi. In: Mueller, G. M.; Bills, G. F.; Foster, M. S. (Eds.). Inventory and monitoring methods. **Biodiversity Fungi**, pp. 271-302, 2004.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. **American journal of botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.

BLAIR, J. E. Fungi. In: HEDGES, S. B.; KUMAR, S. (Eds.). The timetree of life. **Oxford University Press**, pp. 215–219, 2009.

BRANDÃO, M. C. C.; MAIA, G. A.; LIMA, D. P.; PARENTE, E. J. S.; CAMPELLO, C. C.; NASSU, R. T.; FEITOSA, T.; SOUSA, P. H. M. Análise físico química, microbiológica e sensorial de frutos de manga submetidos à desidratação osmótico solar. **Revista Brasileira De Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 38-41, 2003.

BRADDOO, S.; GUPTA, R.; SAXENA, R. K. Screening of extracellular tannase-producing fungi: Development of a rapid and simple plate assay. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 325-329, 1996.

BRIDGE, P.; SPOONER, B. Soil fungi: diversity and detection. *Plant and soil*, v. 232, n. 1-2, p. 147-154, 2001.

CAFARO, M. Eccrinales (Trichomycetes) are not fungi, but a clade of protists at the early divergence of animals and fungi. *Molecular Phylogenetics and Evolution* v. 35, p. 21–34, 2005.

CALLEN, E. O. Notes on *Circinella simplex* van tieghem. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 32, n. 3-4, p. 337-340, 1949.

CABELLO, M.; ARAMBARRI, A. Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* forests in the eastern Buenos Aires province (Argentina). **Microbiological research**, v. 157, n. 2, p. 115-125, 2002.

CÂMARA, I. D. G. Plano de ação para a Mata Atlântica: roteiro para a conservação de sua biodiversidade. In: **Cadernos da Reserva da Biosfera**. Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlantica, 1996.

CASTIGLIONI, D. S.; COELHO, P. A. Determinação da maturidade sexual de *Ucides cordatus* (Crustacea, Brachyura, Ucididae) em duas áreas de manguezal do litoral sul de Pernambuco, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 101, n. 1-2, p. 138-144, 2011.

CAVALCANTI, M. A. Q.; OLIVEIRA, L. G.; FERNANDES, M. J.; Lima, D. M. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. **Acta bot. bras**, v. 20, n. 4, p. 831-837, 2006.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M.; RODRÍGUEZ-DURÁN, L. V.; BALAGURUSAMY, N.; PRADO-BARRAGÁN, A.; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS, J. C., AGUILAR, C. N. Biotechnological Advances and Challenges of Tannase: An Overview. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 445–459, 2012.

CLARKE, K. R.; GORLEY, R. N. **Primer v.6 User Manual/Tutorial**. Plymouth: Primer-E Ltd, 2006.

COLWELL, R. K.; MAO, CHANG XUAN; CHANG, JING. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. **Ecology**, v. 85, n. 10, p. 2717-2727, 2004.

CONSERVATION INTERNATIONAL DO BRASIL, Fundação SOS Mata Atlântica, Fundação Biodiversitas, Instituto de Pesquisas Ecológicas, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. Brasília, Ministério do Meio Ambiente. 2000.

CORDEIRO NETO, F.; PERSSONI, R. A. B.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Fungos produtores de inulinas isolados da rizosfera de Asteraceae herbácea do cerrado (Mojí-Guaçu, SP, Brasil). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 21, p. 149-153, 1997.

COSTA, A. M.; RIBEIRO, W. X.; KATO, E.; MONTEIRO, A. R. G.; PERALTA, R. M. Production of tannase by *Aspergillus tamaris* in Submerged Cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 399-404, 2008.

COUTINHO, R.Q.;M.F. LIMA-FILHO, J.B.; SOUZA-NETO, E.D.; SILVA, I.C.; MACHADO et al. Características climáticas, geológicas, geomorfológicas e geotécnicas da Reserva Ecológica de Dois Irmãos. In: MACHADO, I.C.; A.V. LOPES & K.C. PÔRTO (eds.): Reserva Ecológica de Dois Irmãos: Estudos em um remanescente de Mata Atlântica em uma área urbana, – Sectma. Editora Universitária, Recife, Brazil. pp. 1–49. 1998.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry—a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

CRUZ, C. B. M.; VICENS, R. S.; SEABRA, V. D. S.; REIS, R. B., FABER, O. A.; RICHTER, M.; ARNAUT, P.K.E.; ARAÚJO, M. Classificação orientada a objetos no mapeamento dos remanescentes da cobertura vegetal do bioma Mata Atlântica, na escala 1: 250.000. **Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, v. 13, p. 5691-5698, 2007.

CRUZ, R.; LIMA, J. S.; FONSECA, J. C.; FERNANDES, M. J. S.; LIMA, D. M. M.; DUDA, G. P.; MOREIRA, K. A.; MOTTA, C. M. S. Diversity of filamentous fungi of area from Brazilian Caatinga and high-level tannase production using mango (*Mangifera indica* L.) and surinam cherry (*Eugenia uniflora* L.) leaves under SSF. **Advances in Microbiology**, v. 3, n. 08, p. 52, 2013.

CRUZ, R et al. Anthropization Effects on the Filamentous Fungal Community of the Brazilian Catimbau National Park. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, 2017.

DEACON, L. J.; PRYCE-MILLER, E. J.; FRANKLAND, J. C.; BAINBRIDGE, P. D. M.; ROBINSON, C. H. Diversity and function of decomposer fungi from a grassland soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 7–20, 2006.

DENNIS, C. SOFT FRUITS. IN: DENNIS, C. (Ed.). **Post-harvest pathology of fruits and vegetables**. New York: Academic press, 1983. pp 23-42.

DENNIS, C.; GEE, J. M. The microviral flora of broiler-house litter and dust. **Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 101-107, 1973.

