

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Vítor Ribeiro Halfeld

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE MICROEUCARIOTOS  
CILIADOS (ALVEOLATA, CILIOPHORA) ENCONTRADOS EM AMBIENTES  
POUCO EXPLORADOS

Juiz de Fora

2014

Vitor Ribeiro Halfeld

Caracterização morfológica e molecular de microeucariotos ciliados (Alveolata,  
Ciliophora) encontrados em ambientes pouco explorados

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas –  
Comportamento e Biologia Animal da  
Universidade Federal de Juiz de Fora  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias  
Co-orientadora: Profa. Dra. Marta Tavares d'Agosto  
Colaborador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Xavier Senra

Juiz de Fora

2014

Halfeld, Vítor Ribeiro .  
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE MICROEUCARIOTOS  
CILIADOS (ALVEOLATA, CILIOPHORA) ENCONTRADOS EM AMBIENTES  
POUCO EXPLORADOS / Vítor Ribeiro Halfeld. -- 2014.  
67 p. : il.

Orientador: Roberto Júnio Pedroso Dias  
Coorientadora: Marta Tavares d'Agosto  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2014.

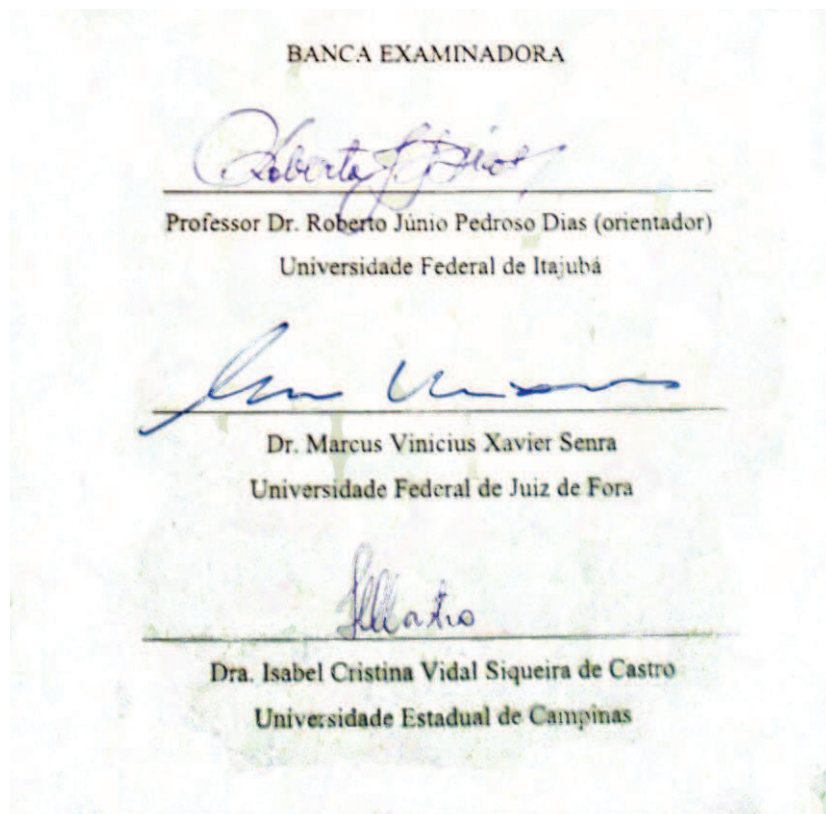
1. Protozoologia. 2. Tanques de Bromélias. 3. Líquens. 4.  
Espécies Novas. I. Dias, Roberto Júnio Pedroso , orient. II.  
d'Agosto, Marta Tavares, coorient. III. Título.

Vítor Ribeiro Halfeld

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE MICROEUCARIOTOS  
CILIADOS (ALVEOLATA, CILIOPHORA) ENCONTRADOS EM AMBIENTES POUCO  
EXPLORADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 25 de fevereiro de 2014



(...) Eu, disforme, lançava-me sobre as belas formas das Tuas criaturas (...)

Santo Agostinho

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Fundamento de Toda Paz, Doce Alívio e Verdadeira Sabedoria, pelas oportunidades de crescimento neste período de mestrado e pela zelosa companhia!

Agradeço aos meus pais, Luiz Carlos e Maria de Lourdes, pelos incentivos e pela confiança perene em mim. Aos meus irmãos, Leonardo e Raíza, pela convivência e por serem exemplos de determinação e força. Família, obrigado pelo carinho e por todo amparo!

Agradeço ao professor Roberto Dias pela amizade, por ser minha referência profissional, pela orientação e pela solicitude diante das adversidades da pesquisa. Agradeço por ter apoiado minha ousadia de ser biólogo, enaltecendo, lapidando e ampliando meu entendimento sobre a vida acadêmica.

Agradeço à professora Marta d'Agosto por viabilizar meu desenvolvimento acadêmico na área de pesquisa.

Ao professor Inácio Domingos da Silva Neto, da Universidade Federal do Rio de Janeiro e ao biólogo Orlando Simões, pelo auxílio com a técnica do protargol.

Ao doutor Marcus Senra, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela disponibilidade e colaboração com o desenvolvimento das análises moleculares que compõem parte relevante desta dissertação.

Ao doutor Thiago Paiva, também da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo auxílio com a identificação de algumas espécies de ciliados.

À mestranda Franciane Cedrola, por ter padronizado os primeiros protocolos da técnica de impregnação pelo carbonato de prata no Laboratório de Protozoologia da UFJF.

Aos professores do curso de Mestrado, Sthefane D'ávila, Erik Daemon e Roberto da Gama, pelo exemplo de profissionalismo, compromisso e docência, demonstrados a cada encontro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

Aos mestrandos Emanuel de Almeida, pela amizade de longa data, e Roberto Marchesini, pelo companheirismo. E aos demais membros do Laboratório de Protozoologia e do Mestrado, por todos terem contribuído, cada um ao seu modo, para minha formação.

Registro um agradecimento especial à Drielle Andrade Belgo, pelo companheirismo, atenção e amor, e pelas inúmeras palavras de incentivo e perseverança, que tornaram possível a conclusão deste trabalho de modo mais agradável e repleto de aprendizado.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Seção I

Figura 1	Localização do Jardim Botânico da UFJF no município de Juiz de Fora, com delimitação da área de amostragem, imagem da vegetação local, das bromélias <i>Portea petropolitana</i> e <i>Alcantarea imperialis</i> , e do processo de coleta do conteúdo fitotelmal.....	28
Figura 2	Micrografias <i>in vivo</i> de <i>Ballaenothrix bromelicola</i> gen. nov., sp. nov.....	32
Figura 3	Esquemas das alterações morfológicas observadas no ciclo de vida de <i>Ballaenothrix bromelicola</i> gen. nov., sp. nov.....	33
Figura 4	<i>Ballaenothrix bromelicola</i> gen. nov., sp. nov. impregnado pelo carbonato de prata durante intérfase e fissão binária.....	34
Figura 5	Detalhes da infraciliatura de <i>Ballaenothrix bromelicola</i> gen. nov., sp. nov. após impregnação pelo carbonato de prata.....	35
Figura 6	Comparação entre ontogenia das protomembranelas de <i>Ballaenothrix bromelicola</i> gen. nov., sp. nov. e <i>Tetrahymena</i> spp.....	36
Figura 7	Destaque da infraciliatura das regiões anterior e posterior de <i>Ballaenothrix bromelicola</i> gen. nov., sp. nov.....	36
Figura 8	Alterações macronucleares durante o processo de morfogênese.....	38
Figura 9	Árvore filogenética com base em sequências 18S-rDNA.....	39
Figura 10	Árvore filogenética com base em sequências COI.....	40

### Seção II

Figura 1	Morfoespécies de ciliados encontradas em líquens no campus da UFJF.....	51
Figura 2	<i>Anteholosticha intermedia</i> , <i>Phacodinium metchnikoffi</i> , <i>Cyrtohymina tetracirrata</i> e <i>Epispathidium amphoriforme</i> impregnados pelo proteinato de prata.....	53
Figura 3	<i>Pattersoniella vitiphila</i> impregnada pelo protargol e em micrografia eletrônica de varredura.....	54

Figura 4	<i>Bresslauides discoideus</i> impregnado pelo protargol e em micrografia eletrônica de varredura e <i>Blepharisma sinuosum</i> em micrografia eletrônica de varredura.....	55
Figura 5	<i>Urosoma karinae</i> impregnado pelo protargol. <i>Colpoda cucullus</i> , <i>Colpoda inflata</i> e <i>Vorticella gracilis</i> em micrografias eletrônicas de varredura.....	56
Figura 6	<i>Hemycicliostyla</i> sp. nov. impregnados pelo proteinato de prata.....	58



## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Espécies de ciliados registrados em tanques de bromélias em diversas localidades.....	14
Quadro 2	Ciliados registrados em amostras de fungos liquenizados em diferentes regiões do mundo.....	19
Tabela 1	Morfometria de <i>Ballaenothrix bromelicola</i> gen. nov., sp. nov.....	31
Quadro 3	Comparação entre o novo ciliado descrito e os demais gêneros da família Tetrahymenidae.....	42
Quadro 4	Espécies de ciliados identificadas em amostras de líquens do campus da UFJF.....	52
Quadro 5	Morfometria de <i>Hemicycliostyla</i> sp. nov.....	57
Quadro 6	Comparação de <i>Hemicycliostyla</i> sp. n. com as demais espécies do gênero.....	61

## SUMÁRIO

Introdução.....	11
Revisão de Literatura.....	13
Escopo do Trabalho.....	22
Seção I	
1.1 Introdução.....	23
1.2 Material e Métodos.....	24
1.3 Resultados.....	29
1.4 Discussão.....	41
1.5 Conclusão.....	44
1.6 Referências Bibliográficas.....	44
Seção II	
2.1 Introdução.....	48
2.2 Material e Métodos.....	59
2.3 Resultados.....	50
2.4 Discussão.....	59
2.5 Conclusão.....	61
2.6 Referências Bibliográficas.....	62
Considerações Finais.....	64
Referências Bibliográficas.....	65

## INTRODUÇÃO

O filo Ciliophora Doflein, 1901 constitui um táxon monofilético de organismos eucariontes, unicelulares e heterotróficos, definido por três principais caracteres: (1) cílios derivados de cinetossomos associados a estruturas fibrilares (fibra cinetodesmal, microtúbulos transversos e microtúbulos pós-ciliares), (2) dimorfismo nuclear (macro e micronúcleos) e (3) reprodução sexuada pelo processo de conjugação. Estes micro-organismos apresentam um sistema alveolar constituído por sáculos membranosos dispostos abaixo da membrana plasmática. Essa característica constitui uma sinapomorfia que inclui os Ciliophora em um clado maior, denominado Alveolata, juntamente com os filos Apicomplexa e Dinoflagellata, além de vários flagelados, como o gênero *Colpodella*, relacionados com a base do clado Apicomplexa (LYNN, 2008). WRIGHT & LYNN (1997c) realizaram um estudo sobre a filogenia dos Ciliophora com base no padrão de evolução de pequenas subunidades de sequências rDNA, e estimaram que este filo teve sua origem durante o éon proterozóico, há aproximadamente 2 bilhões de anos atrás.

Atualmente há onze classes de ciliados reconhecidas, divididas em dois subfilos. O sub-filo Postciliodesmatophora Lynn, 1996 reúne as classes Karyorelictea e Heterotrichea. Por sua vez, o sub-filo Intramacronucleata Lynn, 1996 reúne as demais nove classes (Spirotrichea, Amorphorea, Litostomatea, Phyllopharyngea, Nassophorea, Colpodea, Prostomatea, Plagiopylea e Oligohymenophorea), caracterizadas por apresentar macronúcleo poliplóide dividido por microtúbulos internos (LYNN, 2008).

São reconhecidas cerca de 12.000 espécies de ciliados. Estes micro-organismos integram comunidades de ambientes marinhos, de água salobra, dulcícolas e edáficos. Há espécies de vida livre, sésseis ou livre-natantes; e espécies que ocorrem associadas a outros organismos (UTZ & COATS, 2005; BOURLAND & STRÜDER-KYPKE, 2010; SABAGH *et al.*, 2011), como epibiontes, parasitas, foréticas e comensais.

FENCHEL & FINLAY (2004) relacionaram a distribuição geográfica de populações de protistas e metazoários com o tamanho corpóreo destes organismos. Os referidos autores argumentam que a razão entre a diversidade local e a diversidade global de microeucariotos apresenta valores elevados quando comparados ao que se observa para metazoários e plantas com tamanho superior a 1 milímetro. HILLEMBREND & AZOVSKY (2001) constataram que o efeito do gradiente latitudinal de diversidade decresce também em função do tamanho dos organismos, sendo praticamente nulo para micro-organismos. Dessa forma, muitos

microbiologistas defendem que a maior parte das espécies de ciliados apresenta distribuição geográfica ubíqua.

Entretanto, FOISSNER *et al.* (2003) e FOISSNER (2006, 2009) têm demonstrado que o padrão de distribuição das populações de ciliados é estruturalmente mais semelhante às populações de metazoários do que às de procariontes. Visto que a diversidade de protistas é praticamente desconhecida em diversas regiões do globo, FOISSNER (2009) não considera a relação “diversidade local/global” como um estimador eficaz da diversidade de ciliados. Com base no percentual de espécies endêmicas descritas nos últimos 20 anos, nas limitações das técnicas de cultivo e no total de habitats pouco explorados pelos ciliatologistas, estima-se, que existam em torno de 30.000 espécies de ciliados, sendo 30% delas endêmicas.

Espécies de ciliados caracterizadas por grande tamanho, coloração e/ou morfologia conspícua e pelo endemismo são denominadas *flagships* (espécies estandartes, em uma tradução livre) (FOISSNER, 2006). São exemplos de ciliados *flagships*: *Bresslauides discoideus* Kahl, 1930, encontrado em solos e líquens no hemisfério Norte; *Circinella arenicola* Foissner, 1994, ciliado endêmico da América do Norte; um tetrahymenídeo gigante, ainda não descrito, encontrado por FOISSNER *et al.* (2003) em tanques de bromélias da República Dominicana, entre tantos outros. Todos esses táxons apresentam distribuição geográfica restrita, e, por isso, os *flagships* são considerados a mais forte evidência contra o modelo da ubiquidade, defendido por alguns microbiologistas. FOISSNER (2006) afirma que a descoberta de *flagships* é relativamente comum em micro-habitats pouco explorados, como tanques de bromélias, líquens, musgos e ambientes marinhos na América do Sul e na África. Em estudo sobre a diversidade da ciliatofauna em amostras de fitotelmos de 15 espécies de bromélias coletadas na República Dominicana, Equador e na região norte do Brasil, FOISSNER *et al.* (2003) registrou 10 novas espécies de ciliados, algumas destas representando também novos gêneros e novas famílias. Destas, duas espécies foram caracterizadas como *flagships*. Diante desses fatos, a realização de inventários da taxocenose de ciliados em micro-habitats especializados se mostra relevante, haja visto que trabalhos com esse escopo contribuem para o conhecimento da diversidade e biogeografia destes micro-organismos.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Ciliados registrados em fitotelmos de bromélias

As plantas da família Bromeliaceae são morfológicamente caracterizadas pela filotaxia rosulada com axilas foliares coalescentes. Esta condição morfológica é responsável pela formação de reservatórios contendo água pluvial e sedimentos nas chamadas “bromélias-tanques”. Tais reservatórios, juntamente com a fauna, flora e microbiota associadas, compõem microecossistemas denominados fitotelmos (FISH, 1983). Desde PICADO (1913), sabe-se que o ambiente estabelecido nos tanques de bromélias apresenta significativa diversidade de micro-organismos e metazoários. Dessa forma, entende-se que bromélias são relevantes para a manutenção da biodiversidade e complexidade estrutural de diversos ambientes, pois funcionalmente atuam como ilhas de água doce no meio terrestre. Entretanto, apenas a partir do trabalho de FOISSNER *et al.* (2003) iniciou-se uma investigação detalhada a respeito da taxonomia e ecologia dos Ciliophora nos ambientes fitotelmais.

Segundo LUTHER (2008), há cerca de 3200 espécies de bromélias descritas, classificadas em 58 gêneros. As bromélias apresentam distribuição predominantemente neotropical, tendo como exceção apenas uma espécie africana (*Piticairnia feliciana* Porembski & Barthlott, 1999). Essa família é considerada a quarta maior dentre as angiospermas, em riqueza de espécies, na Mata Atlântica. Neste bioma, há registro de 1056 espécies de bromélias, sendo endêmicas 66% destas (MARTINELLI, 2000). O estado de Minas Gerais apresenta aproximadamente 9% do total de espécies da família. Tal diversidade é relacionada ao grande potencial adaptativo dessas plantas associado à variedade climática e geomorfológica do território mineiro (DRUMMOND *et al.*, 2005).

FOISSNER *et al.* (2003) demonstraram a ocorrência de espécies endêmicas de ciliados em fitotelmos de bromélias da República Dominicana, Equador e Brasil. DUNTHORN *et al.* (2012) também registraram espécies endêmicas em fitotelmos da Jamaica, Costa Rica e México (Quadro 1). Considerando-se o registro de novas espécies de ciliados em fitotelmos, a ordem Tetrahymenida é uma das mais representativas, visto que entre os anos de 2003 e 2013 foram descritas *Lambornella trichoglossa* Foissner, 2003; *Bromeliophrya brasiliensis* Foissner, 2003; *Glaucomides bromelicola* Foissner, 2013 e *Bromeliophrya quadristicha* Foissner & Stoeck, 2013. Entretanto, um novo tetrahymenídeo gigante, registrado por FOISSNER *et al.* (2003) e mencionado por FOISSNER (2006) e DUNTHORN *et al.* (2012), não teve sua morfologia elucidada com base em técnicas ciliatológicas.

Atualmente, diversas espécies de bromélias encontram-se em alguma categoria de ameaça de extinção (MARTINELLI, 2000). Esta condição é devida ao extrativismo ilegal para abastecimento do mercado paisagístico e, principalmente, à acelerada destruição de habitats nas regiões de Floresta Atlântica. E toda ameaça às populações de bromélias tem como agravante o desequilíbrio estendido às espécies endêmicas dos ecossistemas fitotelmais.