DE SOUZA, J. I.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; OLIVEIRA, L. H. S. Selected species of Mucorales from soil contaminated with toxic metals in São Paulo State, Brazil. **Mycotaxon**, v.106, p. 273–288, 2008.

DE SOUZA, J. I.; AMORIM, P. Z.; CARMEN, I.; DOS SANTOS, J. F.; COSTA, J. P. Zygomycetes from “Reserva Biológica de Mogi Guaçu”, São Paulo State, Brazil. **Mycotaxon**, v.116, p.303–312, 2011.

DE SOUZA, J. I.; MARANO, A. V.; PIRES-ZOTARELLI, C. L. A.; CHAMBERGO, F. S.; HAKAKAVA, R. A new species of *Backusella* (Mucorales) from a Cerrado reserve in Southeast Brazil. **Mycological Progress**, v.13, n.4, p.975–980, 2014.

DIX, N. J.; WEBSTER, J. Fungal ecology. **Chapman & Hall**, London. 1995.

DOLATABADI, S.; WALTHER, G.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G. et al. **Fungal Diversity**, v. 64, n. 1, p 145-163, 2014.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of Soil Fungi**. San Francisco: IHW-Verlag, 2007.

EICKER, A. Microfungi from surface soil of forest communities. In: Zuuland. **Transactions British Mycological Society**, v. 53, n. 3, p. 381-392, 1969.

ELLIS, J. J.; HESSELTINE, C. W. The genus *Absidia*: globose-spored species. **Mycologia**, v. 57, n. 2, p. 222-235, 1965.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivo da mangueira:** colheita e pós-colheita. EMBRAPA, Sistemas de Produção 2, julho, 2004. Disponível em: <www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: agosto 2016.

FEREIRA, J. A.; LENNARTSSON, P. R.; EDEBO, L.;TAHERZADEH, M. J. Zygomycetes-based biorefinery: Present status and future prospects. **Bioresource technology**, v. 135, p. 523-532, 2013.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, INPE. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica no período de 2000-2005. Fundação SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São Paulo. p 156. 2008.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. D. G. Atlantic forest hotspots status: an overview. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. D. G. (Eds.). **The Atlantic Forest of South America:** biodiversity status, threats, and outlook. Washington, USA: CABS & Island Press, pp. 3–11. 2003.

GAO, S. S.; LI, X. M.; WILLIAMS, K.; PROKSCH, P.; JI, N. Y.; WANG, B. G. Rhizovarinins A–F, indole-diterpenes from the mangrove-derived endophytic fungus *Mucor irregularis* QEN-189. **Journal of natural products**, v. 79, n. 8, p. 2066-2074, 2016.

GARCIA-HERMOSO, D.; HOINARD, D.; GANTIER, J. C.; GRENOUILLET, F.; DROMER, F.; DANNAOUI, E. Molecular and phenotypic evaluation of *Lichtheimia corymbifera* (formerly *Absidia corymbifera*) complex isolates associated with human mucormycosis: rehabilitation of *L. ramosa*. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 12, p. 3862-3870, 2009.

GÓES-NETO, A.; LOGUERCIO-LEITE, C.; GUERRERO, R. T. DNA extraction from frozen fieldcollected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. **Biotemas**, v. 18, n. 2, p. 19-32, 2005.

GOTELLI, N. J.; COLWELL, R. K. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. **Ecology letters**, v. 4, n. 4, p. 379-391, 2001.

GUALDRÓN-ARENAS, C.; SUÁREZ-NAVARRO, A. L.; VALENCIA-ZAPATA, H. Hongos del suelo aislados de zonas de vegetacion natural del Paramo de Chisaca, Colombia. **Caldasia**, v.19, n.1-2, p. 235–245, 1997.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Ser** 41:95–98, 1998.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. 8º Edição. UK, Wallingford: CAB international, 1995.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological research**, v. 105, n. 12, p. 1422-1432, 2001.

HELBIG, E. **Ação da maceração prévia ao cozimento do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L) nos teores de fitatos e taninos e consequência sobre o valor protéico**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2000.

HEMASHETTAR, B. M.; PATIL, R. N.; O'DONNELL, K.; CHATURVEDI, V.; REN, P.; PADHYE, A. A. Chronic rhinofacial mucormycosis caused by *Mucor irregularis* (*Rhizomucor variabilis*) in India. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 6, p. 2372-2375, 2011.

HESELTIME, C. W.; FENNELL, D. I. The genus *Circinella*. **Mycologia**, v. 47, p.193–212, 1955.

HESELTIME, C. W.; ELLIS, J. J. The genus *Absidia*: Gongronella and cylindrical-spored species of *Absidia*. **Mycologia**, v. 56, n. 4, p. 568-601, 1964.

HESELTIME, C. W.; ELLIS, J. J. Species of *Absidia* with ovoid sporangiospores. I. **Mycologia**, v. 58, n. 5, p. 761-785, 1966.

HESELTIME, C. W. Zygomycetes in food fermentation. **Mycologist**, v. 5, p. 162-169, 1986.

HESELTIME, C. W.; FENNELL, D. I. The genus *Circinella*. **Mycologia** 7, p. 193-211, 1995.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 3, p. 509-547, 2007.

HIGASHIO, K.; YOSHIOKA, Y. Studies on milk clotting enzyme from microorganisms: milk clotting enzyme-production by ntg induced mutant of *Mucor racemosus* 50. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, v. 56, n. 9, p. 777-785, 1982.

HILL, G. T.; MITKOWSKI, N. A.; ALDRICH-WOLFE, L.; EMELE, L. R.; JURKONIE, D. D.; FICKE, A.; MALDONADO-RAMIREZ, S.; LYNCH, S. T.; NELSON, E. B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 25-36, 2000.

HOFFMANN, K.; DISCHER, S.; VOIGT, K. Revision of the genus *Absidia* (Mucorales, Zygomycetes) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant *Absidia* spp. form a coherent group, *Mycocladiaceae* fam. nov. **Mycological Research**, v. 111, p. 1169-1183, 2007.

HOFFMANN, K.; WALTHER, G.; VOIGT, K. *Mycocladus* vs. *Lichtheimia*: a correction (*Lichtheimiaceae* fam. nov., Mucorales, Mucoromycotina). **Mycol Res**, v. 113, n. 6-7, p. 275-278, 2009.

HOFFMANN, K.; VOIGT, K.; KIRK, P. M. Mortierellomycotina subphyl. nov., based on multi-gene genealogies. **Mycotaxon**, v. 115, n. 1, p. 353-363, 2011.

HOFFMANN, K.; PAWŁOWSKA, J.; WALTHER, G.; WRZOSEK, M.; HOOG, G. S.; BENNY, G. L.; KIRK, P. M.; VOIGT, K. The family structure of the *Mucorales*: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. **Persoonia**, v. 30, p. 57-76, 2013.

IBAMA-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Resumo executivo do plano de manejo da Reserva Biológica de Saltinho**. Brasília, DF: IBAMA, 2003. p.25.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: agosto 2016.

JAITLEY, A. K.; RAI, J. N. Thermophilic and thermotolerant fungi isolated from mangrove swamps. **Mycologia**, 1982.

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

KAR, B.; BANERJEE, R. Biosynthesis of tannin acyl hydrolase from tannin-rich forest residue under different fermentation conditions. **Journal of industrial Microbiology & biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 29-38, 2000.

KAVADIA, A.; KOMAITIS, M.; CHEVALOT, I.; BLANCHARD, F.; MARC, I.; AGGELIS, G. Lipid and linolenic acid accumulation in strains of Zygomycetes growing on glucose. **Journal of American Oil Chemists` Society**, v. 78, p. 341–346, 2001.

KENDRICK, B. **The Fifth Kingdom**. 3ª Edição. Ontario: Mycologue publications, 2000.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. **Dictionary of the Fungi**. 10ª Edição. UK, Wallingford: CABI, 2008.

KLOPOTEK, A. V. Distribution of hydrolytic properties among fungi from raw waste and municipal waste compost. **Zeitschrift fuer Pflanzenernaehrung und Bodenkunde (Germany, FR)**, v. 142, p. 422–433, 1979.

KRINGS, M.; TAYLOR, T. N.; DOTZLER, N. Fossil evidence of the zygomycetous fungi. **Persoonia**, v. 30, p. 1-10, 2013.

KUMAR, R.; SHARMA, J.; SINGH, R. Production of tannase from *Aspergillus ruber* under solid-state fermentation using jamun (*Syzygium cumini*) leaves. **Microbiological Research**, v. 162, n. 4, p. 384-390, 2007.

KWAŚNA, H.; ELAINE, W. A. R. D.; BATEMAN, G. L. Phylogenetic relationships among *Zygomycetes* from soil based on ITS1/2 rDNA sequences. **Mycological research**, v. 110, n. 5, p. 501-510, 2006.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. M.; HEIS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica**. 9ª Edição. São Paulo: Sarvier, 2002.

LACERDA, L. D.; MAIA, L. P.; MONTEIRO, L. H. U.; SOUZA, G. M.; BEZERRA, L. J. C.; MENEZES, M. O. T. Manguezais do Nordeste e mudanças ambientais. **Ciência Hoje**, v. 39, p. 25-29, 2006.

LAGEMAAT, J. V.; PYLE, D. L. Solid-state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase. **Chemical Engineering Journal**, v. 84, n. 2, p. 115-123, 2001.

LAGOS, A. R.; MULLER, B. L. A. Hotspot brasileiro-Mata Atlântica. **Saúde e Ambiente Revista**, v. 2, p. 35-45, 2007.

HLARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal Wand Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p.2947–2948, 2007.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; (B) Practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003.

LEE, B. K. H.; BAKER, G. E. Environment and the Distribution of Microfungi in a Hawaiian Mangrove Swamp. **Pacific Science**, v. 26, p. 11-19, 1972.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 6, p. 497-503, 1994.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. **Advances in applied microbiology**, v. 44, p. 216-260, 1997.

LI, D. M.; DE LUN, L. *Mucor irregularis* Infection and Lethal Midline Granuloma: A Case Report and Review of Published Literature. **Mycopathologia**, v. 174, n. 5-6, p. 429-439, 2012.

LIMA, D. X.; SANTIAGO, A. L. C. M.; SOUZA-MOTTA C. M. Diversity of Mucorales in natural and degraded semi-arid soils. **Brazilian Journal Botany**, v. 38, n. 1, p. 1-9, 2016a.

LIMA, D. X.; VOIGT, K.; DE SOUZA, C. A.; DE OLIVEIRA, R. J.; SOUZA-MOTTA, C. M.; SANTIAGO, A. L. D. A. Description of *Backusella constricta* sp. nov. (Mucorales, ex Zygomycota) from the Brazilian Atlantic Rainforest, including a key to species of *Backusella*. **Phytotaxa**, v. 289, n. 1, p. 59-68, 2016b.

LIMA, D. X.; SOUZA-MOTTA, C. M.; WAGNER, L.; VOIGT, K.; SOUZA, C. A. F.; OLIVEIRA, R. J. V.; SILVA, G. A.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; WALTHER, G. *Circinella simplex*—a misapplied name of *Mucor circinatus* sp. nov. **Phytotaxa**, v. 329, n. 3, p. 269-276, 2017.

LONDOÑO-HERNANDEZ, L.; RAMÍREZ, C.; RUIZ, H. A.; ASCACIO, J. A.; AGUILAR-GONZALEZ, M. A.; RODRÍGUEZ, R.; AGUILAR, C. N. *Rhizopus oryzae*—Ancient microbial resource with importance in modern food industry. **International Journal of Food Microbiology**, 2017.

LU, X. L.; LIU, Z. H.; SHEN, Y. N.; SHE, X. D.; LU, G. X.; ZHAN, P.; FU, M. H.; ZHANG, X. L.; GE, Y. P.; LIU, W. D. Primary cutaneous zygomycosis caused by *Rhizomucor variabilis*: a new endemic zygomycosis? A case report and review of 6 cases reported from China. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 3, p. e39-e43, 2009.