**Quadro 1:** Espécies de ciliados registrados em tanques de bromélias em diversas localidades:

Filo CILIPHORA Doflein, 1901	Local de ocorrência	Referência
Subfilo POSTCILIODESMATOPHORA Gerassimova & Seravin, 1976		
Classe HETEROTRICHEA Stein, 1859		
Ordem Heterotrichida Stein, 1859		
Familia Spirostomidae Stein, 1867		
<i>Spirostomum</i> Ehrenberg, 1834		
<i>Spirostomum ambiguum</i>	Jamaica	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
Subfilo INTRAMACRONUCLEATA Lynn, 1996		
Classe SPIROTRICHEA Bütschli, 1889		
Subclasse Stichotrichia Small & Lynn, 1985		
Ordem Stichotrichida Fauré-Fremiet, 1961		
Family Amphisiellidae Jankowski, 1979		
<i>Orthoamphisiella</i> Eigner & Foissner, 1991		
<i>Orthoamphisiella</i> sp.	Jamaica	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
Ordem Sporadotrichida Fauré-Fremiet, 1961		
Familia Halteriidae Claparède & Lachmann, 1858		
<i>Halteria</i> Dujardin, 1841		
<i>Halteria grandinella</i>	República Dominicana	Foissner <i>et al.</i> , 2003
<i>Meseres</i> Schewiakoff, 1893		
<i>Meseres corlissi</i>	República Dominicana	Foissner <i>et al.</i> , 2003
Familia Oxitrichidae Ehrenberg, 1830		
<i>Gastrostyla</i> Engelmann, 1862		
<i>Gastrostyla</i> sp.1	Jamaica	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Gastrostyla</i> sp.2	México	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Oxytricha</i> Bory de St. Vincent, 1824		
<i>Oxytricha longigranulosa</i>	Jamaica / Equador	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Oxytricha ottowi</i>	Jamaica / Brasil	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Oxytricha</i> sp.1	México	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Oxytricha</i> sp.2	México	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Pattersoniella</i> Foissner, 1987		
<i>Pattersoniella vitiphila</i>	República Dominicana	Foissner <i>et al.</i> , 2003
<i>Sterkiella</i> Foissner et al., 1991		
<i>Sterkiella histriomuscorum</i>	República Dominicana	Foissner <i>et al.</i> , 2003
Familia Trachelostylidae Small & Lynn, 1985		
<i>Gonostomum</i> Sterki, 1878		
<i>Gonostomum</i> sp.	Jamaica	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Cotterillia</i> Foissner, 2011		
<i>Cotterillia bromelicola</i>	México	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
Ordem Urostylida Jankowski, 1979		
Familia Urostylidae Bütschli, 1889		
<i>Uroleptus</i> Ehrenberg, 1831		
<i>Uroleptus lepisma</i>	República Dominicana / Equador	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012

Classe ARMOPHOREA Lynn, 2004	Local de ocorrência	Referência
Ordem Armophorida Jankowski, 1964		
Família Metopidae Kahl, 1927		
<i>Metopus</i> Claparède & Lachmann, 1858		
<i>Metopus minor</i>	Equador	Foissner <i>et al.</i> , 2003
Classe LITOSTOMATEA Small & Lynn, 1981		
Ordem Haptorida Corliss, 1974		
Família Acropisthiidae Foissner & Foissner, 1988		
<i>Fuscheria</i> Foissner, 1983		
<i>Fuscheria terricola</i>	Brasil	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
Ordem Pleurostomatida Schewiakoff, 1896		
Família Litonotidae Kent, 1882		
<i>Litonotus</i> Wresniowski, 1870		
<i>Litonotus</i> sp.	Brasil	Foissner <i>et al.</i> , 2003
Classe PHYLLOPHARYNGEA de Puytorac et al., 1974		
Subclasse Suctoria Claparède & Lachmann, 1858		
Ordem Endogenida Collin, 1912		
Família Tokophryidae Jankowski, 1985		
<i>Tokophrya</i> Bütschli, 1889		
<i>Tokophrya infusionum</i>	México	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
Subclasse Cyrtophoria Fauré-Fremiet, 1956		
Ordem Chlamyodontida Deroux, 1976		
Família Chilodonellidae Deroux, 1970		
<i>Chilodonella</i> Strand, 1928		
<i>Chilodonella uncinata</i>	Equador	Foissner <i>et al.</i> , 2003
CLASSE NASSOPHOREA Small & Lynn, 1981		
Ordem Microthoracida Jankowski, 1967		
Família Leptopharyngidae Kahl, 1926		
<i>Leptopharynx</i> Mermod, 1914		
<i>Leptopharynx bromelicola</i>	Jamaica	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Leptopharynx bromeliophilus</i>	Jamaica	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Leptopharynx costatus</i>	República Dominicana / Equador / Brasil	Foissner <i>et al.</i> , 2003
Família Microthoracidae Wrzesniowski, 1870		
<i>Drepanomonas</i> Fresenius, 1858		
<i>Drepanomonas revoluta</i>	República Dominicana	Foissner <i>et al.</i> , 2003
<i>Microthorax</i> Engelmann, 1862		
<i>Microthorax pusillus</i>	Equador	Foissner <i>et al.</i> , 2003
<i>Stammeridium</i> Wenzel, 1969		
<i>Stammeridium kahli</i>	Brasil	Foissner <i>et al.</i> , 2003
CLASSE COLPODEA Small & Lynn, 1981		
Ordem Bryometopida Foissner, 1985		
Família Bryometopidae Jankowski, 1980		
<i>Bryometopus</i> Kahl, 1932		
<i>Bryometopus triquetus</i>	Brasil	Foissner <i>et al.</i> , 2003
Família Kreyellidae Foissner, 1979		
<i>Microdiaphanosoma</i> Wenzel, 1953		
<i>Microdiaphanosoma arcuatum</i>	Equador	Foissner <i>et al.</i> , 2003
Ordem Colpodida de Puytorac et al., 1974		
Família Colpodidae Bory de St. Vincent, 1826		
<i>Bresslaa</i> Kahl, 1931		
<i>Bresslaa vorax</i>	Brasil	Foissner <i>et al.</i> , 2003

Ordem Cyrtolophosida Foissner, 1978	Local de ocorrência	Referência
Família Cyrtolophosidae Stokes, 1888		
<i>Cyrtolophosis</i> Stokes, 1885		
<i>Cyrtolophosis minor</i>	Jamaica	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Cyrtolophosis mucicola</i>	República Dominicana / Equador / Brasil	Foissner <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudocyrtolophosis</i> Foissner, 1980		
<i>Pseudocyrtolophosis alpestris</i>	República Dominicana / Equador / Brasil	Foissner <i>et al.</i> , 2003
Família Platyophryidae de Puytorac et al., 1979		
<i>Platyophrya</i> Kahl, 1926		
<i>Platyophrya bromelicola</i>	Jamaica	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Platyophrya vorax</i>	República Dominicana	Foissner <i>et al.</i> , 2003
Classe PROSTOMATEA Schewiakoff, 1896		
Ordem Prorodontida Corliss, 1974		
Família Plagiocampidae Kahl, 1926		
<i>Plagiocampa</i> Schewiakoff, 1893		
<i>Plagiocampa rouxi</i>	Brasil	Foissner <i>et al.</i> , 2003
CLASSE OLIGOHYMENOPHOREA Puytorac et al., 1974		
Subclasse Peniculia Fauré-Fremiet in Corliss, 1956		
Ordem Peniculida Fauré-Fremiet in Corliss, 1956		
Família Frontoniidae Kahl, 1926		
<i>Frontonia</i> Ehrenberg, 1838		
<i>Frontonia depressa</i>	República Dominicana	Foissner <i>et al.</i> , 2003
Família Parameciidae Dujardin, 1840		
<i>Paramecium</i> O.F. Müller, 1773		
<i>Paramecium multimicronucleatum</i>	Brasil	Buosi <i>et al.</i> , 2014
Subclasse Scuticociliatia Small, 1967		
Ordem Philasterida Small, 1967		
Família Cinetochilidae Perty 1852		
<i>Cinetochilum</i> Perty, 1849		
<i>Cinetochilum margaritaceum</i>	República Dominicana	Foissner <i>et al.</i> , 2003
<i>Sathrophilus</i> Corliss, 1960		
<i>Sathrophilus muscorum</i>	Brasil	Foissner <i>et al.</i> , 2003
Família Loxocephalidae Jankowski, 1964		
<i>Dexiotricha</i> Stokes, 1885		
<i>Dexiotricha granulosa</i>	Equador	Foissner <i>et al.</i> , 2003
<i>Dexiotricha</i> sp.1	Jamaica	Foissner <i>et al.</i> , 2003
<i>Dexiotricha</i> sp.2	Brasil	Foissner <i>et al.</i> , 2003
Ordem Pleuronematida Fauré-Fremiet, 1956		
Família Cyclidiidae Ehrenberg, 1838		
<i>Cyclidium</i> O.F. Müller, 1773		
<i>Cyclidium glaucoma</i>	República Dominicana / Equador	Foissner <i>et al.</i> , 2003
<i>Cyclidium muscicola</i>	República Dominicana / Equador	Foissner <i>et al.</i> , 2003
Subclasse Hymenostomatia Delage & Herouard, 1896		
Ordem Tetrahymenida Fauré-Fremiet, 1956		
Família Tetrahymenidae Corliss, 1952		
<i>Lambornella</i> Keilin, 1921		
<i>Lambornella trichoglossa</i>	Brasil / República Dominicana	Foissner <i>et al.</i> , 2003
<i>Lambornella</i> sp.	Jamaica	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Tetrahymena</i> Furgason, 1940		
<i>Tetrahymena rostrata</i>	República Dominicana / Brasil	Foissner <i>et al.</i> , 2003
Novo Gênero GIGANTE (não descrito)	República Dominicana / Equador / Brasil	Foissner <i>et al.</i> , 2003



Família Bromeliophryidae Foissner, 2003	Local de ocorrência	Referência
<i>Bromeliophrya</i> Foissner, 2003		
<i>Bromeliophrya brasiliensis</i>	Brasil	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Bromeliophrya quadristicha</i>	Jamaica / República Dominicana	Foissner, 2013
<i>Glaucomides</i> Foissner, 2012		
<i>Glaucomides bromelicola</i>	República Dominicana	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Glaucomides</i> sp.1	Jamaica	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Glaucomides</i> sp.2	Jamaica	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
Subclasse Peritrichia Stein, 1859		
Ordem Sessilida Kahl, 1933		
Família Epistylididae Kahl, 1933		
<i>Epistylis</i> Ehrenberg, 1830		
<i>Epistylis</i> sp.	Jamaica / Equador	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Rhabdostyla</i> Kent, 1881		
<i>Rhabdostyla</i> sp.1	República Dominicana	Foissner <i>et al.</i> , 2010
<i>Rhabdostyla</i> sp.2	Equador	Foissner <i>et al.</i> , 2010
<i>Orborhabdostyla</i> Foissner, 2010		
<i>Orborhabdostyla bromelicola</i>	Jamaica	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
Família Lagenophryidae Bütschli, 1889		
<i>Lagenophrys</i> Stein, 1852		
<i>Lagenophrys</i> sp.	Brasil	Sabagh <i>et al.</i> , 2012
Família Operculariidae Fauré-Fremiet, 1979		
<i>Opercularia</i> Goldfuss, 1820		
<i>Opercularia</i> sp. n.	Equador	Foissner <i>et al.</i> , 2003
Família Usconophryidae Clamp, 1991		
<i>Usconophrys</i> Jankowski, 1985		
<i>Usconophrys</i> sp.	Jamaica	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
Família Vorticellidae Ehrenberg, 1838		
<i>Vorticella</i> Linnaeus, 1767		
<i>Vorticella gracilis</i>	Jamaica	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Vorticella convalaria</i>	Jamaica / Costa Rica	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Vorticellides</i> Foissner, 2010		
<i>Vorticellides aquadulcis</i>	México	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012
<i>Vorticellides astyliformis</i>	Costa Rica	Dunthorn <i>et al.</i> , 2012

## 1.2 Ciliados associados a fungos liquenizados

Líquens são organismos formados pela associação simbiótica entre um fungo e uma população de algas e/ou cianobactérias (MARCELLI, 2006). Esses organismos apresentam grande importância ecológica, pois alteram físico-quimicamente os substratos sobre os quais se desenvolvem, favorecendo os processos de sucessão biológica. Líquens que apresentam cianobactérias como fotobiontes são relevantes aos ecossistemas também por contribuírem para a adição de nitrogênio aos solos (RAVEN, 2006).

FOISSNER (1986) encontrou um total de 26 espécies de ciliados em amostras de líquens coletadas na Áustria, Alemanha, França e Quênia. Visto que maiores valores de diversidade e riqueza de espécies são observados em amostras de solo, líquens são considerados ambientes inóspitos para ciliados (FOISSNER, 1997a). Segundo HONDA

(2006), ácidos alifáticos, ácidos úsnicos e derivados de ácido pulvínico estão entre os principais metabólitos secundários de líquens. O baixo pH resultante da síntese dessas substâncias é indicado por FOISSNER (1986) como fator limitante à proliferação de bactérias no microhabitat liquênico, o que, conseqüentemente, restringiria também o desenvolvimento de ciliados bacterívoros. O referido autor afirma que não há uma taxocenose de Ciliophora autóctone para líquens, sendo os ciliados encontrados nesses micro-habitats pertencentes à microbiota do solo.

Em levantamento extensivo da taxocenose de ciliados terrestres do continente africano, 47% das 507 espécies encontradas eram táxons não descritos. Para a Austrália, das 361 espécies registradas, 43% eram novas espécies. Por essa razão, inventários detalhados da microbiota eucarionte em habitats terrestres têm se mostrado relevantes para a taxonomia de ciliados. Além disso, são fundamentais para a melhor compreensão sobre a biodiversidade e os processos ecológicos em ambientes terrestres (FOISSNER, 1997).

Nos últimos dez anos, diversas espécies de ciliados foram descritas à partir de amostras de solos coletadas no Brasil. São exemplos *Colpoda brasiliensis* Foissner, 2003; *Cephalospatula brasiliensis* Foissner, 2003; *Cultellothrix velhoi* Foissner, 2003 e *Leptopharynx brasiliensis* Omar & Foissner, 2012. Trabalhos sobre registros e redescições de espécies (PAIVA & SILVA-NETO, 2009), bem como sobre biogeografia e revisão sistemática dos Ciliophora (FOISSNER *et al.*, 2001; FOISSNER, 2003; KATZ *et al.* 2005) também foram desenvolvidos com amostras de solos brasileiros. Considerando-se os trabalhos realizados com coletas em outros países da América do Sul, inclui-se entre os exemplos as descrições de *Arcuospathidium pachyoplites* Foissner, 2003, da Venezuela, e *Deviata rositae* Küpers *et al.*, 2007, da Argentina.

Entretanto, o maior levantamento de ciliados terrestres já realizado no Brasil (FOISSNER, 1997) registrou em torno de 90 espécies desses micro-organismos. Somados às espécies descritas até o ano de 2013, têm-se registrado no Brasil o modesto valor (aproximado) de 10% do total de espécies de ciliados terrestres conhecidas (cerca de 1000 espécies). No grande levantamento realizado por FOISSNER (1997) a amostragem esteve restrita à floresta Amazônica, no entorno da cidade de Manaus. Estudos nos demais biomas brasileiros são escassos na literatura. Da mesma forma, são raros trabalhos sobre a ocorrência de ciliados em outros micro-habitats edáficos, como musgos (SANTOS, 1991) e líquens.

FOISSNER (1999) estima a diversidade global de ciliados de vida-livre na ordem de 30000 espécies, baseando-se principalmente na taxa de descrição de espécies em habitats complexos, como solos de florestas tropicais e desertos, nos últimos 20 anos (FOISSNER

1997; FOISSNER, 2006). Nesses ambientes, tem sido comum a descrição de espécies com distribuição geográfica restrita, como *Bresslauides discoideus* Kahl, 1931 e *Circinella arenicola* Foissner, 1994. Com isso, levantamentos sobre a diversidade de ciliados em ambientes edáficos tornam-se relevantes também por contribuírem para a compreensão de questões relacionadas à biogeografia de protistas.

Do total de 26 espécies de ciliados encontrados por FOISSNER (1986) em 10 amostras de líquens coletadas na Europa e na África, cerca de 50% são pertencentes à classe Colpodea Small & Lynn, 1981. Trata-se de um percentual elevado, quando comparado à proporção observada em solos (FOISSNER, 1998). Colpodídeos são ciliados predominantemente r-estrategistas, com grande tolerância a rápidas mudanças ambientais. A ocorrência de diversas espécies com elevada capacidade de resistência corrobora a visão de que os líquens sejam ambientes inóspitos para ciliados.

Trabalhos sobre a taxocenose de ciliados em ambiente liquênico são extremamente raros na literatura. De fato, há o trabalho de GÉLLERT (1955), FOISSNER (1986) e ROBERTS & ZIMMER (1990), sendo este último carente de informações morfológicas sobre as espécies encontradas (Quadro 2). Dessa forma, o inventário de ciliados associados a líquens apresentado nesta dissertação tem caráter inédito na América do Sul.

**Quadro 2:** Espécies de ciliados registradas em amostras de fungos liquenizados em diferentes regiões do mundo (GÉLLERT, 1955; FOISSNER, 1986; ROBERTS & ZIMMER, 1990).

Filo Ciliophora Dolfein, 1901	Géllert (1955)	Foissner (1986)	Roberts (1990)	Local de ocorrência
Subfilo Postciliodesmatophora, Gerassimova & Seravin, 1976				
Classe Heterotrichea Stein, 1859				
Ordem Heterotrichida Stein, 1859				
Família Blepharismidae Jankowski in Small & Lynn, 1985				
<i>Blepharisma</i> sp.	-	-	+	Irlanda
Subfilo Postciliodesmatophora, Gerassimova & Seravin, 1976				
Classe Spirotrichea Bütschli, 1889				
SubClasse Phacodiniida Small & Lynn, 1985				
Ordem Phacodiniida Small & Lynn, 1985				
Família Phacodiniidae Corliss, 1979				
<i>Phacodinium metchnikoffi</i> Certes, 1897	+	-	-	Hungria
SubClasse Licnophoria Corliss, 1957				
Ordem Euplotida Small & Lynn, 1985				
Família Reichenowellidae Kahl, 1932				
<i>Balantidioides bivacuolata</i> Kahl, 1932	+	-	-	Hungria
SubClasse Hypotrichia Stein, 1859				
Ordem Stichotrichida Fauré-Fremiet, 1961				
Família Amphiellidae Jankowski, 1979				
<i>Amphiella terricola</i> Gellert, 1955	+	-	-	Hungria

	Géllert	Foissner	Roberts	Local de ocorrência
Familia Oxytrichidae Ehrenberg, 1830				
Familia Trachelostylidae Small & Lynn, 1985				
<i>Gonostomum affine</i> (Stein, 1859)	-	+	-	França
<i>Hemisincirra gellerti</i> (Foissner, 1982)	-	+	-	Áustria
Ordem Urostylida Jankowski, 1979				
Familia Hemicyclostylidae Jankowski, 1979				
Familia Urostylidae Butschli, 1889				
<i>Anteholosticha alpestris</i> (Kahl, 1932)	+	-	-	Hungria
<i>Anteholosticha plurinucleata</i> (Géllert, 1956)	+	-	-	Hungria
<i>Pseudokeronopsis similis</i> (Stokes, 1886)	-	+	-	Áustria
SubClasse Stichotrichia Small & Lynn, 1985				
Ordem Stichotrichida Fauré-Fremiet, 1961				
Familia Keronidae Dujardin, 1840				
<i>Keronopsis muscorum</i> (Kahl, 1932)	+	-	-	Hungria
<i>Paraholosticha nana</i> (Géllert, 1955)	+	-	-	Hungria
<i>Paraholosticha lichenicola</i> Géllert, 1955	+	-	-	Hungria
Classe Litostomatea Small & Lynn, 1981				
Ordem Haptorida Corliss, 1974				
Familia Spathidiidae Kahl in Doflein & Reichenow, 1929				
<i>Bryophyllum loxophylliforme</i> Kahl, 1931	+	-	-	Hungria
<i>Epispathidium amphoriforme</i> (Greeff, 1888)	+	-	+	Irlanda
<i>Spathidium multinucleatum</i> Géllert, 1955	+	-	-	Hungria
<i>Spathidium muscicola</i> Kahl, 1930	+	-	-	Hungria
<i>Spathidium spathula</i> (Müller, 1773)	-	+	+	Irlanda, Quênia
<i>Spathidium spathuloides</i> Géllert, 1955	+	-	-	Hungria
Familia Tracheliidae Ehrenberg, 1838				
<i>Dileptus americanus</i> Kahl, 1931	+	-	-	Hungria
<i>Dileptus conspicuus</i> Kahl, 1931	+	-	-	Hungria
Familia Litonotidae Kent, 1882				
<i>Acineria uncinata</i> Tucolesco, 1962	-	+	-	Alemanha
Classe Phyllopharyngea de Puytorac et al., 1974				
Subclasse Cyrtophoria Fauré-Fremiet, 1956				
Ordem Chlamyodontida Deroux, 1976				
Familia Chilodonellidae Deroux, 1970				
<i>Chilodonella uncinata</i> (Ehrenberg, 1838)	-	-	+	Irlanda
SubClasse Suctoria Claparède & Lachmann, 1858				
Ordem Endogenida Collin, 1912				
Familia Trichophryidae Fraipont, 1878				
<i>Trichophrya</i> sp.	-	+	-	Alemanha
Classe Nassophorea Small & Lynn, 1981				
Ordem Microthoracida Jankowski, 1967				
Familia Leptopharyngidae Kahl, 1926				
<i>Leptopharynx costatus</i> Mermod, 1914	+	+	-	Áustria, França, Hungria
Classe Colpodea Small & Lynn, 1981				
Ordem Bryometopida Foissner, 1985				
Familia Bryometopidae Jankowski, 1980				
<i>Bryometopus pseudochilodon</i> Kahl, 1932	+	+	-	França, Hungria
<i>Thylakidium typicum</i> Géllert, 1955	+	-	-	Hungria
Familia Kreyellidae Foissner, 1979				
<i>Microdiaphanosoma arcuata</i> (Grandori & Grandori, 1934)	-	+	-	Áustria
Ordem Colpodida de Puytorac et al., 1974				
Familia Colpodidae Bory de St. Vincent, 1826				
<i>Bresslaueria</i> sp.	-	+	-	Quênia
<i>Colpoda colpidiopsis</i> Kahl, 1931	+	-	-	Hungria
<i>Colpoda cucullus</i> (Müller, 1773)	-	+	+	Irlanda e Quênia
<i>Colpoda inflata</i> (Stokes, 1884)	+	+	-	Alemanha, Áustria, Quênia, Hungria
<i>Colpoda maupasi</i> Enriques, 1908	-	+	-	Quênia
<i>Colpoda steinii</i> Maupas, 1883	+	+	+	Irlanda, Quênia, França, Áustria, Hungria

Familia Grossglockneriidae Foissner, 1980	Géllert	Foissner	Roberts	Local de ocorrência
<i>Nivaliella plana</i> Foissner, 1980	-	+	-	Áustria, França, Quênia
<i>Pseudoplatyophrya nana</i> (Kahl, 1926)	-	+	-	Áustria, Quênia
Familia Hausmanniellidae Foissner, 1987				
<i>Bresslaides discoideus</i> (Kahl, 1931)	+	-	-	Hungria
<i>Hausmanniella discoidea</i> (Géllert, 1956)	-	+	-	Alemanha
<i>Hausmanniella quinquecirrata</i> (Géllert, 1955)	+	-	-	Hungria
<i>Kalometopia duplicata</i> (Penard, 1922)	+	-	-	Hungria
Familia Marynidae Poche, 1913				
<i>Maryna acuminata</i> (Géllert, 1955)	+	-	-	Hungria
Ordem Cyrtolophosidida Foissner, 1978				
Familia Cyrtolophosididae Stokes, 1888				
<i>Pseudocyrtolophosis alpestris</i> Foissner, 1980	-	+	-	Áustria
Familia Platyophryidae Puytorac et al., 1979				
<i>Platyophrya vorax</i> Kahl, 1926	-	+	-	França, Áustria, Quênia
<i>Platyophrya spumacola</i> Kahl, 1927	+	-	-	Hungria
<i>Platyophrya</i> sp.	-	-	+	Irlanda
<i>Platyophrydes latus</i> (Kahl, 1930)	+	-	+	Irlanda, Hungria
Familia Sorogenidae Bradbury & Olive, 1980				
<i>Sorogena stoianovitchae</i> Bradbury & Olive, 1980	-	+	-	Quênia
Classe Prostomatea Schewiakoff, 1896				
Ordem Prorodontida Corliss, 1974				
Familia Holophryidae Perty, 1852				
<i>Holophrya saginata</i> Pennard, 1922	+	-	-	Hungria
Familia Plagiocampidae Kahl, 1926				
<i>Plagiocampa</i> sp.	-	+	-	França
Classe Oligohymenophorea de Puytorac et al., 1974				
SubClasse Peniculia Fauré-Fremiet in Corliss, 1956				
Ordem Peniculida Fauré-Fremiet in Corliss, 1956				
Familia Frontoniidae Kahl, 1926				
<i>Frontonia depressa</i> (Stokes, 1886)	+	+	-	Áustria, Hungria
Subclasse Hymenostomatia Delage & Hérouard, 1896				
Ordem Tetrhymenida Fauré-Fremiet, 1956				
Familia Glaucomidae Corliss, 1971				
<i>Glaucoma scintillans</i> (Müller, 1786)	-	-	+	Irlanda
SubClasse Scuticociliatia Small, 1967				
Ordem Philasterida Small, 1967				
Familia Cinetochilidae Perty 1852				
<i>Sathrophilus muscorum</i> (Kahl, 1931)	-	+	-	Áustria
Familia Cyclidiidae Ehrenberg, 1838				
<i>Cyclidium citrullus</i> Cohn, 1865	-	-	+	Irlanda
<i>Cyclidium muscicola</i> Kahl, 1931	+	-	-	Hungria
<i>Cyclidium</i> sp.	-	+	-	França
Familia Uronematidae Thompson, 1964				
<i>Uronema nigricans</i> (Muller, 1786)	-	-	+	Irlanda

### 3. Escopo do trabalho

A presente dissertação apresenta, na primeira parte, a descrição morfológica e molecular de um novo gênero de ciliado da família Tetrahymenidae, encontrado em fitotelmos das bromélias *Portea petropolitana* e *Alcantarea imperialis* em fragmento de Mata Atlântica na área urbana do município de Juiz de Fora, Minas Gerais. Os caracteres morfológicos inéditos descritos para este organismo, após impregnação pelo carbonato de prata, bem como informação sobre sua posição filogenética baseada no gene mitocondrial COI sustentam a proposta de *Ballaenothrix bromelicola* como um novo táxon.