LU, X. L.; NAJAFZADEH, M. J.; DOLATABADI, S.; RAN, Y. P.; VAN DEN ENDE, A. G.; SHEN, Y. N. et al. Taxonomy and epidemiology of *Mucor irregularis*, agent of chronic cutaneous mucormycosis. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 30, p. 48, 2013.

MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K.; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. **Ciência e Agrotecnologia**, 2005.

MAI, J.; CHAMBERS, L. J.; MCDONALD, R. E. **Process for inhibiting lipid oxidation in food and composition thereby**. U.S. Patent n. 4,925,681, 1990.

MAIA, L. C.; CAVALCANTI, M. A.; GIBERTONI, T.; GOTO, B.T.; MELO, A. M. M. et al. Fungos. In: PÔRTO, K. C et al. (Eds.). **Diversidade biológica e conservação da Floresta Atlântica ao norte do Rio São Francisco**, Brasília, Brazil: Ministério do Meio Ambiente, 2006. p. 74–106.

MAGNUSON, J. K.; LASURE, L. L. Organic acid production by filamentous fungi. In: *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine*. **Springer**, US, p. 307-340, 2004.

MANJIT, A. Y.; AGGARWAL, N. K.; KUMAR, K.; KUMAR, A. Tannase production by *Aspergillus fumigatus* MA under solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 3023-3030, 2008.

MCNEILL, J, et al. (eds & comps) International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code), adopted by the Eighteenth International Botanical Congress, Melbourne, Australia, July 2011. Koeltz Scientific Books, Königstein, Germany. *Regnum Vegetabile* v. 154, 2012.

MESCHONAT, B.; HERRMANN, H. A.; SPANNAGEL, R.; SANDER, V.; KONIECZNY-JANDA, G.; SOMMER, M. **Enzyme pre-granules for granular fodder**. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. n. 6,221,406, 24 abr. 2001.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. ISBN 85-87459-09-0. Recife: UFRPE, 2005.

MITTERMEIER, R. A. et al. Hotspots: **Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. CEMEX, SA, Agrupación Sierra Madre, SC, 1999.

MIGULA, E. F. A. W. Kryptogamen Flora von Deutschland. Moose, Algen, Flechten und Pilze. In: Thomé, O. W. (Eds.). **Flora von Deutschland**. Leipzig: Österreich und Schweiz, 1910. p. 510.

MONDAL, K. C.; BANERJEE, D.; JANA, M.; PATI, B. R. Colorimetric assay method for determination of the tannin acyl hydrolase (EC 3.1. 1.20) activity. **Analytical Biochemistry**, v. 295, n. 2, p. 168-171, 2001.

MONTEIRO, J. M. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAUJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOURA-JÚNIOR, E. G.; SILVA, S. S. L.; LIMA, L. F.; LIMA, P. B.; DE ALMEIDA JR, E. B. et al. Diversidade de plantas aquáticas vasculares em açudes do parque estadual de Dois Irmãos (Pedi). **Revista de Geografia**, Recife, v. 26, n. 3, p. 276-293, 2010.

MUMMEY, D. L.; CLARKE, J. T.; COLE, C. A.; O'CONNOR, B. G.; GANNON, J. E.; RAMSEY, P. W. Spatial analysis reveals differences in soil microbial community interactions between adjacent coniferous forest and clearcut ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 7, p. 1138-1147, 2010.

MURUGAN, K.; SARAVANABABU, S.; ARUNACHALAM, M. Screening of tannin acyl hydrolase (EC 3.1. 1.20) producing tannery effluent fungal isolates using simple agar plate and SmF process. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 4, p. 946-949, 2007.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, K. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-845, 2000.

NOVÁKOVÁ, A. Microscopic fungi isolated from the Domica Cave system (Slovak Karst National Park, Slovakia). A review. **International Journal of Speleology**, v. 38, n. 1, p. 8, 2009.

NOUT, M. J. R.; KIERS, J. L. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 789–805, 2005.

O'DONNELL, K. L. **Zygomycetes in culture**. Universidade da Geórgia, 1979.

O'DONNELL, K.; LUTZONI, F. M.; WARD, T. J.; BENNY, G. L. Evolutionary relationships among mucoralean fungi (Zygomycota): evidence for family polyphyly on a large scale. **Mycologia**, v. 93, p. 286–297, 2001.

OGBONNA, C. I. C.; PUGH, G. J. F. Nigerian soil fungi. **Nova Hedwigia**, v.36, p. 795–808, 1982.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; CARVALHO, D. A. Florística e fisionomia da vegetação no extremo norte do litoral da Paraíba. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 16, n. 1, p. 115–130, 1993.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, v. 32, n. 4, p. 793–810, 2000.

OLIVEIRA, L. G.; CAVALCANTI, M. A. Q.; FERNANDES, M. J. S.; LIMA, D. M. M. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. **Journal of arid environments**, v. 95, p. 49–54, 2013.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97–109, 2012.

ORLOWSKI, M. *Mucor* Dimorphism. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 2, p. 234–258, 1991.

PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; PALNI, L. M. S. The rhizosphere effect in trees of the Indian Central Himalaya with special reference to altitude. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 5, n. 1, p. 93-102, 2007.

PARTIDA-MARTINEZ, L. P.; HERTWECK, C. Pathogenic fungus harbors endosymbiotic bacteria for toxin production. **Nature**, v. 437, p. 884–888, 2005.

PERIES, O. S.; LIYANAGE, A. D. S.; LIYANAGE, N. I. S. Fungi associated with rubber growing soils in Sri Lanka. **Journal of the Rubber Research Institute of Sri Lanka**, v.56, p. 9–20, 1979.

PFENNING, L. H.; ABREU, L. M. Diversity of microfungi in tropical soils. In: MOREIRA, F. M.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Eds.). **Soil Biodiversity in Amazonian and Other Brazilian Ecosystems**. UK, Wallingford: CABI, p. 184–205. 2006.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. **EMBRAPA Comunicado técnico online**, 2005a.

PINTO, G. A. S.; COURI, S.; LEITE, S. G. F.; BRITO, E. S. Tanase: conceitos, produção e aplicação. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamentos**, v.23, n.2, p.435-462, 2005b.

PUGH, G. J. F. Strategies in fungal ecology. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 75, n. 1, p. IN1, 1-14, 1980.

PUROHIT, J. S.; DUTTA, J. R.; NANDA, R. K.; BANERJEE, R. Strain improvement for tannase production from co-culture of *Aspergillus foetidus* and *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 795-801, 2006.

RADNAABAZAR, C.; PARK, C. M.; KIM, J. H.; CHA, J.; SONG, Y. S. Fibrinolytic and antiplatelet aggregation properties of a recombinant *Cheonggukjang* kinase. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 6, p. 625-9, 2011.

RAHARDJO, Y. S.; SIE, S.; WEBER, F. J.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Effect of low oxygen concentrations on growth and α -amylase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems. **Biomolecular engineering**, v. 21, n. 6, p. 163-17, 2005.

RAMBELLI, A.; PERSIANI, A. M.; MAGGI, O.; ONOFRI, S.; RIESS, S.; DOWGIALLO, G.; ZUCCONI, L. Comparative studies on microfungi in tropical ecosystems. Further mycological studies in South Western Ivory Coast forest. Report N. 2. **Plant Biosystem**, v. 118, n. 5-6, p. 201-243, 1984.

RAVIKUMAR, K.; DAKSHAYINI, J.; GIRISHA, S.T. Biodiesel production from oleaginous fungi. **International Journal of Life Sciences**, v. 6, n. 1, p. 43-49, 2012.

REIS, A.S.; FANTINI, A.C.; REIS, M.S.; GUERRA, M.P.; DOEBELI, G. Aspectos sobre a conservação da biodiversidade e o manejo da floresta tropical Atlântica. **Revista do Instituto Florestal**, v. 4, 169-173, 1992.

REIS, A. A vegetação original do Estado de Santa Catarina. In: **Caracterização de estádios sucessionais na vegetação catarinense**. Florianópolis: UFSC, 1995. pp 3-22.

RESENDE, M.; LANI, J. L.; REZENDE, S. B. Pedossistemas da Mata Atlântica: considerações pertinentes sobre sustentabilidade. **Revista Árvore**, v. 26, n. 3, p. 261-269, 2002.

RIBEIRO, E. M. S.; RAMOS, E. M. N. F.; SILVA, J. S. B. Impactos Ambientais Causados pelo Uso Público em Áreas Naturais do Parque Estadual de Dois Irmãos, Recife-PE. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. pg. 72-74, 2007.

RIBES, J. A.; VANOVER-SAMS, C. L.; BAKER, D. J. Zygomycetes in human disease. **Clinical Microbiology Reviews**, 13, p. 236-301, 2000.

RICHARDSON, M. The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 2-9, 2009.

RIZZINI, C. T. Nota prévia sobre a divisão fitogeográfica (florístico-sociológica) do Brasil. **Revista Brasileira de Geografia**, v. 25, n. 1, p. 3-64, 1963.

RIZZINI, C. T. **Tratado de fitogeografia do Brasil**: Aspectos sociológicos e florísticos. São Paulo: HUCITEC, 1979. p 374.

RIZZINI, C. T. **Tratado de Fitogeografia do Brasil**: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda., 1997. pp 747.

RODEN, M. M.; ZAOUTIS, T. E.; BUCHANAN, W. L.; KNUDSEN, T. A.; SARKISOVA, T. A.; SCHAUFEELE, R. L.; SEIN, M.; SEIN, T.; CHIOU, C. C.; KONTOYIANNIS, J. H. C. D. P.; WALSH, T. J.; Epidemiology and outcome of Zygomycosis: a review of 929 reported cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 634–653, 2005.

RODERJAN, C. V.; GALVÃO, F.; KUNIYOSHI, Y. S.; HATSCHBACH, G. G. As unidades fitogeográficas do estado do Paraná. **Ciência e Ambiente**, v. 20, p. 42-75, 2002.

RODRIGUES, R. C.; ARAUJO, H. F.; LYRA-NEVES, R. M.; TELINO-JÚNIOR, W. R.; BOTELHO, C. N. M. Caracterização da Avifauna na Área de Proteção Ambiental de Guadalupe, Pernambuco. **Ornithologia**, v. 2, n. 1, p. 47-61, 2010.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

ROUT, S.; BANERJEE, R. Production of tannase under solid state fermentation and its application in fruit juice debittering. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 5, p.346-350, 2006.

ROZANE, D. E.; DAREZZO, R. J.; AGUIAR, R. L.; AGUILERA, G. H. A.; ZAMBOLIM, L. Manga: produção integrada, industrialização e comercialização. **Viçosa: UFV**, 2004.

ROZANE, D.E.; NATALE, W.; PRADO, R.D.M.; BARBOSA, J.C. Amostragem para diagnose do estado nutricional de mangueiras. **Revista Brasileira de Fruticultura** v. 29, n. 2, p.371-376, 2007.

SABU, A.; PANDEY, A.; DAUD, M. J.; SZAKACS, G. Tamarind seed powder and palm kernel cake: two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 11, p. 1223-1228, 2005.

SAMPAIO, D.; SOUZA, V. C.; OLIVEIRA, A. A; PAULA-SOUZA, J.; RODRIGUES, R. R. Árvores da Restinga: Guia de identificação. **Neotrópica**, v.25, p.30, 2005.

SANTIAGO, A. L. C. M. A.; SOUZA-MOTTA, C. M. Mucorales isolados do solo de mineração de cobre e produção de amilase e inulinase. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 641-647, 2006.