Neste estudo inclui-se ainda, na segunda parte, inventário da ciliatofauna associada a fungos liquenizados do gênero *Parmotrema* coletados no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. Dentre as 21 morfoespécies de ciliados registradas, 12 espécies foram identificadas utilizando técnicas ciliatológicas, incluindo uma nova espécie do gênero *Hemicycliostyla* (Spirotrichea, Hypotrichia). A diversidade de ciliados encontrada no presente estudo foi comparada com resultados apresentados em estudos realizados na Europa e África.

## SEÇÃO I

### CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE UM NOVO GÊNERO DE CILIADO DA FAMÍLIA TETRAHYMENIDAE (CILIOPHORA, HYMENOSTOMATIA) ENCONTRADO EM TANQUES DE BROMÉLIAS NO SUDESTE DO BRASIL

#### RESUMO:

Neste estudo é descrito um novo gênero de ciliado da família Tetrahymenidae, *Ballaenothrix bromelicola* gen. nov., sp. nov., encontrado em fitotelmos das bromélias *Portea petropolitana* e *Alcantarea imperialis* em um fragmento de Floresta Atlântica na área urbana do município de Juiz de Fora, Minas Gerais, sudeste do Brasil. A caracterização morfológica deste ciliado foi realizada com a utilização da técnica de impregnação pelo carbonato de prata. Etapas da morfogênese divisional nuclear e da infraciliatura foram registradas em micrografias. O sequenciamento dos genes 18S-rDNA e COI foi utilizado para a realização de análises filogenéticas. Os caracteres morfológicos e os resultados moleculares observados indicam a proposição do ciliado encontrado como um novo gênero.

#### 1.1 INTRODUÇÃO

Fitotelmos são micro-ecossistemas estabelecidos em estruturas vegetais capazes de formar reservatórios de água pluvial e sedimentos (FISH, 1983). Nesses ambientes ocorrem espécies de micro-organismos com distribuição geográfica ubíqua (MAGUIRE, 1971), mas DUNTHORN *et al.* (2012) demonstraram que tanques de bromélias são habitats ricos em espécies endêmicas.

Embora protistas sejam comuns e abundantes em tanques de bromélias, os estudos realizados no século XX foram ainda exploratórios (PICADO, 1913; LAESSLE, 1961; MAGUIRE, 1971; ESTEVES & SILVA-NETO, 1996; LITTLE & HEBERT, 1996). Embora a diversidade e a distribuição de macro-organismos em fitotelmos bromelícolas sejam bem conhecidas (FOISSNER *et al.*, 2003), estudos taxonômicos e ecológicos detalhados dos micro-organismos nestes ambientes no país são escassos.

A família Tetrahymenidae Corliss, 1952 é composta, atualmente, por três gêneros: *Deltopylum* Fauré-Fremiet & Mugard, 1946; *Lambornella* Keilin, 1921 e *Tetrahymena* Furgason, 1940 (LYNN, 2008). *Paraglaucoma* Kahl, 1926 é considerado um sinônimo júnior de *Tetrahymena* (AESCHT, 2001). Estudos sobre a relação filogenética de representantes da



família Tetrahymenidae têm sido realizados com base em alguns marcadores moleculares, tais como genes ribossomais 5.8S, 18S-rDNA, gene codificador de histonas e gene mitocondrial citocromo oxidase sub-unidade I (COI) (SANLER & BRUNK, 1992; STRÜDER-KYPKE *et al.*, 2001; CHANTANGSI & LYNN, 2008). Os genes nucleares são extremamente conservados em ciliados da família Tetrahymenidae, sendo gene mitocondrial COI marcador com melhor resolução para entendimento da filogenia interna deste grupo de ciliados (CHANTANGSI & LYNN, 2008).

Considerando-se o registro de espécies não conhecidas em fitotelmos, a ordem Tetrahymenida Fauré-Fremiet, 1956 é uma das mais representativas, visto que entre os anos de 2003 e 2013 foram descritas *Lambornella trichoglossa* Foissner, 2003; *Bromeliophrya brasiliensis* Foissner, 2003; *Glaucomides bromelicola* Foissner, 2013 e *Bromeliophrya quadristicha* Foissner & Stoeck, 2013. Entretanto, um novo tetrahymenídeo com grandes dimensões e aspectos morfológicos distintos, registrado em bromélias da República Dominicana e Equador (FOISSNER *et al.*; 2003) não teve sua morfologia elucidada. Este ciliado foi apresentado pelos referidos autores como um novo tetrahymenídeo gigante, com base em observações de espécimes *in vivo*, micrografias eletrônicas de varredura e na posição filogenética. Na proposta moderna de classificação do filo Ciliophora, LYNN (2008) propõe a inclusão deste tetrahymenídeo gigante ao gênero *Tetrahymena* com base em análises filogenéticas pautadas no gene ribossomal 18S-rDNA.

Durante realização de inventário taxonômico em fitotelmos de bromélias presentes em um fragmento urbano de Floresta Atlântica no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, foi encontrado este novo tetrahymenídeo gigante. Com o objetivo de descrever este ciliado, foi realizada a caracterização da população encontrada utilizando-se uma abordagem multidisciplinar: observação de espécimes *in vivo* e impregnados pela técnica de carbonato de prata, descrição da ontogênese da infraciliatura e do aparato nuclear, elucidação de aspectos comportamentais e ecológicos, e ainda apresentação de dados sobre a posição filogenética do mesmo usando sequências dos genes 18S-rDNA e COI.

## **1.2 MATERIAL e MÉTODOS**

### **1.2.1 Coleta dos espécimes**

O Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora (21°43'74''S 43°22'06''O) é uma reserva urbana de Mata Atlântica, classificada como Floresta Estacional Semidecidual Montana (VELOSO *et al.*, 1991), localizada no município de Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, região sudeste do Brasil. Apresenta 291,9 hectares de mata



secundária em avançado estágio de regeneração, com grande parte de sua extensão coberta por espécies nativas (FONTES, 2008). Neste local, durante os anos de 2012 e 2013 foram realizadas coletas mensais de amostras de água (50 ml) em fitotelmos das bromélias *Portea petropolitana* e *Alcantarea imperialis*.

### 1.2.2 Estudo morfológico

As amostras de água coletadas em fitotelmos de bromélias foram analisadas em microscópio estereoscópico, em aumentos de 20x a 40x, para observação do comportamento natatório do novo ciliado encontrado. Espécimes deste ciliado foram triados com micropipetas de vidro e observados *in vivo*, entre lâmina e lamínula, em microscópio com contraste interferencial diferencial (Olympus BX51, DIC), em aumentos de 40x, 100x, 200x e 1000x.

Alíquotas dos ciliados ativos presentes nas amostras triadas foram fixados em solução salina a base de verde de metila contendo formalina (MFS) (ITO *et al.*; 1996), na proporção de 1:1, para processamento da técnica de impregnação pelo carbonato de prata, seguindo protocolo estabelecido por FOISSNER (1991). O estudo morfométrico foi realizado com base em micrografias dos organismos observados *in vivo* e impregnados (Tabela 1) com o auxílio do software Olympus Image Pro-Plus 5.0.

A terminologia taxonômica adotada neste estudo segue FOISSNER *et al.* (2003) e LYNN (2008). No presente trabalho foi proposto um nome para o novo táxon descrito mesmo ciente que novos nomes propostos em dissertações e teses não possuem validade como publicação conforme o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICNZ, 1999).

### 1.2.3 Obtenção das sequências e análise filogenética

Cerca de 30 espécimes observados *in vivo* foram triados e transferidos para saleuras (*embryo dishes*), lavados cinco vezes usando água destilada, com intuito de reduzir os riscos de contaminação, e, posteriormente, foram fixados em etanol 95°GL e armazenados em microtubos. A extração do material genético destas amostras foi realizada por meio da utilização do kit DNeasy® (Blood and Tissue – QIAGEN), seguindo as orientações do fabricante para extração de tecidos animais. O produto final da extração foi mantido a -20°C em solução aquosa. Com intuito de evitar contaminação nas análises moleculares foi realizada, usando a mesma metodologia, a caracterização molecular de ciliados da espécie *Lambornella trichoglossa* Foissner, 2003, visto que estes organismos foram observados no interior de vacúolos alimentares do novo tetrahymenídeo descrito neste estudo.

A amplificação do gene 18S-rDNA dos espécimes fixados foi obtida por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), executada em termociclador “Applied Biosystems Gene Amp® PCR System 9700”, em microtubos de 200µl, em volume final de 50µl, contendo: 39,8µl de H<sub>2</sub>O; 5µl de tampão 10X; 1,5µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 0,5µl de DNTP (25mM); 1µl de cada iniciador; 0,25µl de Taq Platinum® DNA polimerase (Invitrogen) (5U/µl) e 1,0µl de DNA genômico purificado. A ciclagem para as amplificações do 18S-rDNA se inicia com: um ciclo de 94°C por 2 minutos; seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação das fitas de DNA), 50°C por 30 segundos (anelamento dos iniciadores), 72°C por 2 minutos (etapa de polimerização), e, por fim, um ciclo de 72°C por 7 minutos para a polimerização de eventuais fitas inacabadas. Foram utilizados os iniciadores 18S F9Euk e 18S R1513 (SCHRALLHAMMER *et al.*; 2013), eficazes na amplificação do gene 18S-rDNA de eucariotos em geral.

Para amplificação do gene mitocondrial COI, foram utilizados os iniciadores F388dT e R1184dT (STRÜDER-KYPKE & LYNN, 2010), específicos para ciliados. A ciclagem foi realizada com as seguintes medidas: cinco ciclos de 92°C (92°C por 30'', 45°C por 30'' e 72°C por 1'30''), outros 30 ciclos a 92°C (92°C por 30'', 55°C por 30'' e 72°C por 1'30'') e um ciclo de 72°C por 7 minutos, sendo a temperatura de anelamento 55°C.

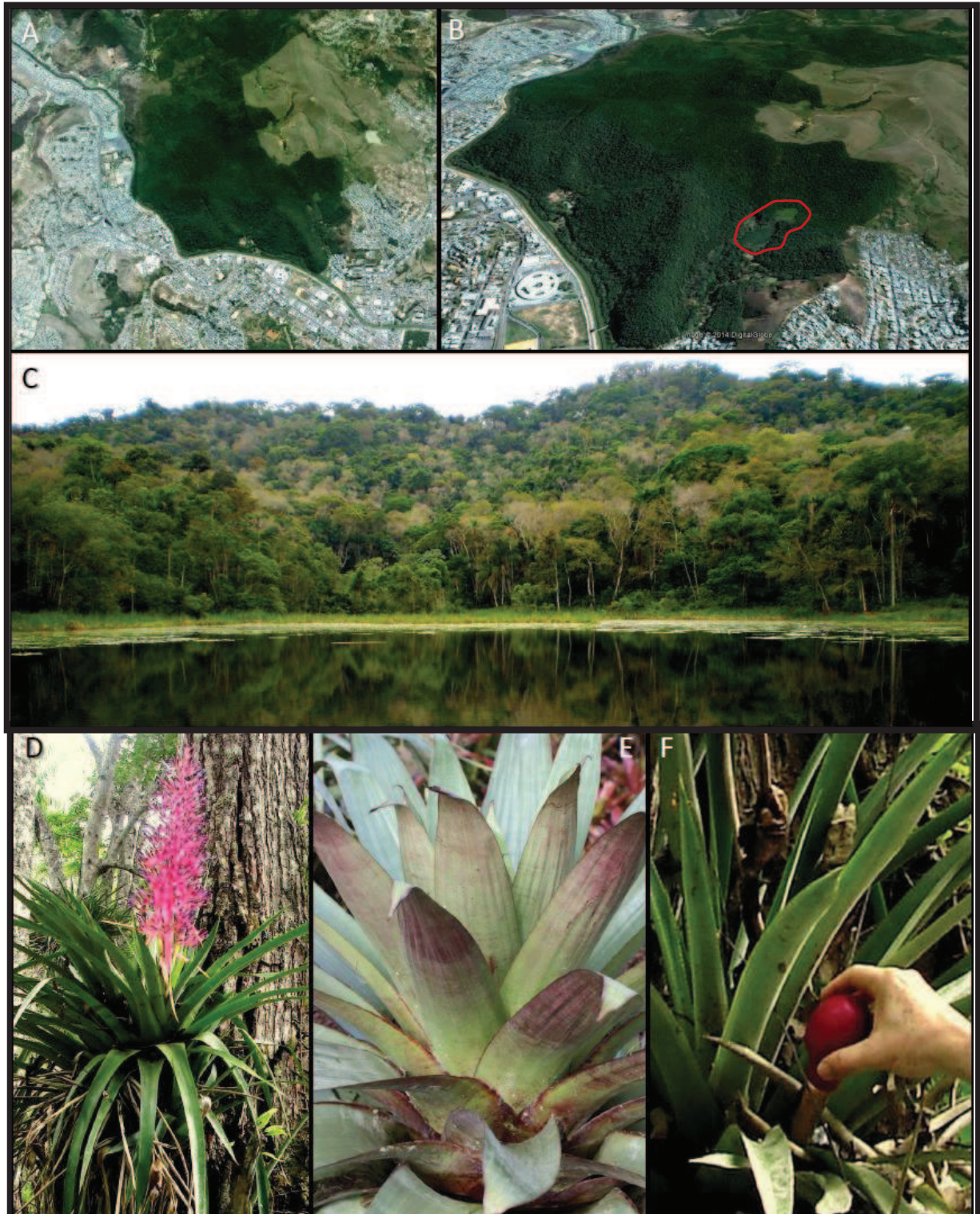
Os produtos da reação de amplificação foram precipitados com EDTA 125mM e 60µL de etanol absoluto. Estas amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13000 rpm e, após retirada do sobrenadante, o material genético foi lavado com etanol 70°GL e novamente centrifugado, por 5 minutos, a 13000 rpm. As amostras foram ressuspensas em 10µL de formamida. Após esse processo, as amostras foram transferidas para o sequenciador ABI PRISM® 3100 (Applied Bioystems).

As sequências dos genes 18S-rDNA e COI obtidas foram analisadas e editadas com o *software* SEQMAN®. A composição dos nucleotídeos das sequências foi obtida pelo programa CompSeq (RICE *et al.*, 2000). Posteriormente, as sequências foram comparadas com as informações moleculares compatíveis de representantes da ordem Tetrahymenida disponíveis no GenBank utilizando o algoritmo BlastN. O conjunto de sequências utilizadas na análise filogenética com base em informações do gene 18S-rDNA inclui representantes das seguintes famílias da ordem Tetrahymenida (Subclasse Hymenostomatia): Ichthyophthiriidae Kent, 1881 (n=1), Turaniellidae Didier, 1971 (n=2); Bromeliophryidae Foissner, 2003 (n=3); Glaucoidae Corliss, 1971 (n=2), Tetrahymenidae Corliss, 1952 (n=43, *Lambornella*, *Ballaenothrix* nov. gen. e *Tetrahymena*); e da ordem Ophryoglenida Canella, 1964 (n=1), como grupo externo. O conjunto de sequências referentes ao gene COI inclui representantes

das seguintes famílias da ordem Tetrahymenida (Subclasse Hymenostomatia): Tetrahymenidae (*Tetrahymena*, *Ballaenothrix* nov. gen. e *Lambornella*), Ichthyophthiriidae Kent, 1881 (n=3) e do grupo externo contendo representantes da subclasse Peniculia (n=10). O alinhamento das sequências 18S-rDNA foi realizado com a utilização dos programas MAFT®, que considera a estrutura secundária do gene, e MEGA, versão 4.0.

O alinhamento final foi analisado usando programa jModelTest\_2.1.4 (GUIDON & GASCUEL, 2003) para seleção do modelo evolutivo mais adequado ao conjunto de dados. As reconstruções filogenéticas foram realizadas empregando-se os seguintes métodos: máxima verossimilhança (ML), inferência bayesiana (BI) e agrupamento de vizinhos (NJ). A inferência bayesiana foi realizada usando programa MrBayes v.3.2 (RONQUIST *et al.* 2012) e modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos GTR e a distribuição de probabilidades posteriores foi obtida com 1 milhão de gerações em quatro corridas independentes, em quatro cadeias independentes. Destas amostragens 10% foi removida em cada corrida como “burn-in”. Os valores de suporte foram medidos pela probabilidade bayesiana posterior. As análises de máxima verossimilhança foram realizadas no programa PhyML 3.0 (GUINDON & GASCUEL, 2003) usando o modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos GTR+G+I. Os valores de suporte foram estimados com 1000 réplicas no teste de “bootstrap”. Para análise de agrupamento de vizinhos foi usado o programa MEGA 5.0 (TAMURA *et al.* 2011). A análise de agrupamento de vizinhos foi realizada usando o modelo evolutivo de substituição nucleotídica Kimura-2 parâmetros com 1000 réplicas de “bootstrap”.





**Figura 1:** A: Localização do Jardim Botânico da UFJF dentro da malha urbana do município de Juiz de Fora, MG. B: Em vermelho, delimitação da área de amostragem (Fonte: Google Earth). C: Aspecto da vegetação do local. D: Bromélia *Portea petropolitana*. E: *Alcantarea imperialis* (Fonte: www.biodiversidade.sp.gov.br). F: Coleta de conteúdo fitotelmal com uma pipeta (Fotos: Halfeld, V.R.).

### 1.3. RESULTADOS

#### 1.3.1. Caracterização morfológica

Classe Oligohymenophorea Puytorac *et al.*, 1974

Subclasse Hymenostomatia Delage & Hérouard, 1986

Ordem Tetrahymenida Fauré-Fremiet in Corliss, 1956

Família Tetrahymenidae Corliss, 1952

*Ballaenothrix bromelicola* gen. nov., sp. nov.

Diagnóstico do gênero *Ballaenothrix* nov. gen.: tetrahymenídeo de grande tamanho (200µm-800µm); possui formas macróstomas e micróstomas, sendo a forma macróstoma predominante no ciclo de vida; micronúcleos visíveis; extremidade posterior do corpo afunilada, formando uma “cauda”; sutura pré-oral presente; presença de cinco ou mais protomembranelas adorais compostas por dicinetídeos; ausência de membrana paroral durante interfase e divisão celular; pronunciado infundíbulo oral nas formas macróstomas.

Etimologia: composição de um nome latino (ballaeno = baleia, referente ao formato do ciliado) e nome grego (thrix = cabelo, cílio). Gênero feminino.

Diagnóstico de *Ballaenothrix bromelicola* sp. nov.: corpo em forma de funil, apresentando acentuado polimorfismo, com pronunciado infundíbulo bucal anterior, cuja abertura pode atingir mais de 250µm; região não ciliada na margem esquerda do infundíbulo bucal; vacúolos contráteis dispostos por todo o corpo; macronúcleo único, com formato variando de arredondado-irregular a elíptico, posicionado no centro do organismo; de dois a quatro micronúcleos próximos ao macronúcleo; extremidade posterior do corpo afilada, formando uma cauda, com medida de aproximadamente ¼ do comprimento total; citoprocto localizado na estreita região não ciliada do lado esquerdo do corpo em posição anterior a cauda; cílios caudais presentes; forma micróstoma cilíndrica e alongada, com reduzido infundíbulo bucal; ciliatura somática composta por cerca de 190 cinécias equidistantes nas formas macróstomas.

Localidade-tipo: Tanques de bromélias (*Portea petropolitana* e *Alcantarea imperialis*) encontradas na Área de Proteção Ambiental Mata do Krambeck, (21°43'74''S 43°22'06''O).

Depósito do material tipo: Uma lâmina contendo holótipo usado na descrição e cinco lâminas contendo parátipos impregnados pelo carbonato de prata (FOISSNER, 1991) a serem

depositadas na coleção do Laboratório de Protistologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Etimologia: adjetivo latino referente ao hábitat onde foi descoberta.

Descrição (Figuras 2-7, Tabela 1):

O ciliado descrito no presente trabalho é um grande tetrahymenídeo predador de flagelados, ciliados (principalmente *Lambornella trichoglossa* na população estudada) e rotíferos, apresentando também comportamento canibalístico. Desloca-se lentamente pelo meio aquático, descrevendo trajetórias helicoidais, girando em torno do eixo longitudinal do corpo, sendo capaz de permanecer imóvel. Sob luz transmitida, apresenta coloração do citoplasma variando de amarelo-hialino a marrom escuro, sendo observáveis diversos vacúolos alimentares e micro-vesículas lipídicas.

A população estudada possui formas macróstomas e micróstoma, entretanto, somente as formas macróstomas foram descritas em detalhe. Apresenta o tamanho médio aproximado de  $700\mu\text{m} \times 330\mu\text{m}$  *in vivo*, sendo elevados os valores do coeficiente de variação dos 35 espécimes medidos. Os 36 espécimes impregnados pelo carbonato de prata medem aproximadamente  $510\mu\text{m} \times 250\mu\text{m}$ , havendo redução de em torno de 20-25% nas dimensões de após fixação.

Os vacúolos contráteis encontram-se dispersos por todo o corpo, com diâmetro médio de  $9,5\mu\text{m}$ , e apresentam canais coletores ao redor (Figura 2D). Os extrusomas têm forma cilíndrica e medem  $3,8\mu\text{m}$  em média, sendo mais perceptíveis na região caudal (Figura 1C). A ciliatura somática é composta por cerca de 190 cinécias equidistantes umas das outras, formadas por monocinetídeos, organizadas a partir da sutura frontal. Na região caudal, entretanto, a organização das cinécias se torna mais difusa, não sendo possível identificar a qual cinécia determinado cinetossomo pertença. Os cílios caudais são formados a partir de cinetossomos espessos, que formam uma linha diagonal na extremidade posterior (Figura 7).

Esta espécie é capaz de formar cistos de resistência, algo entendido como uma condição seletiva do ambiente fitotelmata, onde alternâncias entre períodos de seca e cheia são observadas (Figura 2E).

O ciclo de vida polimórfico apresenta a fase macróstoma como dominante. Em todas as amostragens, a razão observada entre o total de espécimes micróstomas/macróstomas foi menor que 0,5. Na fase dominante, os organismos apresentam o corpo em forma de funil, com larga abertura oral anterior e uma cauda afilada posteriormente. O macronúcleo ocupa a



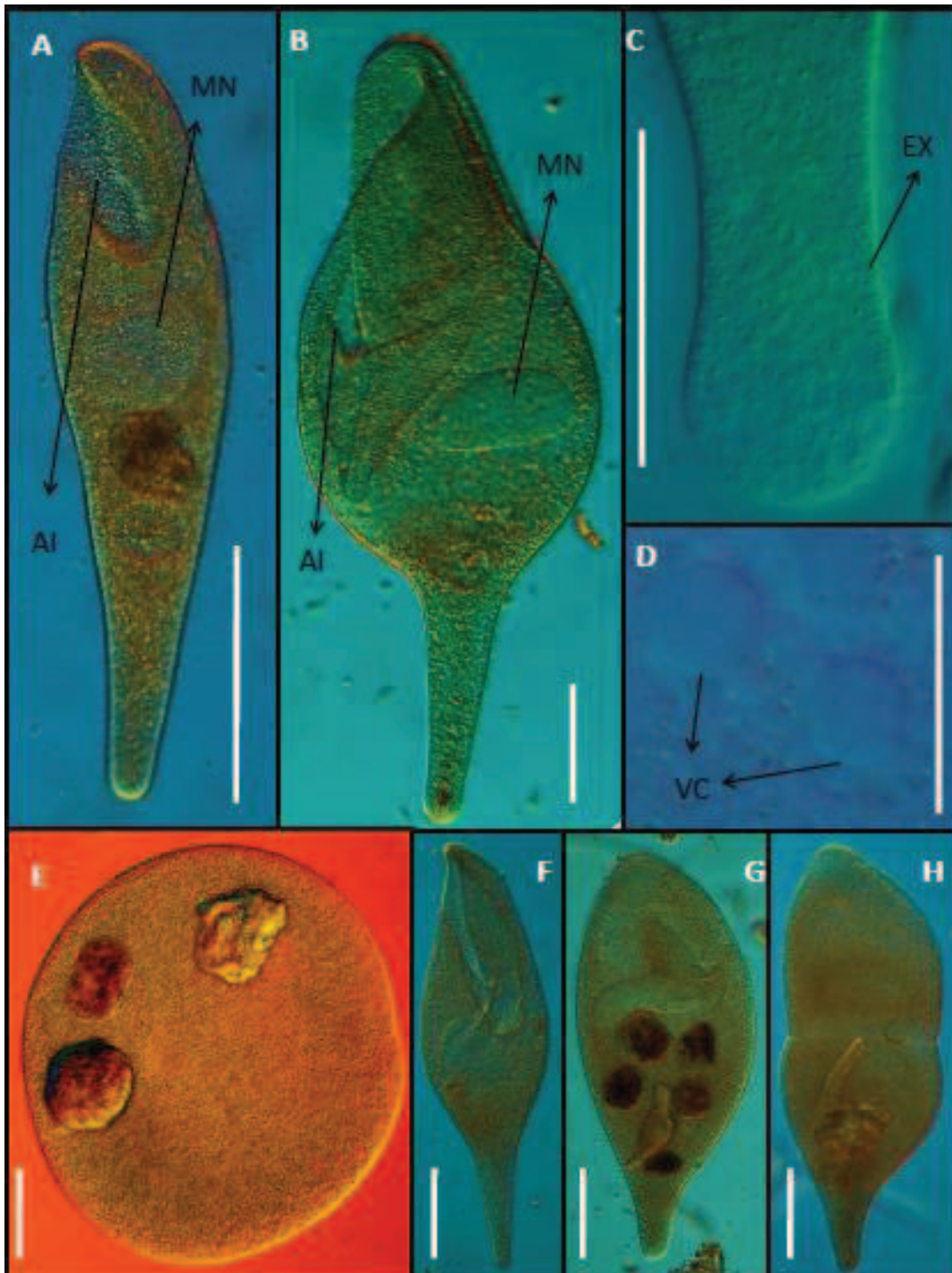
região central do organismo (Figura 3B; Figura 5A,B) e o infundíbulo estende-se até a metade do comprimento total, podendo excedê-la (Figura 4C). Nas formas micróstomas, por sua vez, o macronúcleo ocupa uma posição ligeiramente mais anterior (Figura 2A). Nessa fase, os ciliados são menores, mais afilados e alongados. Durante a transição para a forma macróstoma, o infundíbulo bucal, antes inconspícuo, começa a se formar. O processo se desenvolve tanto pela invaginação da região mediana ventral anterior quanto pelo alongamento da porção dorsal anterior. No interior da cavidade formada, desenvolvem-se densas fibras associadas aos corpos basais, perceptíveis após impregnação pelo carbonato de prata (Figura 4). Nessa região, as cinécias formadas abaixo da sutura frontal circundam a parede do infundíbulo bucal, conduzindo à abertura oral, a qual não apresenta nenhuma estrutura de membranas. A maior parte das cinécias presentes no infundíbulo, entretanto, tem sua continuidade compondo a ciliatura somática, deixando a região infundibular e estendendo-se até a extremidade posterior.

**Tabela 1\*:** Morfometria de *Ballaenothrix bromelicola* gen. nov., sp. nov. (macróstoma).

Característica	Método	$\bar{x}$	M	SD	SE	CV	Min	Max	n
Comprimento	C	510,53	511,1	36,77	6,12	7,2	408,51	602,52	36
	V	717,94	713,19	84,49	14,29	11,76	488,02	846,17	35
Largura	C	255,55	258,73	29,44	4,9	11,52	195,42	315,06	36
	V	333,15	334,65	42,45	7,18	12,74	231,38	411,31	35
Comprimento/Largura	C	2,01	2	0,15	0,02	7,46	1,67	2,41	36
	V	2,16	2,14	0,22	0,03	10,18	1,45	2,69	35
Cinécias ventrais (n)	C	98,85	95	12,12	2,02	12,26	83	126	36
Cinécias dorsais (n)	C	95,2	93	14,89	2,48	15,64	73	126	36
Infundíbulo (profundidade)	C	243,7	248,32	29,2	4,86	11,98	171,46	321,15	35
Abertura do infundíbulo	V	277,2	248,45	56,12	9,49	20,24	208,07	282,97	35
Macronúcleo (n)	C	1	1	0	0	0	1	1	36
Macronúcleo (comprimento)	C	117,24	108,76	22,24	3,7	18,96	84,56	177,51	36
Micronúcleo (n)	C	1,93	2	0,58	0,09	30,05	0	4	36
Cauda (comprimento)	V	168,13	248,045	29,81	5,04	17,73	171,46	321,15	35
Comprimento/cauda	V	4,36	4,26	0,62	0,1	14,22	3,48	6,82	35
Vacúolo Alimentar	V	109,33	117,9	40,08	6,78	36,65	89,77	156,33	35
Cílio (comprimento)	C	11,74	11,7	11,27	0,23	10,81	9,49	14,23	30
Protomembranelas (n)	C	8,93	9	1,55	0,28	17,41	6	12	30

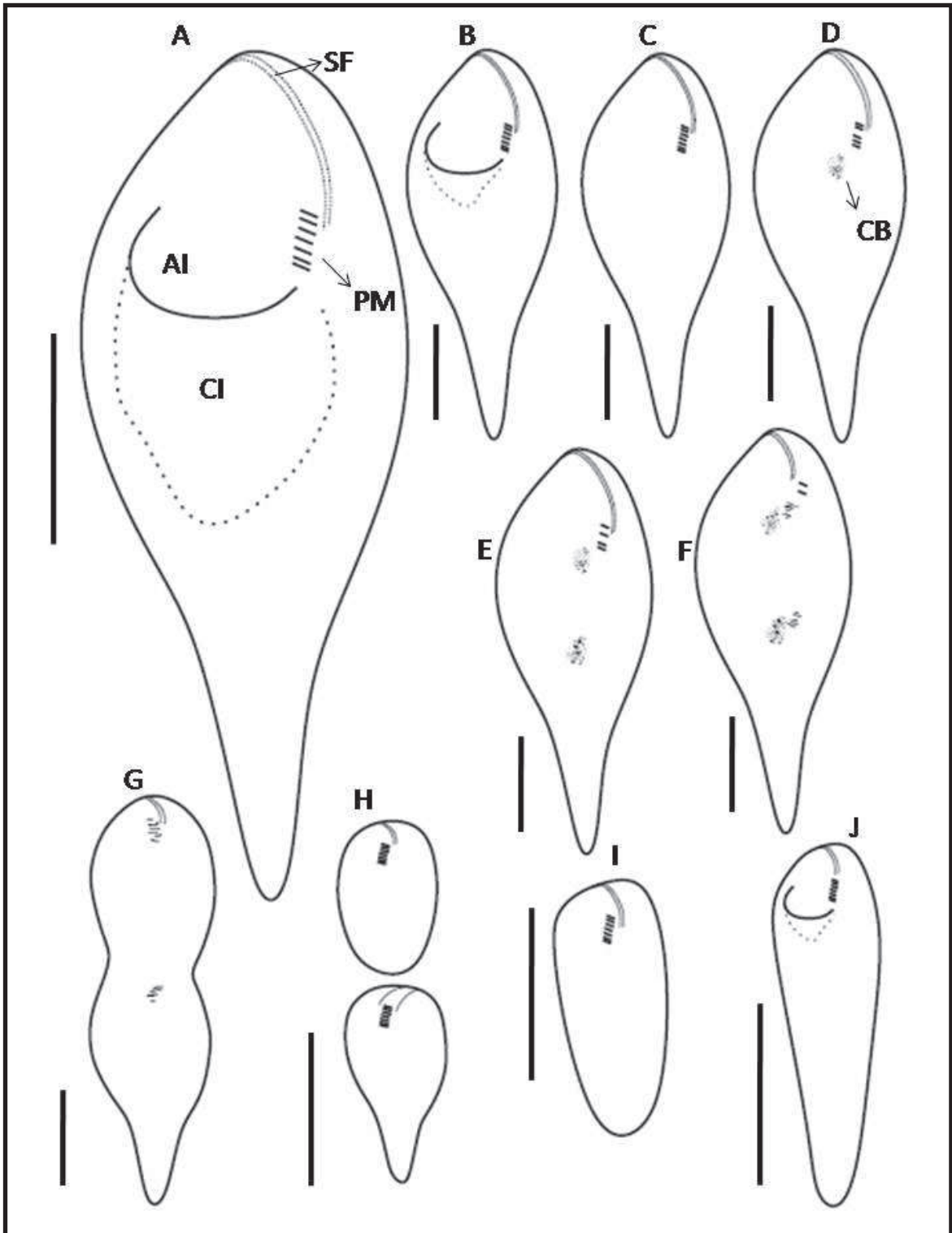
\*Valores medidos em micrômetros, obtidos de espécimes escolhidos randômicamente a partir dos cultivos *in vivo* (V) e do material processado pela técnica do carbonato de prata (C).  $\bar{x}$ = média aritmética, M= mediana, SD= desvio padrão, SE= erro padrão, CV= coeficiente de variação, Min= valor mínimo, Max= valor máximo, n= número de espécimes analisados.

Na margem esquerda superior da abertura do infundíbulo, há uma região não ciliada onde podem ser encontrados corpos basais desorganizados e o início das cinécias pós-orais (Figura 5B,F). Nessa região ocorre a formação de, em média, nove protomembranelas adorais formadas por dicinetídeos, mais perceptíveis durante a morfogênese divisional (Figura 5). Nenhuma organização de membrana paroral é observada.

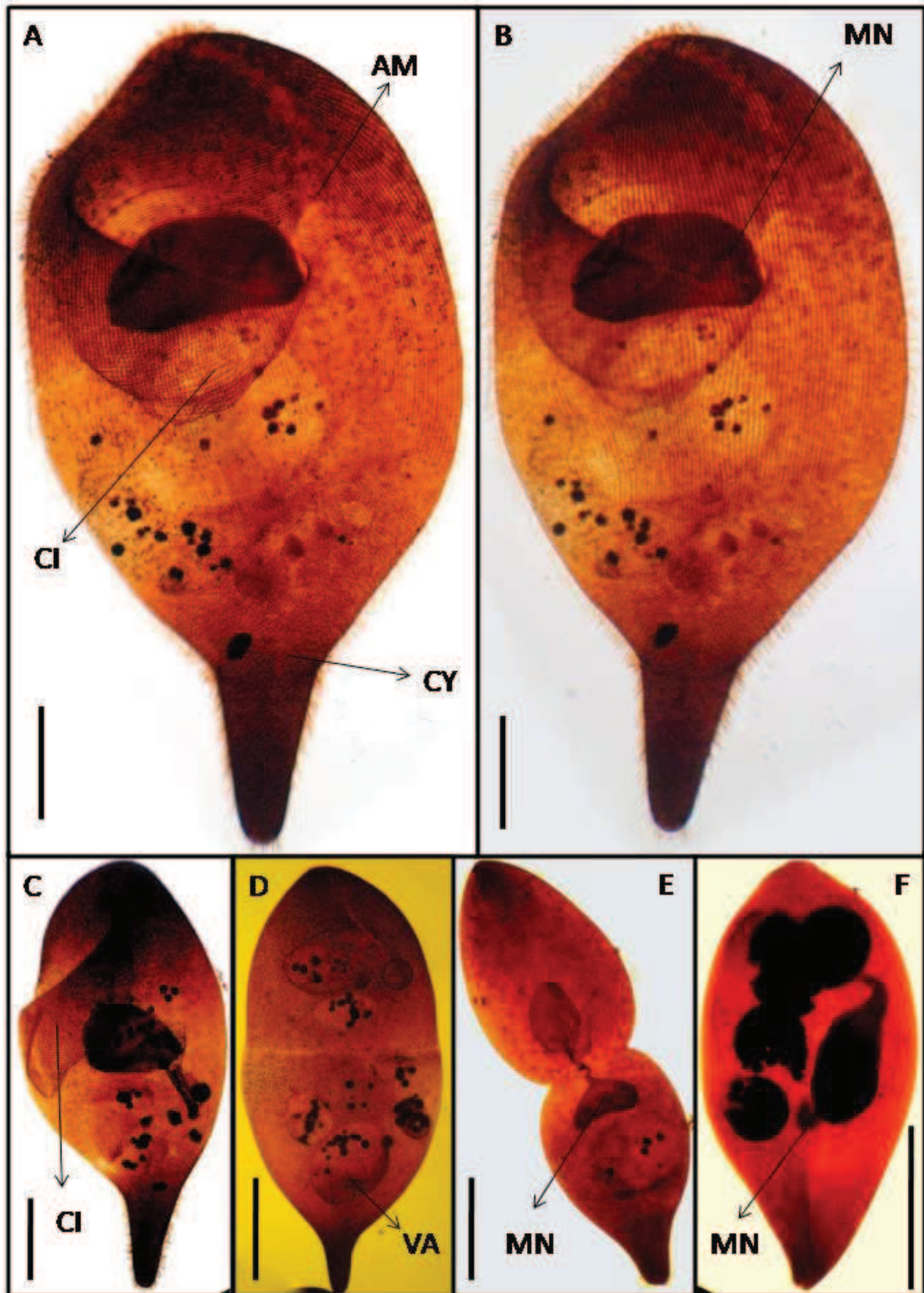


**Figura 2:** *Ballaenothrix bromelicola* gen. nov., sp. nov. (micrografias *in vivo*). A: Espécime da forma micróstoma iniciando a formação do infundíbulo. B: Forma macróstoma típica, com infundíbulo completamente formado. C: Extrusomas (EX) da região caudal. D: Vacúolos contráteis (VC) com vesículas coletoras. E: Espécime em processo de encistamento. F e G mostram as alterações morfológicas do início do processo de fissão binária. AI: abertura do infundíbulo. MN: macronúcleo. Barras = (A-C, F-H): 100µm; (D-E): 10µm.