SANTIAGO, A. L. C. M. A.; CAVALCANTI, M. A. Q.; TRUFEM, S. F. B. *Pilobolus* (Mucoraceae) from herbivore dung in Recife, Pernambuco, Brazil. **Mycotaxon**, v. 104, p. 111-122, 2008.

SANTIAGO, A. L. C. M. D.; TRUFEM, S. F. B.; MALOSSO, E.; SANTOS, P. J. P. D.; CAVALCANTI, M. A. D. Q. Zygomycetes from herbivore dung in the ecological reserve of Dois Irmãos, Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 89-95, 2011.

SANTIAGO, A. L. C. M. A.; SANTOS, P. J. P.; MAIA, L. C. Mucorales from the semiarid of Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, p.1678-4405, 2013.

SANTIAGO, A. L. C. M. A.; HOFFMANN, K.; LIMA, D. X.; OLIVEIRA, R. J. V.; VIEIRA, H. E. E.; MALOSSO, E.; MAIA, L. C.; DA SILVA, G. A. A new species of *Lichtheimia* (Mucoromycotina, Mucorales) isolated from Brazilian soil. **Mycological Progress**, v. 13, n. 2, p. 343-352, 2014.

SANTOS, V. B.; WELLBAUM, C.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H. Fungos filamentosos do solo da Ilha dos Eucaliptos na represa do Guarapiranga em São Paulo, SP. **Acta Botanica Brasilica**, v. 12, n. 1, p. 101-110, 1998.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 12, p. 3875-3883, 1991.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Manguezal: Ecossistema que ultrapassa suas próprias fronteiras. In: **Congresso Nacional de Botânica**, Recife, p 34-37, 2002.

SCHELL, W. A.; O'DONNELL, K.; ALSPAUGH, J. A. Heterothallic mating in *Mucor irregularis* and first isolate of the species outside of Asia. **Medical Mycology**, v. 49, n. 7, p. 714-723, 2011.

SCHIPPER, M. A. A. A study on variability in *Mucor hiemalis* and related species. **Studies in Mycology**, v.4, p.1-40, 1973.

SCHIPPER, M. A. A. On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species. **Studies in Mycology**, v.17, p.1-69, 1978.

SCHIPPER, M. A. A. A revision of the genus *Rhizopus* I. The *Rhizopus stolonifer* group and *Rhizopus oryzae*. **Studies in Mycology**, v.25, p.1-34, 1984.

SCHIPPER, M. A. A. On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species. **Studies in Mycology**, v.25, p.1-53, 1990.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; TRUFEM, S. F. B.; MALATINSKY, S. M. M.; NINOMIYA, A.; ANTUNES, M. F. R. Mucorales (Zygomycotina) from soil affected by excrement of birds in the "Parque Estadual das Fontes do Ipiranga", Sao Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.19, n.1, p.7-10, 1996.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; MILANEZ, A. I. Mucorales (Zygomycotina) da Mata Atlântica da reserva biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André, SP. **Acta Botanica Brasilica**, v. 11, p. 1, 1997.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; MILANEZ, A. I. Fungos microscópicos da Mata Atlântica de Paranapiacaba, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.21, n.1, p.73-79, 1998.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; MILANEZ, A. I.; TRUFEM, S. F. B.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A.; GRANDI, R. A. P.; SANTOS, M. L.; GIUSTRA, K. C. Microscopic fungi in the Atlantic Rainforest in Cubatão, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 267-275, 2006.

SCHÜLEIN, M. Protein engineering of cellulases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n. 2, p. 239-252, 2000.

SHARMA, S.; BHAT, T. K.; DAWRA, R. K. A. Spectrophotometric Method for Assay of Tannase Using Rhodanine. **Analytical Biochemistry**, v.279, p.85-89, 2000.

SHARMA, S.; GUPTA, M. N. Synthesis of antioxidant propyl gallate using tannase from *Aspergillus niger* van Teighem in nonaqueous media. **Bioorganic Medicinal Chemical Letters**, v. 13, p. 395-397, 2003.

SILVA, S. M.; BRITZ, R. M. A vegetação da Planície Costeira. In: Marques, M. C. M.; Britz, R. M. (Org.). **História Natural e conservação da Ilha do Mel**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005. pp 49-84.

SILVA, G. A. B.; ALMEIDA, W. E. S.; CORTES, M. S.; MARTINS, E. S. Production and characterization of protease from *Gliocladium verticilloides* by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 28-41, 2009.

SLADKA, A.; OTTOVÁ, V. The most common fungi in biological treatment plants. **Hydrobiologia**, v. 31, n. 3, p. 350–362, 1968.

Statsoft. Statistica for Windows 5.1. CD ROM. Tulsa, StatSoft Inc. 1997.

SKIADA, A.; PAGANO, L.; GROLL, A.; ZIMMERLI, S.; DUPONT, B. et al. Zygomycosis in Europe: analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology ECMM Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1859–1867, 2011.

SOS MATA ATLÂNTICA. 2011. Disponível em: <http://www.sosmatatlantica.org.br/observatorio/plmataatlantica.html>. Acesso em: 22/01/2018.

SPATAFORA, J.W. et al. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* v. 108. n. 5, p. 1028–1046, 2016.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 132-138, 2005.

TAUK-TORNISIELO, S. M.; GARLIPP, A.; RUEGGER, M.; ATTILI, D. S.; MALAGUTTI, E. Soilborne filamentous fungi in Brazil. **Journal of basic microbiology**, 45, n. 1, p. 72-82, 2005.

TAVARES, S. Contribuição ao estudo da cobertura vegetal dos tabuleiros do Nordeste. **Boletim de Recursos Naturais**, v. 2, p. 13-25, 1964.

THOMAS, M. R.; SHATTOCK, R. C. Filamentous fungal associations in the Phylloplane of *Lolium perenne*. **The British Mycological**, v.87, n.2, p.255–268, 1986.

TOMITA, H.; MUROI, E.; TAKENAKA, M.; NISHIMOTO, K.; KAKEYA, H. et al. *Rhizomucor variabilis* infection in human cutaneous mucormycosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.36, p.312–314, 2011.