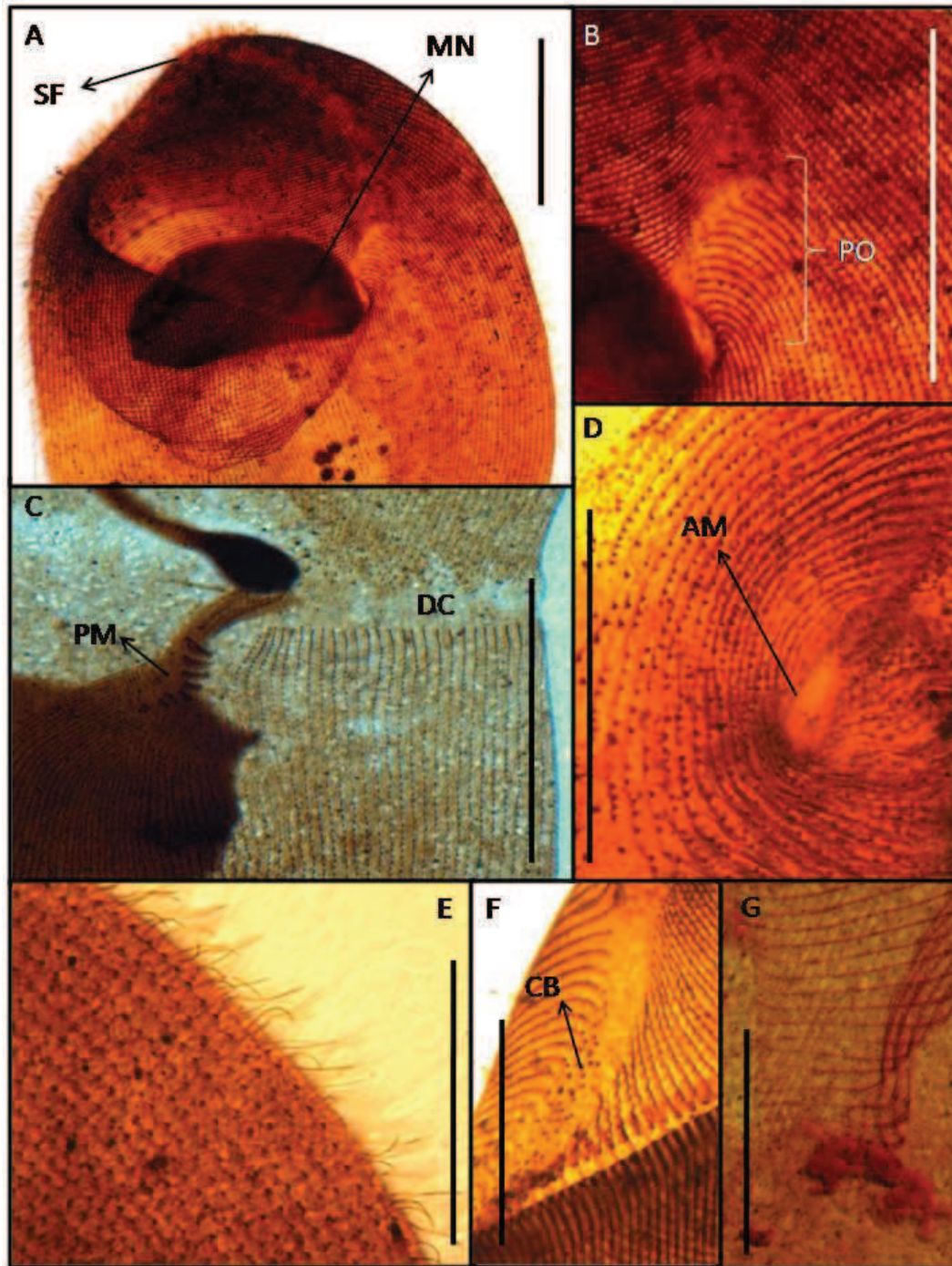


**Figura 3:** Alterações morfológicas durante o ciclo de vida de *Ballaenothrix bromelicola*. A: Forma macróstoma, predominante no ciclo. B-J: Alterações subsequentes, relacionadas com eventos de reprodução assexuada. SF: sutura frontal; PM: protomembranas; AI: abertura do infundíbulo; CI: cavidade do infundíbulo; CB: Proliferação de corpos. Barras = 150 $\mu$ m

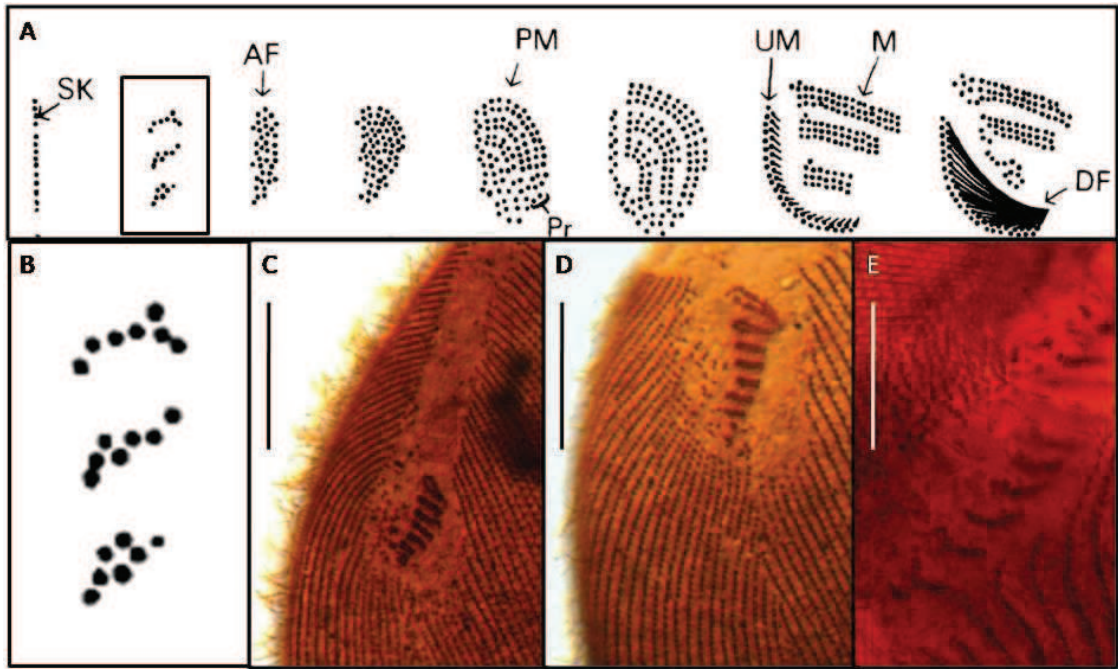


**Figura 4:** *Ballaenothrix bromelicola* impregnados do pelo carbonato de prata. A: região ventral, com posição da cavidade micróstoma (AM) evidenciada. B: região dorsal. C: cavidade do infundíbulo bucal (CI) vista lateralmente. MN: macronúcleo; CY: citoprocto. VA: vacúolos alimentares. Barras = 100µm.

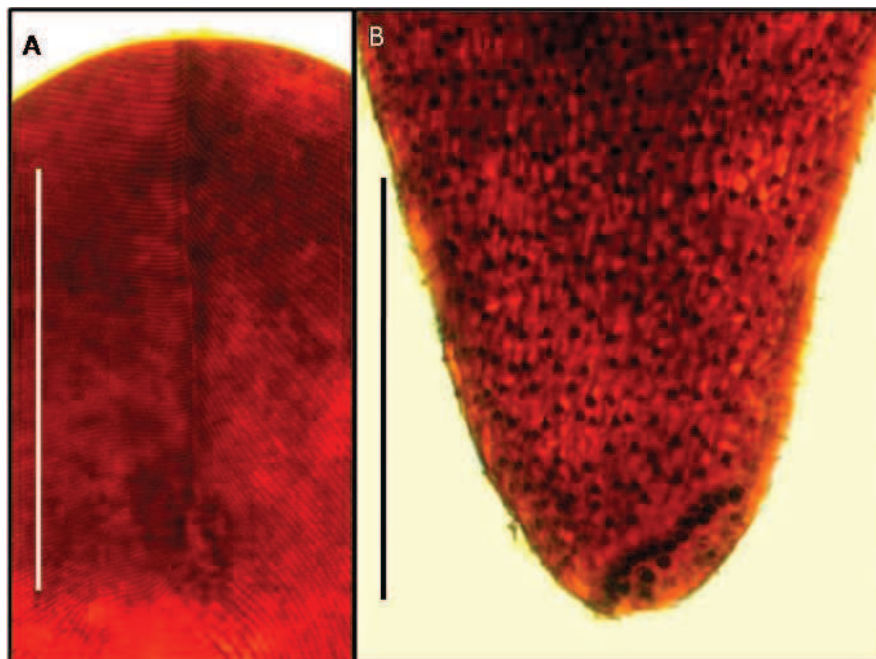




**Figura 5:** Detalhes da ciliatura oral e somática de espécimes de *Ballaenothrix bromelicola* impregnados pelo carbonato de prata: A: região anterior, com a sutura frontal evidenciada (SF) e o macronúcleo (MA). B: cinécias pós-orais (PO). C: protomembranas (PM) e a descontinuidade das cinécias (DC) durante o processo de fissão binária. D: abertura do citóstoma micróstoma (AM). E: cinetossomos da ciliatura somática e os cílios. F: proliferação de corpos basais na região não ciliada na margem esquerda do infundíbulo. G: porção terminal do infundíbulo, onde estruturas de membranas são ausentes. Barras = 100 $\mu$ m.



**Figura 6:** Caracteres diagnósticos de *Ballaenothrix bromelicola*. As protomembranelas são comparadas às apresentadas por outros tetrahymenídeos durante o processo de morfogênese. As imagens A e B foram retiradas de FRANKEL (1991). Entretanto, como demonstrado em C, D e E, as protomembranelas deste gênero novo são formadas a partir de um campo anárquico de corpos basais, marcados como AF na figura A. A ontogenia dessas estruturas em *Tetrahymena* sp. e no novo gênero é distinta. Barras = 50 $\mu$ m.



**Figura 7:** A: Extremidade anterior ventral de *Ballaenothrix bromelicola*, mostrando a sutura frontal. B extremidade posterior, mostrando os cinetossomos dos cílios caudais. Barras = 50 $\mu$ m.

### 1.3.2. Ontogenia:

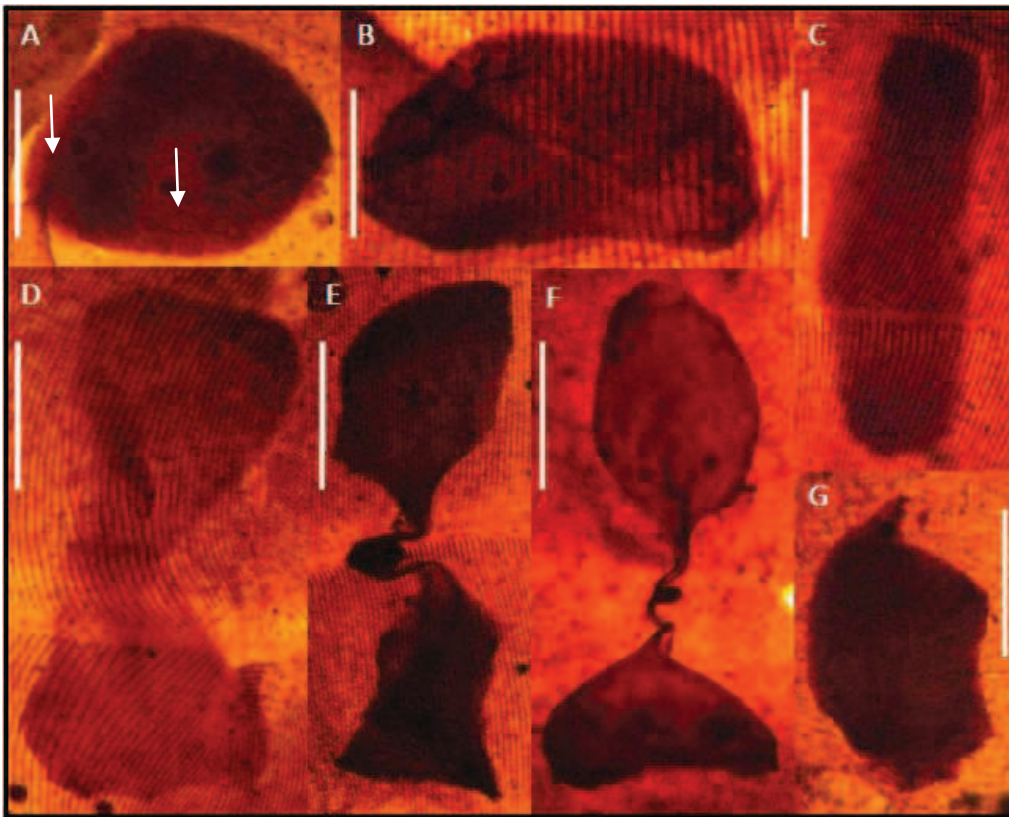
A primeira etapa do processo de fissão binária neste novo gênero é a perda da cavidade do infundíbulo. Os espécimes adquirem uma forma oval anteriormente, mantendo a cauda afilada na região posterior. Seguindo o padrão paracinetal de estomatogênese (FOISSNER, 1996), corpos basais surgem de modo desorganizado na região anterior e próximos ao equador do organismo (Figura 2). Subsequentemente, as cinécias somáticas se separam na região central, onde começa ocorrer o estrangulamento, e as formas *proter* e *opisthe* são, neste momento, distinguíveis. Na região de proliferação de corpos basais, desenvolvem-se novas protomembranelas (Figura 5, E).

As alterações macronucleares durante a morfogênese foram suficientemente registradas após impregnação pelo carbonato de prata (Figura 7). Observa-se o alongamento do macronúcleo – arredondado durante a intérfase –, que passa a apresentar forma de bastão, e sua inclinação em um ângulo de 180 graus, permanecendo paralelo ao eixo longitudinal do ciliado. Após esta etapa, os micronúcleos não estão mais perceptíveis. Começa, então, a ocorrer torção do material nuclear e sua divisão entre as formas *proter* e *opisthe*. Nesse processo de divisão, uma fina espiral de cromatina é formada. Finalmente ocorre a separação do material nuclear das formas divisionais e seu condensamento, momento a partir do qual os micronúcleos são novamente notados. Não foram observados eventos de reprodução sexuada (conjugação).

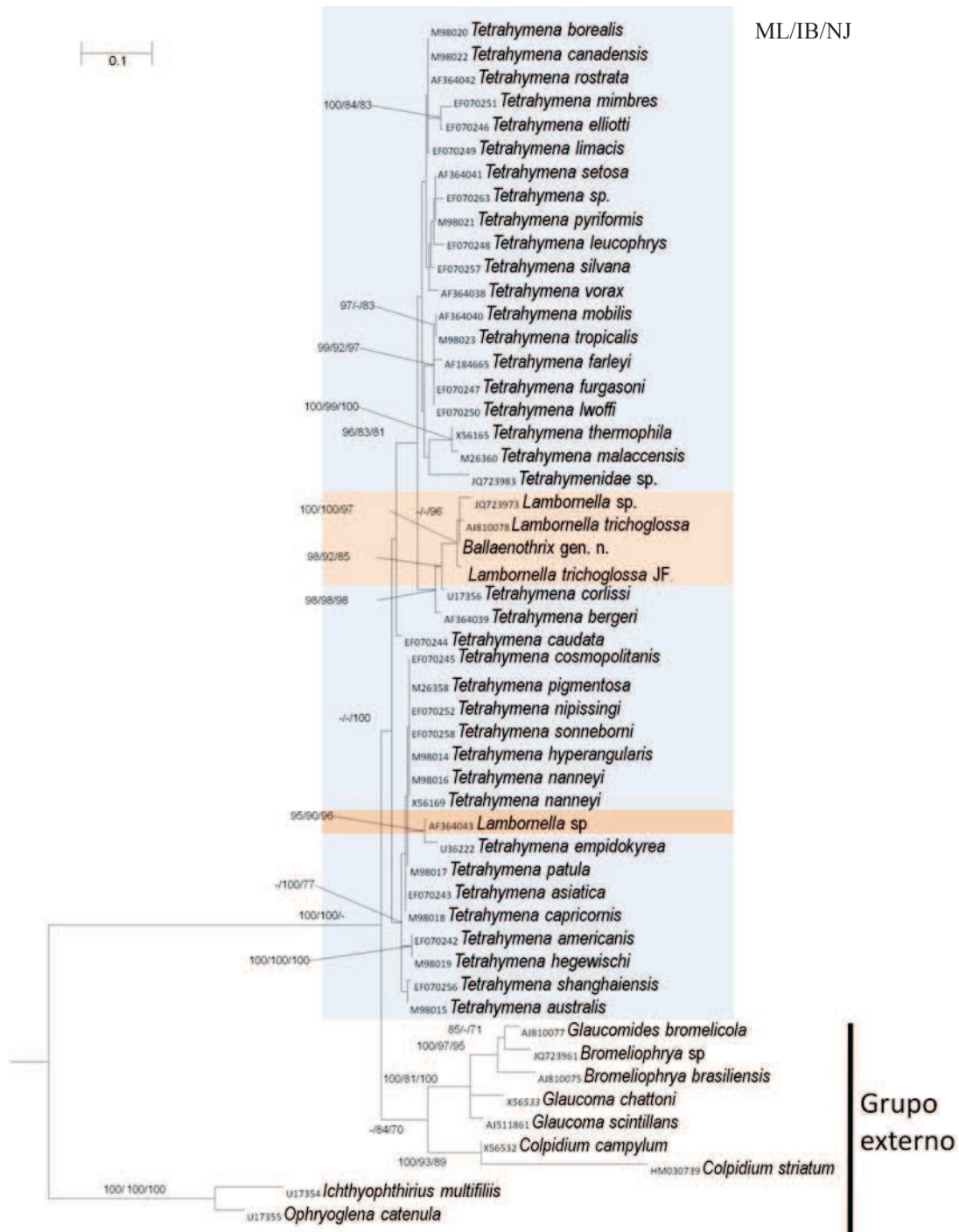
### 1.3.3. Caracterização molecular e posição filogenética

A sequência 18s-rDNA completa de *Ballaenothrix bromelicola* sp. nov. apresenta 1711 pares de bases, sendo 27,23% adenina; 24,72% citocina, 18,17% guanina e 29,86% timina. A sequência COI, por sua vez, apresenta 788 pares de bases, dos quais 34,26% são compostos por adenina; 12,69% citocina; 13,57% guanina e 39,46% timina. *Lambornella trichoglossa* apresenta sua sequência 18S-rDNA formada por 1712 pares de bases, sendo 27,27% adenina; 24,59% citocina; 18,10% guanina e 30,02% timina; e sequência do gene COI formada por 774 pares de bases, sendo 32,94% adenina; 12,01% citocina; 13,43% guanina e 41,60% timina. Todas as sequências obtidas no presente estudo serão depositadas no banco de dados NCBI/GenBank. Nas análises filogenéticas usando gene 18S-rDNA *Ballaenothrix bromelicola* gen. nov., sp. nov. se agrupou entre as espécies do gênero *Tetrahymena*, em clado contendo *Lambornella* spp. e *T. corlissi* + *T. bergeri*. Nas análises filogenéticas usando gene COI *B. bromelicola* e *Lambornella* spp. se agruparam em clado distinto de *Tetrahymena* spp. (Figuras 9 e 10).

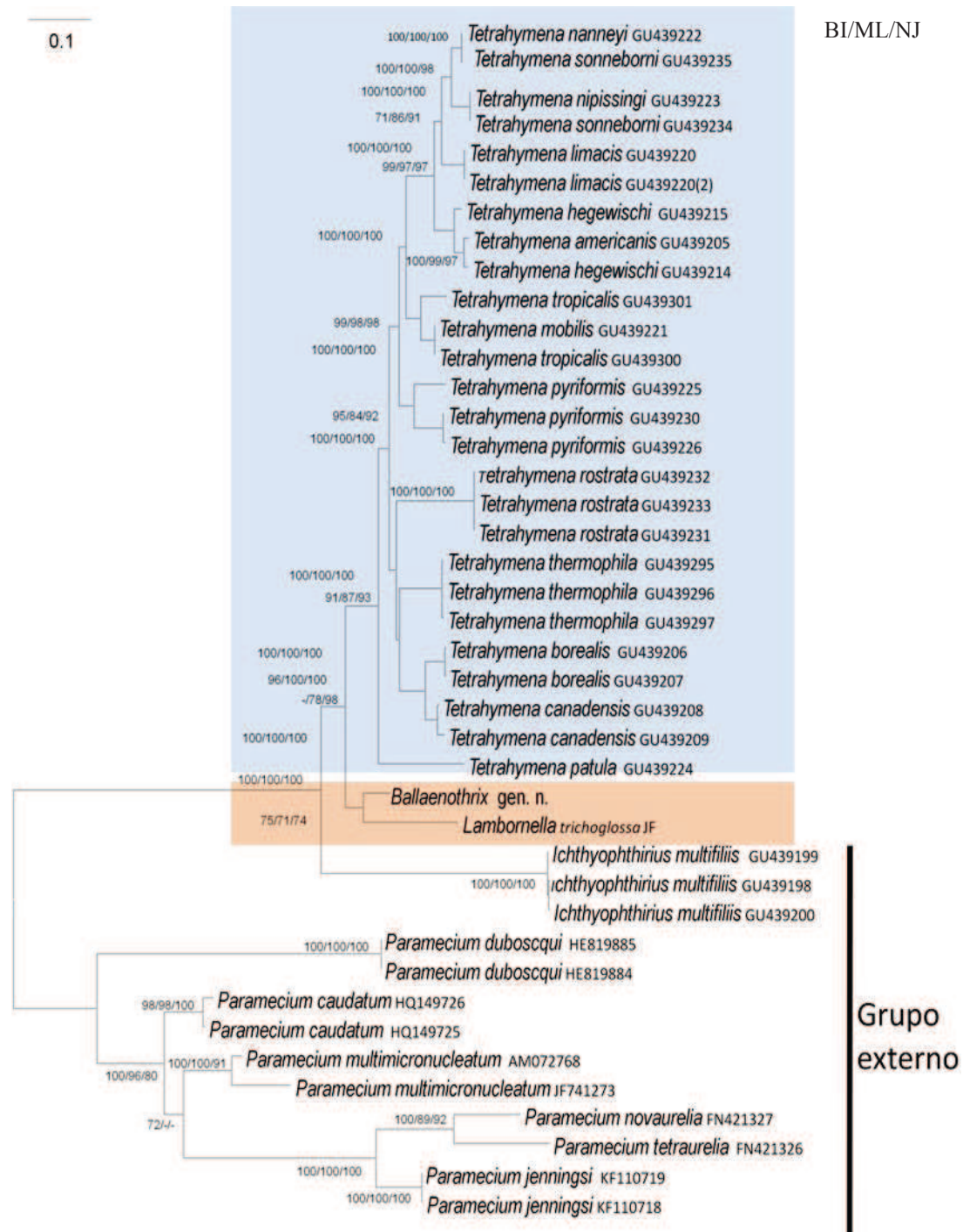




**Figura 8:** Alterações macronucleares ocorridas durante o processo de fissão binária. Em A, o macronúcleo e os micronúcleos (setas) no período de intérfase. B e C mostram o alongamento do macronúcleo e sua mudança de posição dentro do organismo, tornando-se paralelo ao eixo longitudinal. D mostra o início do processo de torção do macronúcleo, continuado em E e F, onde pode-se perceber a forma helicoidal da ponte de cromatina entre as formas divisionais. G mostra o macronúcleo recém organizado de um espécime opisthe. Barras = 80 $\mu$ m.