TRUFEM, S. F. B. Mucorales do Estado de São Paulo 1: Gênero *Mucor* Micheli. **Rickia**, v. 9, p. 81-91, 1981a.

TRUFEM, S.F.B. Mucorales do Estado de São Paulo 2: Gêneros *Absidia* van Tieghem, *Gongronella* Ribaldi e *Rhizopus* Ehrenberg. **Rickia**, v. 9, p. 99-106, 1981b.

TRUFEM, S. F. B. Mucorales do Estado de São Paulo 3. Gêneros *Circinella* van Tieghem, Le Monnier e *Cunninghamella* Matruchot. **Rickia**, v. 9, p. 113-120, 1981c.

TRUFEM, S. F. B.; MAIA, L. C.; MOTTA, C. M. S.; SANTIAGO, A. L. C. M. A. Filo Zygomycota (Capítulo V). In: Gusmão, L. F. P.; Maia, L. C.; (Org.). **Diversidade e caracterização dos fungos do Semi-árido Brasileiro**. Recife: Associação Plantas do Nordeste-APNE, v. II, p. 97-107, 2006.

VAN TIEGHEM, P. Nouvelles recherches sur les Mucorinees. **Ann. Sci. Nat**, v.1, p.5–175, 1875.

VAN TIEGHEM, P. Troisième mémoire sur les Mucorinées. **Annales des Sciences Naturelles-Botanique et Biologie Vegetale**, v. 4, n. 4, p. 312-399, 1878.

VAN TUINEN, D.; ZHAO, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V. **PCR in studies of AM fungi: from primers to application**. In: VARMA, A. K. (Eds.). *Berlim: Mycorrhizal manual*, Springer, 1998. p. 387–399.

VÁNOVÁ, M. Contribution to the taxonomy of the genus *Absidia* (Mucorales) I. *Absidia macrospora* sp. nov. **Ceská Mykologie**, v. 22, p. 297-300, 1968.

VARGHESE, G. Soil microflora of plantations and natural rain forest of west Malaysia. **Mycopathologia et Mycologia applicate**, v. 48, p. 43-61, 1972.

VELÁZQUEZ-CEDENO, M. A.; MATA, G.; SAVOIE, J. M. Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 201-207, 2002.

VIIKARI, L.; ALAPURANEN, M.; PURANEN, T.; VEHEMAANPERÄ, J.; SIIKA-AHO, M. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. **Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 108, p. 121–145, 2007.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C.N.; DE JESUS RÓMERO-GOMEZ, S.; DIAZ-GODINEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 157-167, 2003.

VIRIATO, A. **Mucorales (Zygomycota) coprófilos e de solo: diversidade e aspectos ecológicos**. Dissertação de Mestrado, São Paulo. pp 162. 2003.

VOIGT, K; OLSSON, I. Molecular phylogenetic and scanning electron microscopical analysis places the Choanephoraceae and the Gilbertellaceae in a monophyletic group within the Mucorales (Zygomycetes, Fungi). **Acta Biologica Hungarica**, v. 59, p. 365-383, 2008.

VOIGT, K.; HOFFMANN, K., EINAX, E.; ECKART, M.; PAPP, T.; VÁGVÖLGYI, C.; OLSSON, L. Revision of the family structure of the Mucorales (Mucoromycotina, Zygomycetes) based on multigene-genealogies: Phylogenetic analyses suggest a bigeneric Phycomyetaceae with *Spinellus* as sister group to *Phycomyces*. In: GHERBAWY, Y.; MACH, R. L.; RAI, M.K. Rai. [Eds.]. Current Advances in Molecular Mycology. **Nova Science Publishers**, Hauppauge, New York, pp. 313-332, 2009.

VOIGT, K.; KIRK, P.M. Fungi classification of Zygomycetes: reappraisal as coherent class based on a comparison between traditional versus molecular systematics. In: Batt, C.A.; Tortorello, M.L. (eds) Encyclopedia of food microbiology, 2nd edn. Elsevier B.V, London, pp. 54–67, 2014.

ZAFAR, S.; AQIL, F.; AHMAD, I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2557-2561, 2007.

ZIBILSKE, L. M.; WAGNER, G. H. Bacterial growth and fungal genera distribution in soil amended with sewage sludge containing cadmium, chromium, and copper. **Soil Science**, v. 134, n. 6, p. 364-370, 1982.

ZHANG, X.; YUN, L.; PENG, L. Optimization of Douchi fibrinolytic enzyme production by statistical experimental methods. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**, v. 33, n. 1, p. 153–8, 2013.

ZHAO, Y.; ZHANG, Q. Q.; LI, L.; ZHU, J.; KANG, K.; CHEN, L. Primary cutaneous mucormycosis caused by *Rhizomucor variabilis* in an immunocompetent patient. **Mycopathologia**, v.168, p.243–247, 2009.

ZHENG, R. Y.; CHEN, C. Q. A non-thermophilic *Rhizomucor* causing human primary cutaneous mucormycosis. **Mycosystema**, v.4, p.45–57, 1991.

ZHENG, R. Y.; CHEN, G. Q. A. Monograph of *Cunninghamella*. **Mycotaxon**, v.80, p.1-75, 2001.

ZHENG, R. Y.; CHEN, G. Q.; HUANG, H.; LIU, X.; Y. A Monograph a *Rhizopus*. **Sydowia**, v.59, n.2, p.273-372, 2007.

ZYCHA, H. **Mucorineae**. Mark Brandenburg: Kryptogamenflora, Pilze II. v.6, n.1, p.264, 1935.

WALTHER, G.; PAWŁOWSKA, J.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; WRZOSEK, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; DOLATABADI, S.; CHAKRABARTI, A. DE HOOG, G. S. DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. **Persoonia**, v.30, p.11–47, 2013.

WARCUP, J. H. The ecology of soil fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 34, n. 3, p. 376-399, 1951.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. J. W. T.; TAYLOR, J. L Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic, 1990. p 315–322.