**Figura 9:** Árvore filogenética com representantes da ordem Tetrahymenida (famílias Ichthyophthiriidae, Turaniellidae, Bromeliophryidae, Glaucoidae e Tetrahymenidae) e Ophryoglenida (família Ophryoglenidae), inferida a partir de sequências 18S-rDNA, obtida por máxima verossimilhança. Valores de probabilidade posterior e bootstrap menores que 70 não estão apresentados.



**Figura 10:** Árvore filogenética inferida a partir da análise do gene mitocondrial citocromo oxidase sub-unidade I (COI), obtida por inferência bayesiana. Inclui representantes da ordem Tetrahymenida (Subclasse Hymenostomata): famílias Tetrahymenidae e Ichthyophthiriidae. O grupo externo é composto por representantes da subclasse Peniculia. Valores de probabilidade posterior e bootstrap menores que 70 não estão apresentados.



## 1.4 DISCUSSÃO

### 1.4.1 Morfologia do novo gênero

Ciclos de vida polimórficos, com alternância de fases micróstoma e macróstoma são comuns entre os tetrahymenídeos (LYNN, 2008). Diversas publicações apresentam *Tetrahymena vorax* Kidder, 1941 como modelo de estudos sobre as alterações ocorridas durante esta transição. BUHSE (1966) afirmou que o surgimento de formas macróstomas em *T. vorax* é induzido pela presença de presas maiores que bactérias (ex.: *Tetrahymena pyriformis* Lwoff, 1947), justificando a ausência de metamorfose em cultivos monoxênicos. RYALS *et al.* (1999), por sua vez, destacaram a ação da estomatina (um complexo orgânico constituído por ferro e catabólitos de ácidos nucleicos) e seus derivados sintéticos (ARAUZ *et al.*; 2009) na indução da diferenciação.

BUHSE (1966) descreveu o processo de formação da estrutura macróstoma em *T. vorax*. As etapas incluem a completa absorção do aparato oral micróstoma, acompanhada da proliferação de um campo anárquico de corpos basais que originam o grande citóstoma secundário. Membranelas adorais e parorais são também reconhecidas nas formas macróstomas, ou seja, o *bauplan* micróstoma, característico do grupo, não é completamente perdido (ARAUZ *et al.* 2009).

Entretanto, no novo gênero apresentado a formação do citóstoma maior se dá pela invaginação da superfície ventral anterior, em um processo que não apresenta homologia com o desenvolvimento macróstoma de *T. vorax*. A permanência do citóstoma primário (micróstoma), mesmo após a formação do infundíbulo (macróstoma) é outra característica que diferencia os padrões de desenvolvimento de *Tetrahymena* e do novo gênero, visto que este último passa a apresentar duas cavidades orais, uma característica inédita na família Tetrahymenidae.

O conspícuo infundíbulo característico do gênero, também deve ser compreendido como uma estrutura diferenciada do aparato macrostomial de *T. vorax*. A especialização das cinécias ventrais na região do infundíbulo do novo gênero representa um mecanismo de captura de alimento independente de membranelas, algo nunca registrado família Tetrahymenidae. Com isso entende-se que a estrutura do infundíbulo do novo gênero é ontogenicamente e funcionalmente distinta do simples surgimento da cavidade oral ampliada em *T. vorax*.

Embora o grande tamanho e o pronunciado infundíbulo sejam as características mais conspícuas do novo táxon apresentado, as pequenas protomembranelas adorais observadas na margem esquerda da abertura infundibular são os elementos determinantes para o

posicionamento taxonômico desta espécie em relação ao gênero *Tetrahymena*. Essas estruturas são morfologicamente similares às registradas por FRANKEL (1991) em estágios precoces da estomatogênese de mutantes de *Tetrahymena* sp. Entretanto, o número aumentado destas estruturas (9 versus 3-4 observadas em *Tetrahymena* spp.) e o diferenciado processo de formação denotam um novo padrão de desenvolvimento. Diferente, mas certamente derivado, de *Tetrahymena*, o que justificaria a inclusão do gênero na família Tetrahymenidae.

**Quadro 3\*:** Comparação entre o novo ciliado descrito e os quatro gêneros da família Tetrahymenidae reconhecidos por LYNN (2008). Entretanto, AESCHT (2001) considera *Paraglaucoma* Kahl, 1926 sinônimo júnior de *Tetrahymena*.

Características	<i>Deltopylum</i>	<i>Lambornella</i>	<i>Paraglaucoma</i>	<i>Tetrahymena</i>	"Novo Gênero"
Pequeno tamanho (<100µm)	+		+	+	
Livre-natante	+	+	+	+	+
Holotríqueo	+	+	+	+	+
Macronúcleo golobular, elíptico, ou alongado	+	+	+	+	+
Micronúcleo presente	+	+	+	+	+
Vacúolo contrátil presente	+	+	+	+	+
Citoprocto presente	+	+	+	+	+
Formação de cistos de resistência	+	+	+	+	+
Agrupamento 18S-rDNA	+	+	+	+	+
1-9 cinécias pós-orais	+	+	+	+	
3 policinécias adorais	+	+	+	+	
Membranela paroral	+	+	+	+	
Transformação Micróstoma-Macróstoma 1				+	
Ciclo de vida polimórfico					+
Separação de <i>Tetrahymena</i> no Agrupamento COI		+			+
Transformação Micróstoma-Macróstoma 2					+
Protomembranelas permanentes (+ de 5)					+
2 cavidades orais diferenciadas ontogeneticamente					+

\*A parte superior do quadro (fundo claro) indica as características comuns aos membros da família Tetrahymenidae, bem como caracteres tipicamente observados em *Tetrahymena* spp. Nota-se que a espécie apresentada não compartilha de todos estes caracteres. Na parte de baixo da tabela (fundo escuro) estão indicadas as características diferenciais observadas na espécie aqui descrita. + = presença da característica. Gêneros comparados: *Deltopylum* Fauré-Fremiet & Mugard, 1946; *Lambornella* Keilin, 1921; *Paraglaucoma* Kahl, 1926 e *Tetrahymena* Furgason, 1940.

#### 1.4.2. Sobre a posição filogenética do novo gênero

As sequências 18S-rDNA obtidas no presente estudo apresentam elevada similaridade (>99%) com aquelas apresentadas por FOISSNER *et al.* (2003a) e DUNTHORN *et al.* (2012). Tal equivalência, associada às descrições morfológicas preliminares feitas por FOISSNER *et al.* (2003), indicam que o “tetrahymenídeo gigante” mencionado nos referidos trabalhos provavelmente se trata de um representante do gênero descrito neste trabalho. Esta constatação amplia a distribuição geográfica do táxon para, além do Brasil, Equador e República Dominicana.

As reconstruções filogenéticas elaboradas a partir do marcador 18S-rDNA sugerem a sinonimização do novo gênero com *Tetrahymena*. De fato, pautando-se nas variações do gene 18S-rDNA, toda a ordem Tetrahymenida poderia ser reunida em um único gênero (FOISSNER *et al.*, 2003). Assim sendo, a divergência entre o novo táxon apresentado e as espécies relacionadas de *Tetrahymena* pode ser melhor representada pela filogenia estabelecida a partir de outros marcadores moleculares. CHANTANGSI & LYNN (2011) demonstraram a aplicabilidade do gene mitocondrial COI na diferenciação das espécies de *Tetrahymena* em dois grandes grupos (*australis* e *borealis*), algo não detectável com o 18S-rDNA. A reconstrução filogenética baseada nas variações do marcador COI aqui apresentada, entretanto, demonstrou a clara separação do novo gênero em relação a qualquer complexo específico de *Tetrahymena*. Esta posição, como um clado independente, justifica seu reconhecimento como um novo gênero.

A análise filogenética baseada em sequências 18S-rDNA, corrobora o trabalho de FOISSNER *et al.* (2003), apontando a proximidade do novo gênero com *Tetrahymena corlissi*. Entretanto, as diferenças morfológicas existentes entre os dois táxons exemplificam claramente um processo macro-evolutivo deflagrado dentro do clado. De acordo com (SIMON, 2010), este tipo de especiação pode estar relacionado com a abertura de novos nichos ecológicos ou modificações no processo de desenvolvimento, o que poderia resultar em um novo padrão corpóreo.

*T. corlissi* é um pequeno ciliado (cerca de 50µm x 30 µm) relativamente comum em ambientes de água doce, parasito facultativo de peixes (HOFFMAN *et al.*, 1975). A ubiquidade de *T. corlissi* explicita sua tolerância a variações ambientais, um atributo ecológico que permitiria a colonização de ambientes fitotelmais por esta espécie. Neste sentido, a similaridade genética de deste novo gênero com *T. corlissi* poderia ser entendida como produto de um ancestral comum, ecologicamente similar a *T. corlissi*.

Espécies tolerantes de micro-organismos e metazoários podem explorar fitotelmos como se estes fossem poças temporárias (MAGUIRE, 1971). Dessa forma, eventos de colonização de fitotelmos de Bromeliaceae devem ter sido comuns tão breve esses ambientes tenham surgido. SITTE *et al.* (1991) afirmou que essa família botânica teve sua origem no período Cretáceo, a cerca de 65 milhões de anos atrás. Entretanto, eventos de especialização e consequente adaptação evolutiva a este meio parecem ter ocorrido mais de uma vez dentro da ordem Tetrahymenida: Além da família Bromeliophryidae, agora se reconhece este novo gênero aqui descrito como um clado cuja história evolutiva é estreitamente relacionada com as Bromeliaceae.

## 1.5. CONCLUSÕES

A morfologia única da nova espécie apresentada extrapola a plasticidade fenotípica observada em *Tetrahymena* spp. (FRANKEL, 1991), o que permite a afirmação de que as divergências entre os dois gêneros são mais do que um rearranjo no processo de desenvolvimento, mas sim um evento de especiação.

Dado o forte suporte molecular demonstrado pela reconstrução filogenética pautada no gene mitocondrial COI e por todas as particularidades morfológicas que destacam o ciliado aqui descrito das espécies molecularmente mais próximas (com base em sequências 18S-rDNA), este organismo deve ser interpretado como um novo táxon, rejeitando-se a proposta de sinonimização feita por LYNN (2008).

O registro da nova espécie apresentada em uma bromélia endêmica da Floresta Atlântica (*Portea petropolitana*) e concomitantemente em uma espécie de bromélia explorada comercialmente, comumente usada em projetos paisagísticos (*Alcantarea imperialis*) corrobora DUNTHORN *et al.* (2012), enfatizando a inexistência da especificidade entre ciliados fitotelmais e bromélias hábitats.

## 1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUZ, Verônica *et al.* Induction of the Macrostomal Form of *Tetrahymena vorax* by a Synthetic Ferrous Iron Chelate of Hypoxanthine and Uracil. **Transactions of the Illinois State Academy of Science**, n. 102, p. 33-43, 2009.

BOURLAND, Willian & STRÜDER-KYPKE, Michaela. *Agolohymena aspidocauda* nov. gen., nov. spec., a histophagous freshwater tetrahymenid ciliate in the family Deltopylidae (Ciliophora, Hymenostomatia) from Idaho (northwest U.S.A.): Morphology, ontogenesis and molecular phylogeny. **European Journal of Protistology**, n.46, p. 221-242, 2010.

BUHSE, Howard E. Oral Morphogenesis During Transformation From Microstome To Macrostome And Macrostome To Microstome in *Tetrahymena vorax* Strain V2 Type S1. **Transactions of the Illinois State Academy of Science**, n. 85, p. 305-313, 1966.

BUOSI, Paulo *et al.* Multiple Lines of Evidence Shed Light on the Occurrence of *Paramecium* (Ciliophora, Oligohymenophorea) in Bromeliad Tank Water. **Journal of Eukariotical microbiology**, p. 1-9, 2013.

CHANTANGSI, Chitchai & LYNN, Denis H. Phylogenetic relationships within the genus *Tetrahymena* inferred from the cytochrome c oxidase subunit 1 and the small subunit ribosomal RNA genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, n. 49, p. 979–987, 2008.

CHANTANGSI, Chitchai & LYNN, Denis H. Phylogenetic relationships within the genus *Tetrahymena* inferred from the cytochrome c oxidase subunit 1 and the small subunit ribosomal RNA genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, n. 49, p. 979–987, 2008.

DUNTHORN, Micah *et al.* Diversity and endemism of ciliates inhabiting Neotropical phytotelmata. **Systematics and Biodiversity**, iFirst, p. 1–11, 2012.

ESTEVEZ, Carlos & SILVA-NETO, Inácio. Study of Hymenostomatida ciliates found in water tanks of Bromeliaceae from Bracuhy Port, Angra dos Reis, Rio de Janeiro. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, n. 91, p., 63, 1996.

FISH, Derick. Phytotelmata: terrestrial plants as hosts for aquatic insect communities. In: FRANK, J. H. & LOUNIBOS, L. P. **Phytotelmata: flora and fauna**. Nova Jersey, editora Plexus, p. 1–28, 1983.

FOISSNER, Wilhelm *et al.* Endemic ciliates (Protozoa, Ciliophora) from tank bromeliads (Bromeliaceae): a combined morphological, molecular, and ecological study. **European Journal of Protistology**, n. 39, p. 365–372, 2003.

FOISSNER, wilhelm. Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa. **European Journal of Protistology**, n. 27, p. 313-330, 1991.

FOISSNER, Wilhelm. Biogeography and Dispersal of Micro-organisms: A Review Emphasizing Protists. **Acta Protozoologica**, n. 45, p. 111-136, mar. 2006.

FONTES, Natália *et al.* **Valoração ambiental do Sítio Malícia: laudo técnico**. Juiz de Fora: Juiz de Fora Ambiental Consultoria e Projetos Ltda, 2008.

FRANKEL, Joseph. The Patterning of Ciliates. **Journal of Protozoology**, n. 38, p. 519-525, 1991.

GUINDON, Simon & GASCUEL, Oliver. PhyML - a simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, n. 52, p. 696–704 2003.

HOFFMAN, Glenn L. *et al.* A Disease of Freshwater Fishes Caused by *Tetrahymena corlissi* Thompson, 1955, and a Key for Identification of Holotrich Ciliates of Freshwater Fishes. **The Journal of Parasitology**, vol. 61, n. 2, p. 217-223, abr. 1975.

INTERNATIONAL COMMISSION ON ZOOLOGICAL NOMENCLATURE. **International Code of Zoological Nomenclature**, 4ª edição, Londres, 1999.

LAESSLE Anthony. A micro-limnological study of Jamaican bromeliads. **Ecology**, n. 42, p. 499–517, 1961

LITTLE, Thomas & Hebert, Paul. Endemism and ecological islands: the ostracods from Jamaican bromeliads. **Freshwater Biology**, n. 36, p. 327–338, 1996.

LYNN, Denis H. **The Ciliated Protozoa**. 3ª edição. Guelph, Canadá: Springer, 2008. 605p.

MAGUIRE, Basset-Jr. Phytotelmata: biota and community structure determination in plant-held waters. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Vol. 2, p. 439-464, 1971.

PICADO Carl. Les broméliacees épiphytes. Considérées comme milieu biologique. **Bull. scientist fr. Belgium**, n. 47, p. 215–360, 1913.

RICE, Phillip, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends in Genetics** 16, p. 276-277. 2000. doi:10.1016/S0168-9525(00)02024-2

RONQUIST, Frederich *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, n 61, p 539-542, 2012.

RYALS, Phillip; SOOCHAN, Bae; PATTERSON, Charles. Evidence for Early Signaling Events in Stomatin-Induced Differentiation of *Tetrahymena vorax*. **Journal of Eukariotical Microbiology**, n. 46, p. 77-83, 1999.

SABAGH, Leandro *et al.* News records of phoresy and hyperphoresy among treefrogs, ostracods, and ciliates in bromeliad of Atlantic forest. **Biodiversity and Conservation**, n. 20, p. 1837–1841, 2011.

SCHRALLHAMMER, Martina *et al.* Candidatus *Megaira polyxenophila* gen. nov., sp. nov.: Considerations on Evolutionary History, Host Range and Shift of Early Divergent Rickettsiae. **PLoS ONE**, n. 8(8): e72581. doi:10.1371/journal.pone.0072581

SIMON, Monique Phenotypic accommodation and genetic accommodation: evidence and unresolved issues in macroevolution. **Revista da Biologia**, n. 6, p. 1-5, 2010.

SITTE Patrick *et al.* **Lehrbuch der Botanik**. 33<sup>a</sup> edição. G. Fischer, Stuttgart, Jena, New York. 1991. p. 407.

STRÜDER-KYPKE, Michaela C. & LYNN, Denis H. Comparative analysis of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene in ciliates (Alveolata, Ciliophora) and evaluation of its suitability as a biodiversity marker. **Systematics and Biodiversity**, n. 8, p. 131-148, 2010.

STRÜDER-KYPKE, Michaela *et al.* Parallel evolution of histophagy in ciliates of the genus *Tetrahymena*. **Evolutionary Biology**, n. 1, p. 5, 2011.

TAMURA, Kashima *et al.* Mega 5.0: Molecular evolutionary genetic analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology Evolutionary**, n. 28, p. 2731-2739, 2011.

VELOSO, Hélio; FILHO, Alberto; LIMA, Janete. **Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1991.



## SEÇÃO II

DIVERSIDADE DE MICROEUCARIOTOS CILIADOS ASSOCIADOS A LIQUENS NO MUNICÍPIO DE JUIZ DE FORA, SUDESTE DO BRASIL E DESCRIÇÃO DE *HEMICYCLIOSTYLA* SP. NOV. (CILIOPHORA, SPIROTRICHEA, UROSTYLIDA)

### RESUMO:

Este capítulo apresenta o inventário da taxocenose de Ciliophora associados a fungos epífitos do gênero *Parmotrema* coletados no câmpus da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. Foram reconhecidas 21 morfoespécies em observações *in vivo*, e identificadas doze 12 espécies com base na técnica de impregnação pelo proteinato de prata e microscopia eletrônica de varredura. Apresenta-se ainda a descrição de *Hemicycliostyla* sp. nov., um novo táxon da família Urostylidae Bütschli, 1889. A caracterização do ambiente liquênico como um hábitat especializado para ciliados é discutida.

### 2.1 INTRODUÇÃO

Segundo RAVEN (1996), há cerca de 13500 espécies de fungos ascomicetos capazes de desenvolver associação simbiótica com algas ou cianobactérias, em um processo denominado liquenização. MARCELLI (2006), por sua vez, afirma que a interação entre fungos e fotobiontes ocorre também nos grupos dos basidiomicetos e deuteromicetos, sendo um processo altamente vantajoso para os fungos. Este mesmo autor afirma que a liquenização surgiu em momentos diferentes na história evolutiva dos fungos.

Há grande diversidade morfológica de talos de liquens, a maioria podendo ser medida entre 1 e 30 centímetros. Mas existem formas microscópicas e, em outro extremo, organismos que superam 1 metro de extensão (MARCELLI, 2006). Os morfotipos denominados “foliosos” se prendem ao substrato por projeções especializadas, de modo que não ficam completamente aderidos às superfícies sobre as quais se desenvolvem. Esta condição morfológica permite o acúmulo de partículas de solo e pequenas quantidades de húmus e matéria orgânica entre o líquen e o substrato, criando um micro-hábitat onde podem ser encontrados briófitas, micro-organismos procariotos e eucariotos, nematóides, rotíferos, tardígrados e insetos (ROBERTS & ZIMMER, 1990).

Existem poucos estudos registrando a riqueza de espécies de ciliados associada a fungos liquenizados (GELLÉRT, 1955; FOISSNER, 1986 e ROBERTS & ZIMMER, 1990), destacando-se estudo realizado por FOISSNER (1986) que registrou 26 espécies de ciliados



associados a líquens coletados na Áustria, Alemanha, França e Quênia. Entretanto, no referido trabalho, foram eliminadas as partículas de sedimentos naturalmente presente nas amostras, com o intuito de verificar a diversidade de ciliados presentes somente nos tecidos líquênicos. As espécies de ciliados registradas por FOISNER (1986) em líquens foram previamente registradas em ambientes edáficos e/ou de água doce. O referido autor sugere que fungos líquenizados são habitats inóspitos para ciliados. Desde então, os ciliados encontrados em amostras de líquens têm sido considerados integrantes da taxocenose de ciliados do solo.

Diante da inexistência de inventários de ciliados associados a líquens no Brasil e da escassez de trabalhos sobre ciliados em ambientes edáficos no país, o presente estudo teve como objetivos <sup>1</sup>realizar inventário da taxocenose de ciliados associados a líquens epífitos coletados em uma área urbana do município de Juiz de Fora, Minas Gerais, utilizando técnicas ciliatológicas, e <sup>2</sup>descrever uma nova espécie do gênero *Hemicycliostyla* Stokes, 1886.

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1. Local das coletas**

Com o auxílio de uma espátula, foram coletadas amostras de líquens foliosos epífitos do gênero *Parmotrema* no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (S 21° 46' 36.94", W 43° 22' 38"), estado de Minas Gerais, Brasil. Com este material, foram preparados cultivos em placas de Petri, adicionando-se água mineral e grãos de arroz com casca macerados, de acordo com FOISSNER (1992). Este método propicia a proliferação das bactérias naturalmente presentes nas amostras, o que induz o excistamento dos ciliados bacterívoros. Durante a elaboração dos cultivos não foram removidos os sedimentos acumulados nos talos dos líquens coletados.

### **2.2.2. Processamento e análise das amostras**

Os cultivos foram observados em microscópio estereoscópico, em aumentos de 20x a 90x. Os ciliados ativos encontrados foram triados com o auxílio de micropipetas de vidro e dispostos entre lâmina e lamínula para observação em microscópio com contraste de fase e contraste interferencial diferencial (DIC), em aumentos de 40x a 1000x, para observação de estruturas de relevância taxonômica. Alíquotas dos ciliados presentes nas amostras foram triadas e transferidas para uma saleira e fixadas com bouin por 30 minutos. Após este período, foram lavadas com água destilada repetidas vezes, até a completa eliminação do fixador,

deixando os ciliados imersos em uma pequena quantidade de água. Foi adicionada uma pequena gota de albumina glicerinada e montadas lâminas para a realização da técnica do Protargol, segundo DIECKMAN (1995). Os espécimes melhor impregnados foram objetos de estudo morfométrico realizado com o auxílio do programa Image Pro-Plus 5.0 Olympus. Amostras de ciliados também foram fixadas e processadas segundo SILVA–NETO (1994) para realização de eletromicrografias de varredura.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1. Ciliatofauna associada a fungos liquenizados

Foram encontrados 21 morfotipos de ciliados nos cultivos, classificadas segundo LYNN (2008) no quadro 1 e ilustradas na figura 1(a-v). Dentre os morfotipos registrados, foram identificadas doze espécies de ciliados com base em observações *in vivo*, organismos impregnados e eletromicrografias.

#### 2. *Hemicycliostyla* sp. nov.

**Classe:** Spirotrichea Bütschli, 1889

**Subclasse:** Stichotrichia Small & Lynn, 1985

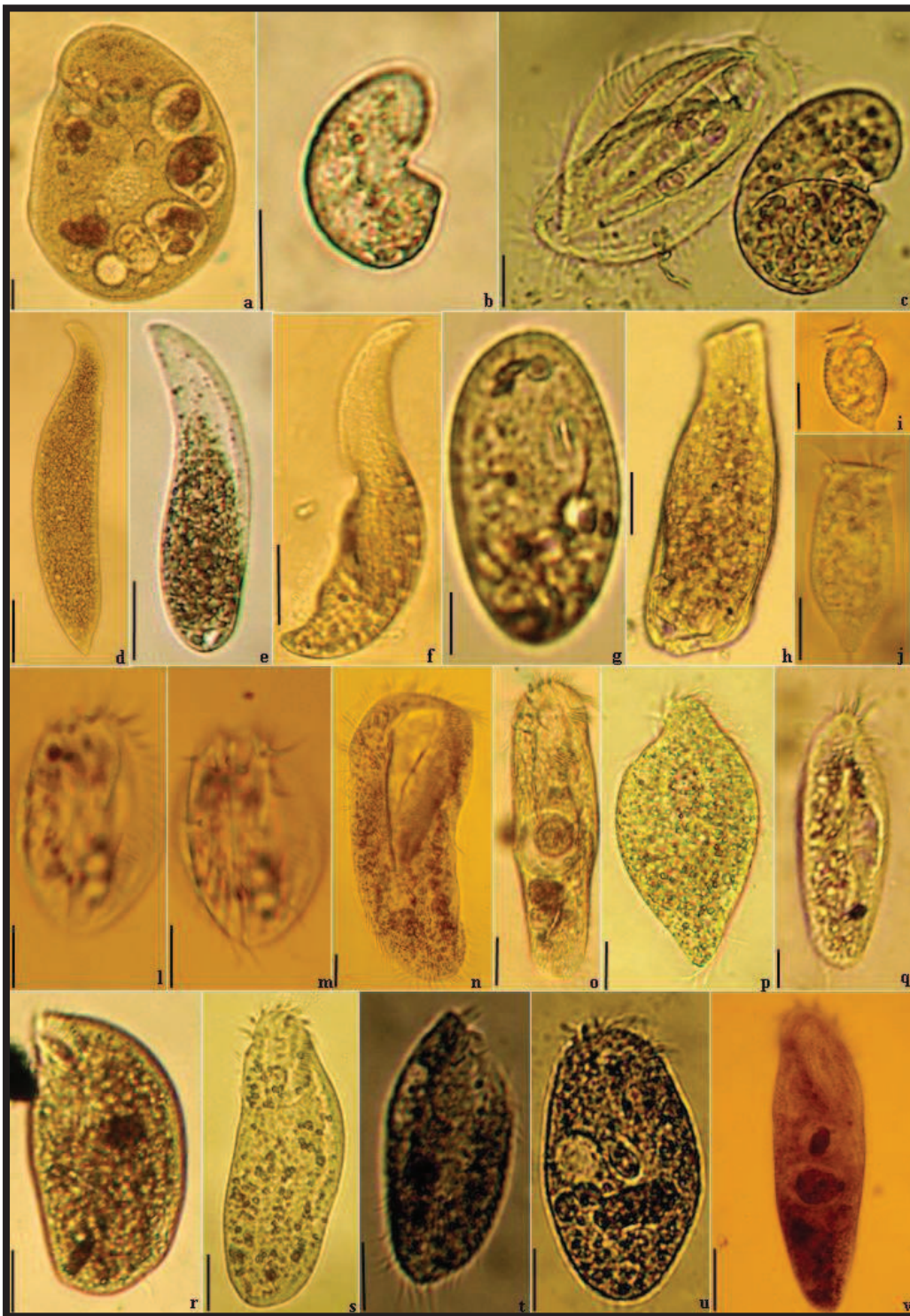
**Ordem:** Urostylida Jankowski, 1979

**Família:** Pseudourostylidae Jankowski, 1979

**Gênero:** *Hemicycliostyla* Stokes, 1886

**Espécie:** *Hemicycliostyla* sp. nov.

A população encontrada apresenta tamanho médio de 260µm x 100µm; com mais de 200 nódulos macronucleares, com cromatina fortemente condensada, dispersos de modo homogêneo por todo o organismo, à exceção da extremidade anterior. A bicorona formada por cerca de 20 cirros frontais e pré-orais é fortemente impregnada pelo proteinato de prata. Abaixo dela, inicia-se a dupla fileira de cirros ventrais, que se estende até pouco além do início da zona adoral de membranelas (ZAM), na região mediana ventral. A conspícua zona adoral de membranelas confere um formato oblíquo à extremidade antero-frontal, sendo a região posterior mais arredondada e mais estreita.

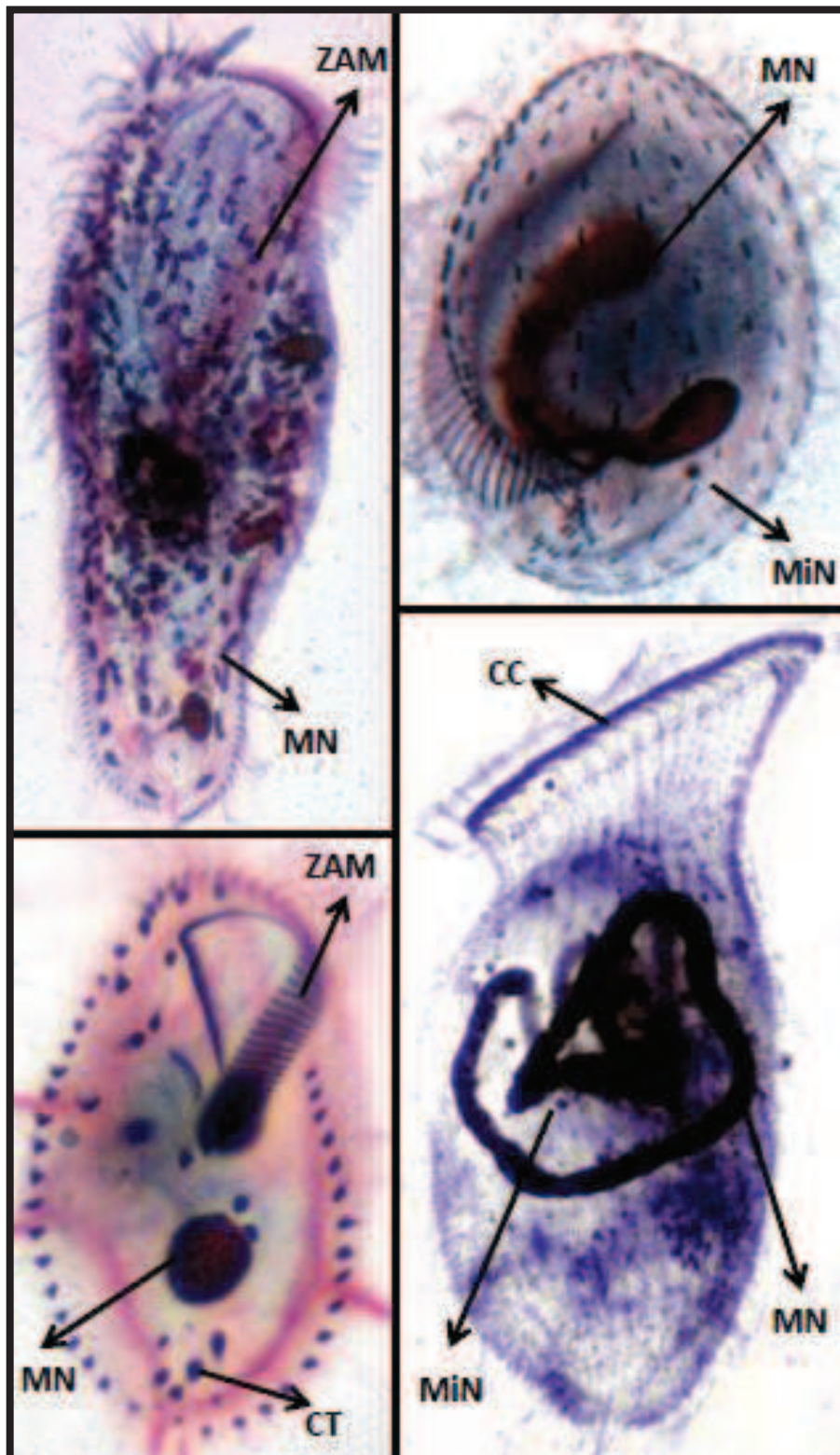


**Figura 1 (a-v).** Protozoários ciliados associados a líquens coletados no campus da Universidade Federal de Juiz de Fora/Minas Gerais. **a-b.** Classe Colpodea; **c.** *Phachodinium metchnicoffi* Certes, 1891 (Classe Spirotrichea, Ordem Phacodiniida) à esquerda e um colpodídeo (Colpodea) à direita; **d-f.** Classe Litostomatea; **g.** Classe Oligohymenophorea, Ordem Peniculida; **h.** Classe Heterotrichea; **i-j.** Classe Oligohymenophorea, Ordem Sessilida; **l-m.** Classe Spirotrichea, Ordem Euplotida; **n-v.** Classe Spirotrichea, Sub-classe Stichotrichia. Barras = 20  $\mu\text{m}$ .

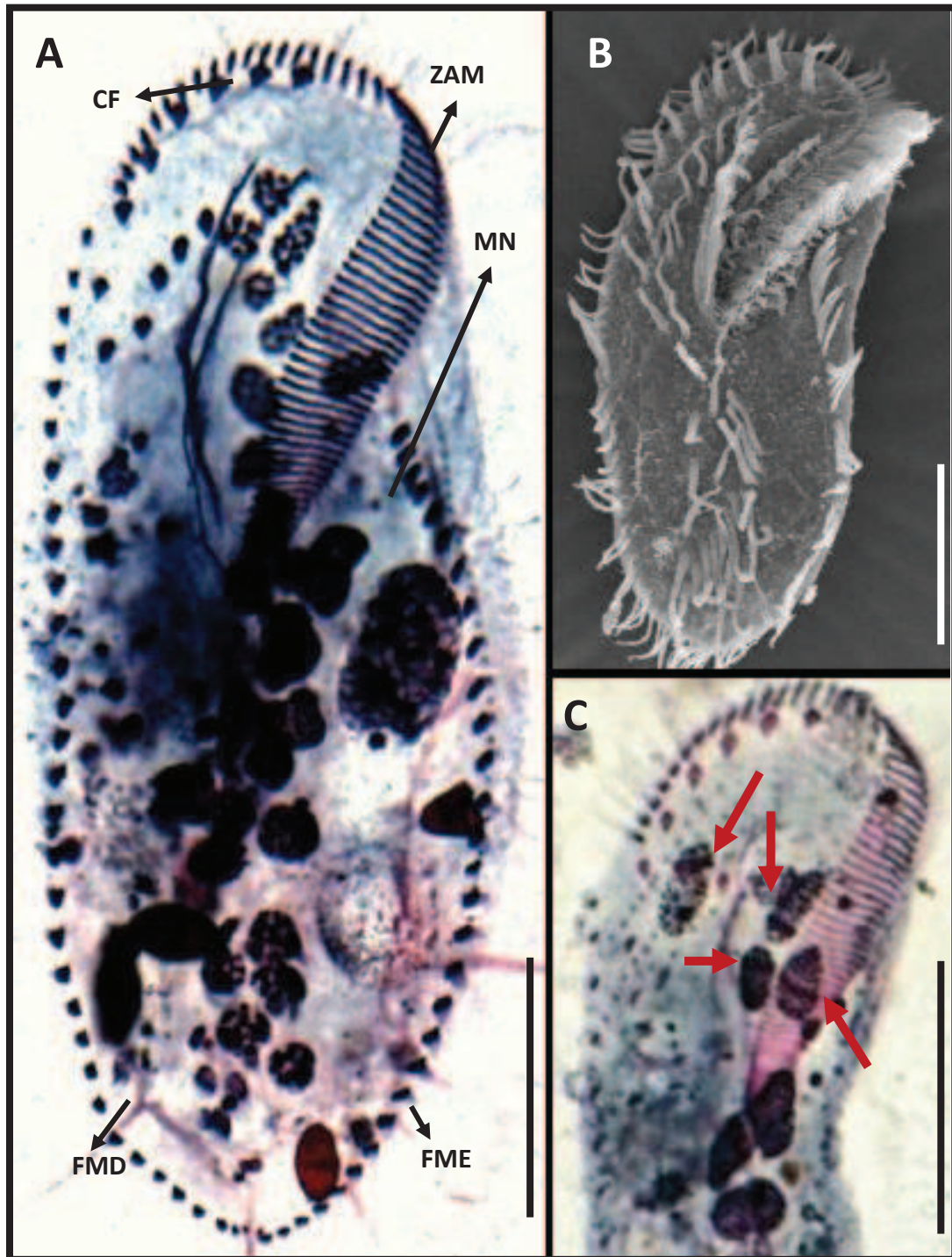
**Quadro 4:** Espécies de ciliados identificadas em amostras de líquens do campus da UFJF.

Filo Ciliophora Dolfein, 1901	Imagem
Subfilo Postciliodesmatophora, Gerassimova & Seravin, 1976	
Classe Heterotrichea Stein, 1859	
Ordem Heterotrichida Stein, 1859	
Família Blepharismidae Jankowski in Small & Lynn, 1985	
<i>Blepharisma sinuosum</i> Sawaya, 1940	Figura 4C
Subfilo Intramacronucleata Lynn, 1996	
Classe Spirotrichea Bütschli, 1889	
SubClasse Phacodiniidia Small & Lynn, 1985	
Ordem Phacodiniida Small & Lynn, 1985	
Família Phacodiniidae Corliss, 1979	
<i>Phacodinium metchnicoffi</i> Certes, 1897	Figura 2B
SubClasse Hypotrichia Stein, 1859	
Ordem Stichotrichida Fauré-Fremiet, 1961	
Família Oxytrichidae Ehrenberg, 1830	
<i>Cyrtohymena tetracirrata</i> (Gellért, 1942)	Figura 2C
<i>Pattersoniella vitiphila</i> Foissner, 1987	Figura 3
<i>Urosoma karinae</i> Foissner, 1987	Figura 5A
Ordem Urostylida Jankowski, 1979	
Família Hemicycliostylidae Jankowski, 1979	
<i>Hemicycliostyla</i> sp. n.	Figura 6
Família Urostylidae Butschli, 1889	
<i>Anteholosticha intermedia</i> (Dragesco, 1966)	Figura 2A
Classe Litostomatea Small & Lynn, 1981	
Ordem Haptorida Corliss, 1974	
Família Spathidiidae Kahl in Doflein & Reichenow, 1929	
<i>Epispathidium amphoriforme</i> (Greeff, 1888)	Figura 2D
Classe Colpodea Small & Lynn, 1981	
Ordem Colpodida de Puytorac et al., 1974	
Família Colpodidae Bory de St. Vincent, 1826	
<i>Colpoda cucullus</i> (Müller, 1773)	Figura 5B
<i>Colpoda inflata</i> (Stokes, 1884)	Figura 5C
Família Hausmanniellidae Foissner, 1987	
<i>Bresslauides discoideus</i> (Kahl, 1931)	Figura 4
Classe Oligohymenophorea de Puytorac et al., 1974	
SubClasse Peritrichia Stein, 1859	
Ordem Sessilida Kahl, 1933	
Família Vorticellidae Ehrenberg, 1838	
<i>Vorticella gracilis</i> Dujardim, 1841	Figura 5D



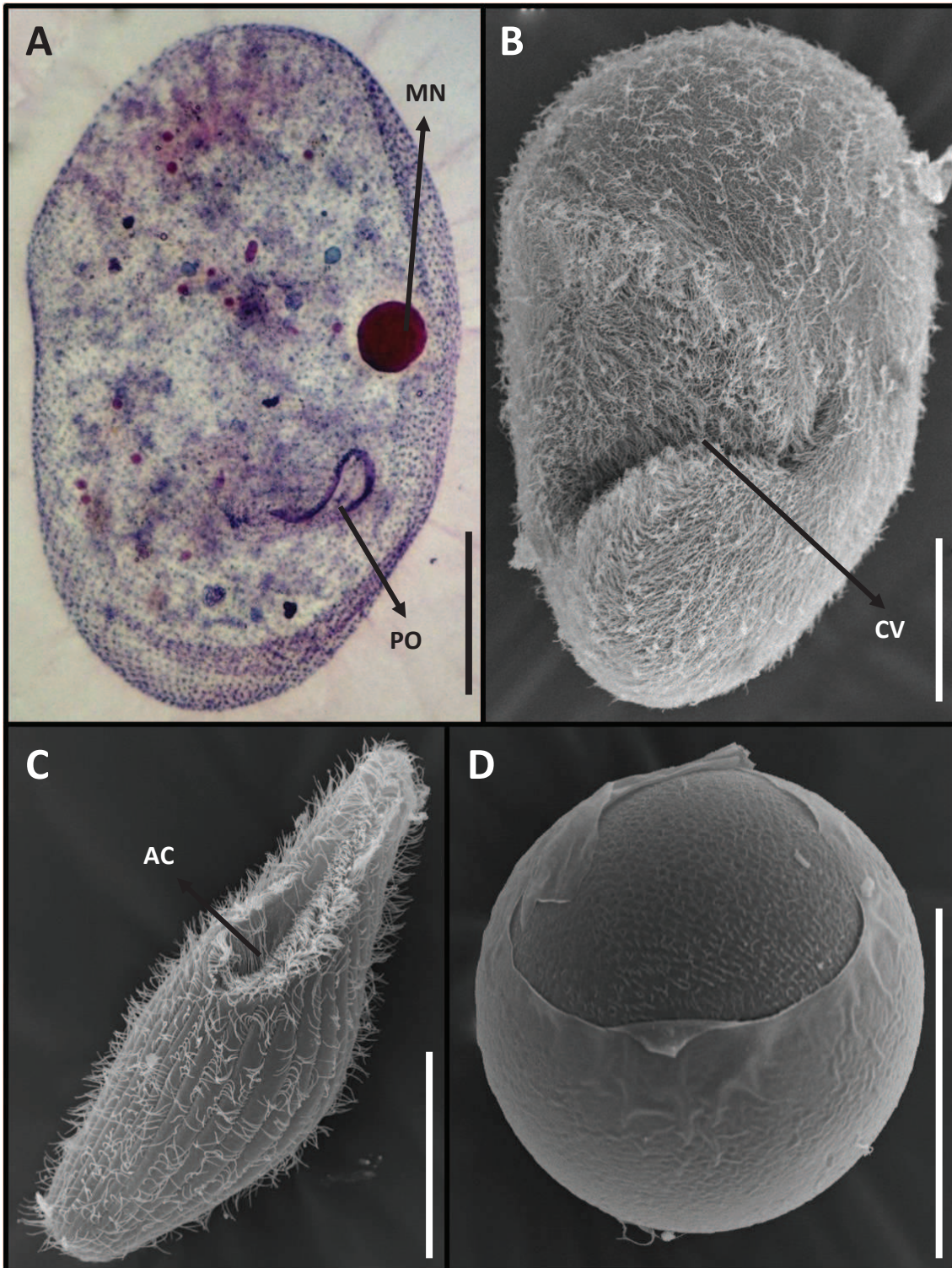


**Figura 2:** Espécimes impregnados pelo protargol. **A=** *Anteholosticha intermedia*; **B=** *Phacodinium metchnikoffi*; **C=** *Cyrtohymena tetracirrata*; **D=** *Epispathidium amphoriforme*. Barras indicam 50µm. CC= Curvatura das Cinécias, CT= Cirros Transversos, MN= Macronúcleo, MiN= Micronúcleo, ZAM= Zonda Adoral de Membranelas.