WHITE, M. M.; JAMES, T. Y.; O'DONNELL, K. O.; CAFARO, M. J.; TANABE, Y.; SUGIYAMA, J. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 872–884, 2006.

WU, T.; ZIVANOVIC, S.; DRAUGHON, F. A.; CONWAY, W. S.; SAMS, C. A. Physicochemical Properties and Bioactivity of Fungal Chitin and Chitosan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3888-3894, 2005.

YAN, G.; VIRARAGHAVAN, T. Heavy metals removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. **Water Research**, v. 37, n. 18, p. 4486-4496, 2003.

YEGIN, S.; FERNANDEZ-LAHORE, M.; SALGADO, A. J. G.; GUVENC, U.;
GOKSUNGUR, Y.; TARI, C. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing.
Applied microbiology and biotechnology, v. 89, n. 4, p. 949-960, 2011.

ANEXO A - ARTICLE PHYTOTAXA

ISSN 1179-3155 (print edition)

ISSN 1179-3163 (online edition)

Accepted by Kevin Hyde: 25 Nov. 2016; published: 20 Dec. 2016

<http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.289.1.4>

**DESCRIPTION OF *BACKUSELLA CONSTRICTA* SP. NOV. (MUCORALES, EX
ZYGOMYCOTA) FROM THE BRAZILIAN ATLANTIC RAINFOREST,
INCLUDING A KEY TO SPECIES OF *BACKUSELLA***

DIOGO X. LIMA^{1,2}, KERSTIN VOIGT², CARLOS A.F. DE SOUZA¹, RAFAEL J.V. DE OLIVEIRA¹, CRISTINA M. SOUZA-MOTTA¹ & ANDRÉ L.C.M. DE A. SANTIAGO^{1*}

¹Post-graduate course in the Biology of Fungi. Department of Mycology. Federal University of Pernambuco. Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, 50670-420, Recife, PE, Brazil.

²Jena Microbial Resource Collection, strain collection of the University of Jena and the Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology. Adolf-Reichwein-Strasse 23, 07745 Jena, Germany

* Corresponding author. E-mail: andrelcabral@msn.com Phone/Fax: +55 (81) 2126-8948

Abstract

The *Backusella* genus comprises mucoralean saprobes that inhabit in mainly soil and form transitorily curved (when young, erect at maturity) sporangiophores arising directly from the substratum, with simultaneous production of both sporangia and sporangiola. During a study of Mucorales in soil from an Atlantic Rainforest in Pernambuco, Brazil, one specimen of *Backusella* was isolated and characterized based on morphological, physiological and molecular data (ITS1-5.8S-ITS2 and LSU rDNA sequences). The phylogenetic analyses of the isolate revealed that it belongs to the Backusellaceae and is closely related to species of *Backusella*. The specimen grew better at 25°C, with no development at 40°C, and presented conical and cylindrical columellae possessing a central constriction as well as subglobose sporangiospores 7.5–15 × 5.5–10 µm. Based on the evidences of the analyzed datasets, a new species of *Backusella* is proposed and a taxonomic key for the species of this genus is provided.

Keywords: *Backusellaceae*, soil, taxonomy, molecular phylogeny, ribosomal DNA (rDNA)

ANEXO B - ARTICLE PHYTOTAXA

ISSN 1179-3155 (print edition)

ISSN 1179-3163 (online edition)

Accepted by Kevin Hyde: 8 Nov. 2017; published: 1 Dec. 2017

<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.329.3.8>

***CIRCINELLA SIMPLEX*—A MISAPPLIED NAME OF *MUCOR CIRCINATUS* SP. NOV.**

DIOGO X. LIMA^{1, 2*}, CRISTINA M. SOUZA-MOTTA¹, LYSETT WAGNER³,
KERSTIN VOIGT², CARLOS A. F. DE SOUZA¹, RAFAEL J. V. DE OLIVEIRA¹,
GLADSTONE A. DA SILVA¹, ANDRÉ L. C. M. DE AZEVEDO SANTIAGO¹ & GRIT
WALTHER³

¹Post-graduate course in the Biology of Fungi. Department of Mycology. Federal University of Pernambuco.
Av. Prof. Nelson Chaves,
s/n, 50670-420, Recife, PE, Brazil.

²Jena Microbial Resource Collection, strain collection of the University of Jena and the Leibniz Institute for
Natural Product Research
and Infection Biology. Adolf-Reichwein-Strasse 23, 07745 Jena, Germany

³National Reference Center for Invasive Mycoses (NRZMyk), Leibniz Institute for Natural Product Research and
Infection Biology. Adolf
Reichwein-Strasse 23, 07745 Jena, Germany

* Corresponding author. E-mail: diogo_xavier00@hotmail.com

Abstract

Circinella (Mucorales, Mucoromycotina) is morphologically similar to *Mucor*, differing by the production of circinate sporangiophores and sporangia with a persistent and incrustated sporangial wall. During a study on the diversity of Mucorales in areas of the Atlantic Rainforest in Brazil, we isolated a strain that fits the current morphological concept of *C. simplex* of Hesseltine and Fennell (1955) by forming simple circinate sporangiophores with secondary branches and angular sporangiospores. Molecular phylogenetic analyses based on three different markers (ITS, LSU and MCM7) confirmed conspecificity of the Brazilian strain with other angular spored strains of the CBS collection including the strain studied by Hesseltine & Fennell (1955). The molecular phylogenetic analyses clearly placed these strains in the genus *Mucor* in the close relationship to *M. laxorhizus* and *M. fuscus*. However, in his original description van Tieghem (1875) described and illustrated *C. simplex* with sporangiophores without secondary branches and globose sporangiospores. Based on these striking morphological differences combined with a differing geographic distribution, we conclude that the angular-spored strains represent a separate undescribed species for which we propose the name *Mucor circinatus* sp. nov.

Keywords: molecular phylogeny, Mucorales, Mucoromycotina, taxonomy