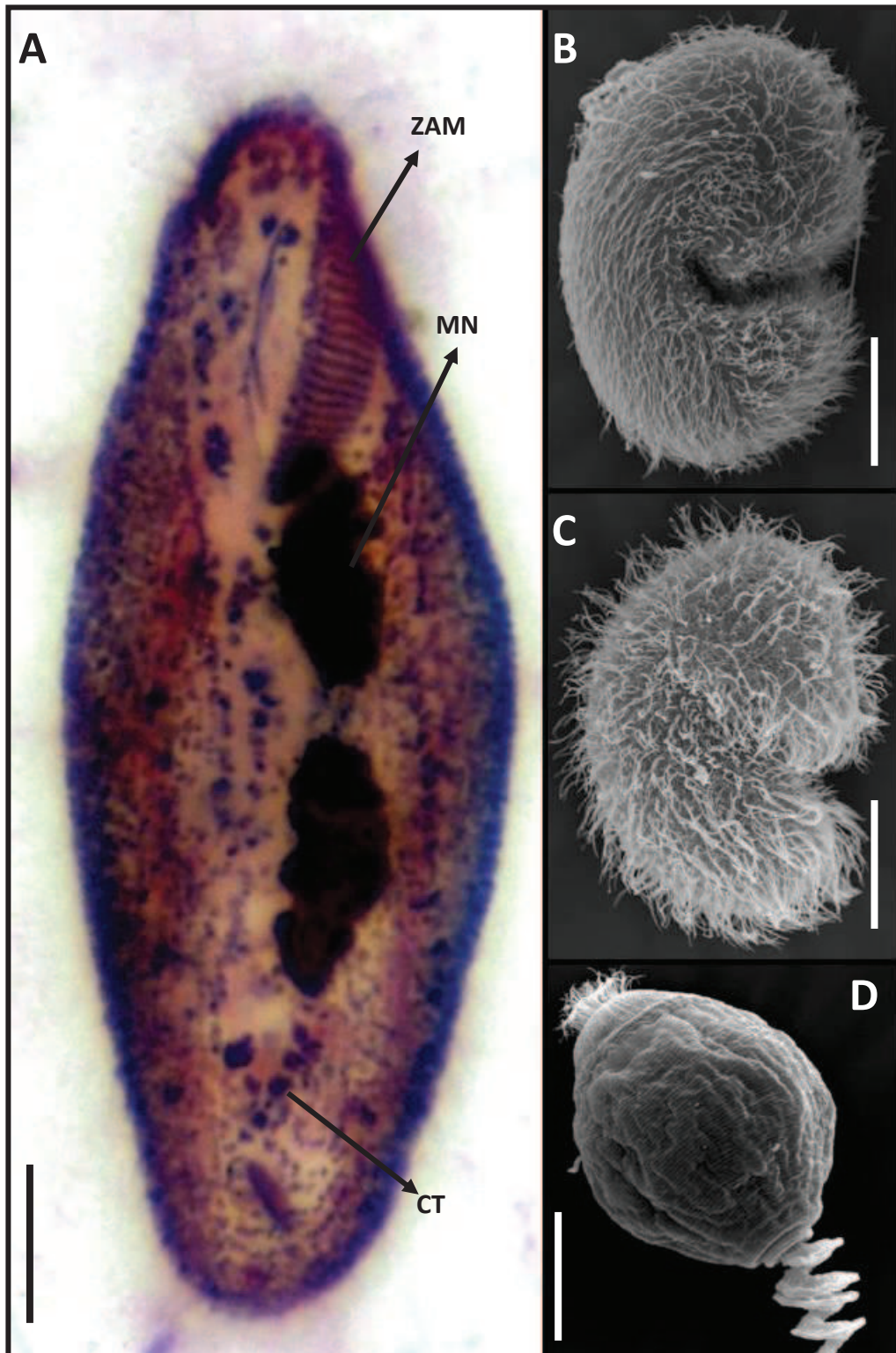


**Figura 3:** *Pattersoniella vitiphila* impregnada pelo protargol. A= Vista ventral; B= Micrografia eletrônica de varredura. C= Região ventral anterior destacada. Nódulos macronucleares com bandas de condensadamento em um processo preparatório para a fissão binária (setas vermelhas). Barras indicam 50 $\mu$ m. CF= Cirros Frontais, ZAM= Zona Adoral de Membranelas, FME= Fileira Marginal Esquerda, FMD fileira marginal direita.





**Figura 4:** *Bresslauides discoideus* A= Impregnado pelo protargol. B= Vista lateral em micrografia eletrônica de varredura. D= Espécime durante o processo de encistamento. C= *Blepharisma sinuosum* em micrografia eletrônica de varredura, vista ventral. Barras indicam 50 $\mu$ m. MN= Macronúcleo, PO= Policinécias Oraís, CV= Cavidade do Infundíbulo, AC= Abertura do Citóstoma.



**Figura 5:** A= *Urosoma karinae* impregnado pelo protargol. B= *Colpoda cucullus*, C= *Colpoda inflata* e D= *Vorticella gracilis* em micrografias eletrônicas de varredura. Barras indicam 10 $\mu$ m. ZAM= Zona Adoral de Membranelas, MN= Macronúcleo, CT= Cirros Transversos.



Foram registrados espécimes pós-morfogênese apresentando cirros transversos inconspícuos, conforme demonstrado em *H. sphagni* por PAIVA *et al.* (2012).

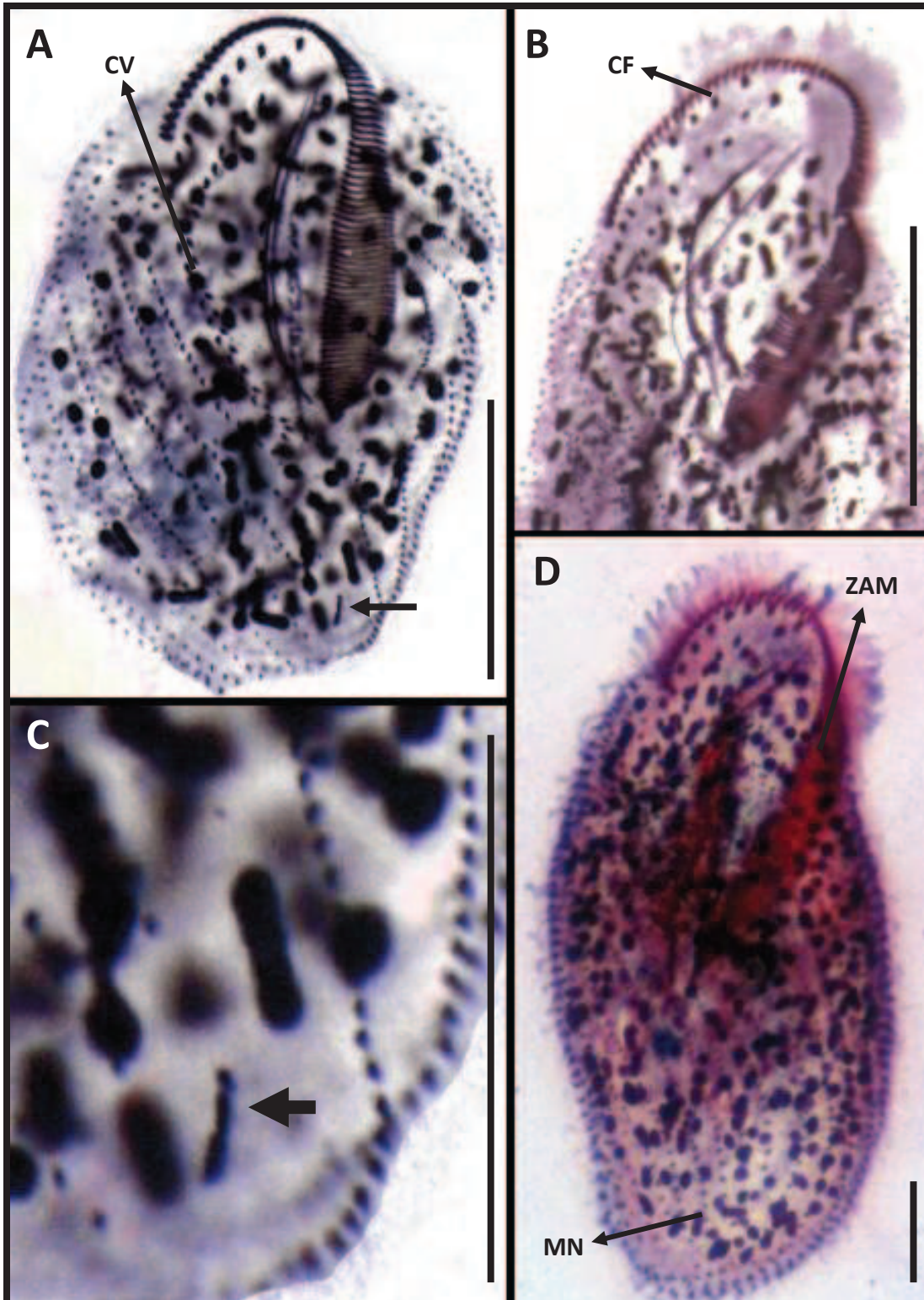
Grandes vacúolos alimentares são formados e visíveis no citoplasma, ocupando o segundo terço do organismo. Apresenta um vacúolo contrátil na região dorsal, em posição perpendicular à abertura do citóstoma.

*Hemicycliostyla* sp. nov. apresenta coloração variando de transparente a amarronzada, em observações *in vivo*. Trata-se de um dos maiores ciliados observados nos cultivos, competindo por recursos alimentares – ciliados menores, principalmente do gênero *Colpoda* – com *Pattersoniella vitiphila* Foissner, 1987. Em cerca de 50% dos cultivos elaborados, *Hemicycliostyla* sp. n. tornou-se a espécie troficamente dominante, persistindo em atividade mesmo diante do avançado estágio de decomposição dos líquens e da proliferação de bactérias, flagelados e ciliados colpodídeos. *Hemicycliostyla* sp. nov. desloca-se rapidamente no meio líquido, mas também é capaz de utilizar os cirros para locomover-se sobre substratos sólidos.

**Quadro 5:** Morfometria de *Hemicycliostyla* sp. nov.

	$\bar{x}$	M	SD	SE	CV	Min	Max	n
<b>Comprimento do corpo</b>	260,27	265,705	40,84	9,13	15,69	184,69	339,42	20
<b>Largura do corpo</b>	99,705	99,8	17,54	3,92	17,59	71,46	136,52	20
<b>Macronúcleo (n)</b>								20
<b>Macronúcleo (comp)</b>	6,4025	6,29	1,13	0,25	17,64	4,17	8,73	20
<b>Macronúcleo (larg.)</b>	3,857	3,81	0,57	0,12	14,77	2,74	5,36	20
<b>Micronúcleo (n)</b>	4,66	4,5	1,96	0,43	42,06	2	9	20
<b>ZAM (comp)</b>	99,413	99,615	12,72	2,84	12,79	79,82	129,59	20
<b>ZAM / Comprimento do corpo</b>	0,38	0,38	0,04	0,0089	10,56	0,3	0,48	20

**Legenda:**  $\bar{x}$ = média aritmética, M= mediana, SD= desvio padrão, SE= erro padrão, CV= coeficiente de variação, Min= mínimo, Max= máximo, n (coluna)= número de espécimes analisados, n (linha)= quantitativo, comp= comprimento, larg= largura. Valores medidos em micrômetros.



**Figura 6:** *Hemycycliostyla* sp. nov. impregnados pelo proteinato de prata. A= Espécime pós-morfogênese, apresentando as fileiras oblíquas de cirros marginais, a dupla fileira de cirros ventrais (CV) e cirros transversos inconspícuos, ampliados em C, indicados pelas setas. B= Região anterior destacada, com 20 cirros frontais (CF) e orais, compondo a bicorona. D= Vista ventral completa. Legenda: MN=Macronúcleo. Barras = 50 $\mu$ m.

## 2.4. DISCUSSÃO

### 2.4.1. Líquens: microecossistemas pouco explorados

Dos ciliados encontrados no presente trabalho, apenas os representantes da classe Colpodea já haviam sido registrados em associação com líquens. Entretanto, a maior parte das espécies encontradas são amplamente distribuídas pelo globo, tendo sido registradas em outros ambientes edáficos com salinidade, pH e disponibilidade hídrica extremos (BERGER, 1999; BEERGER, 2006 e FOISSNER, 1993). Esta condição caracteriza tais espécies como tolerantes às adversidades ambientais, algo confirmado pela capacidade de formação de cistos de resistência. Nesse sentido, os resultados apresentados neste capítulo podem ser interpretados como corroborativos à afirmação de FOISSNER (1986), que avaliou líquens como habitats inóspitos para ciliados.

Entretanto, líquens apresentam estrutura e dinâmica distintas dos solos. Como organismos vivos, líquens são capazes de responder ativamente às condições de estresse. Considerando-se a dessecação, por exemplo, estes organismos podem absorver vapores de água para dar início à atividade fotossintética de seus fotobiontes, resultando no aumento da concentração de carboidratos e oxigênio no tecido líquênico (LÓPEZ, 2006). Ainda segundo LÓPEZ (2006), muitos líquens podem sintetizar fenóis capazes de reduzir significativamente a penetração de radiação ultravioleta. Além disso, com a capacidade de reter partículas de matéria orgânica e minerais (LEGAZ *et al.*, 2006) e o enorme potencial de turgidez (MAZZITELLI *et al.*, 2006), os líquens potencialmente apresentariam atributos físico-químicos mais favoráveis para micro-organismos do que solos nus.

Considerando estas diferenças, a microbiota associada a líquens pode apresentar ciclos de atividade diferenciados, oscilando estágios de encistamento e trofismo de modo independente das populações encontradas no solo. Embora não seja possível reconhecer algum isolamento geográfico, nota-se que os dois ambientes (solo e líquens) apresentam pressões seletivas distintas.

Dessa forma, pode-se entender que a remoção de partículas de húmus presentes naturalmente nas amostras de líquens, conforme FOISSNER (1986) realizou, descaracteriza estes organismos de sua condição de micro-habitats. As interações entre líquen, substrato e ambiente devem ser observadas como um processo sinérgico, no qual a presença de ciliados denota avançada sucessão ecológica, com espécies de alto valor adaptativo.

#### 2.4.2 *Hemicycliostyla* sp. nov. e seus congêneres

O gênero *Hemicycliostyla* foi estabelecido por Stokes, em 1886, com a descrição de *H. sphagni* e *H. trichota*. Entretanto, foi em 1979 que JANKOWSKI fixou *H. sphagni* como espécie tipo, visto que Stokes não havia feito nenhuma indicação em seu trabalho. BERGER (2006) caracteriza o gênero como um urostiloidea dotado de uma zona adoral de membranelas contínua, com muitos cirros frontais formando uma bicorona, muitas fileiras de cirros somáticas e ausência de cirros transversos. Entretanto, PAIVA *et al.* (2012) demonstraram a ocorrência de cirros transversos inconspícuos em *Hemicycliostyla sphagni*.

No presente estudo, os espécimes encontrados em associação com líquens apresentam morfologia compatível com a caracterização do gênero proposta por BERGER (2006) e PAIVA *et al.* (2012), estando ausentes os cirros transversos nos espécimes em intérfase. Entretanto, foi observada uma variável de importância taxonômica que não encontrou congruência com as espécies já descritas (Quadro 6): As fileiras marginais de cirros encontram-se fortemente inclinadas, em posição oblíqua ao eixo longitudinal do organismo.

A redefinição do gênero *Hemicycliostyla* feita por PAIVA *et al.* (2012) caracteriza o táxon como pertencente a família Pseudourostylidae Jankowski, 1979; com um conspicuo arranjo de cirros frontais (bicorona); ausência de cirros transversos em formas interfásicas (característica que diferencia o gênero de *Pseudourostyla* Borrer, 1972); múltiplas fileiras de cirros marginais esquerdas e direitas, que se replicam de modo independente, sendo cada uma originada por um único primórdio parental (em *Pseudourostyla* as fileiras marginais se formam a partir de múltiplos primórdios). PAIVA *et al.*, entretanto, salientam que a presença ou ausência de cirros transversos pode variar entre populações.

BERGER (2006) apresenta 4 espécies válidas para o gênero: *Hemicycliostyla lacustris* Gállert & Tamás, 1958; *H. marina* Kahl, 1932; *H. sphagni* Stokes, 1886 e *H. concha* (Entz, 1884). Além dessas espécies, PAIVA *et al.* (2012) apresentaram *H. franzi* (Foissner, 1987), uma nova combinação para *Pseudourostyla franzy*, incluída no gênero *Hemicycliostyla* com base no padrão de replicação das fileiras de cirros marginais e na proximidade filogenética indicada pelo marcador 18S-rDNA.

*Hemicycliostyla marina* ocorre somente em regiões marinhas no norte do oceano Atlântico e nos mares árticos. *H. concha* é caracterizada por apresentar apenas dois nódulos macronucleares e pronunciada curvatura da porção anterior das membranas endoral e paroral. *H. franzi* apresenta cirros transversos durante a intérfase; *H. lacustris* foi registrada apenas em ambientes de água doce, apresenta comprimento médio de 200µm e cerca de 50 nódulos

macronucleares. Dessa forma, *Hemicycliostyla* sp. n. é morfologicamente e ecologicamente mais relacionada com *H. sphagni*, que, embora tenha maior tamanho (450µm x 120µm, em média), apresenta igualmente o número elevado (mais de 200) de nódulos macronucleares e teve sua ocorrência registrada em musgos próximos a reservatórios artificiais de água doce no norte do Brasil (BERGER, 2006; PAIVA *et al.*, 2012).

Entretanto, mesmo diante de tal similaridade, *Hemicycliostyla* sp. n. difere de seus congêneres por apresentar único padrão de distribuição das fileiras marginais de cirros, sendo estas acentuadamente inclinadas. Dessa forma, as fileiras direitas projetam-se em direção à região ventral, e a esquerda, à dorsal. O comprimento médio (260µm) e a ocorrência em associação com fungos liquenizados também são características diferenciadas, que sustentam a população encontrada neste estudo como pertencentes a uma espécie nova.

**Quadro 6:** Comparação de *Hemicycliostyla* sp. n. com as demais espécies do gênero:

	Nódulos macronucleares N	Marinha	Água doce	Terrestre	Comp. Médio	Posição das FM
<i>Hemicycliostyla sphagni</i>	200-400		x	x	470µm	Alinhadas
<i>Hemicycliostyla lacustris</i>	50		x		200µm	Alinhadas
<i>Hemicycliostyla concha</i>	2	x			170µm	Alinhadas
<i>Hemicycliostyla marina</i>	50-100	x			215µm	Alinhadas
<i>Hemicycliostyla franzi*</i>	200-400			x	250µm	Alinhadas
<i>Hemicycliostyla</i> sp. n.	200-400			x	260µm	Oblíqua

N= número; Comp= comprimento; FM= fileiras marginais de cirros. \*Apresenta cirros transversos durante a intérfase, característica plesiomórfica do gênero.

## CONCLUSÃO

Líquens são micro-habitats com significativa riqueza de espécies de ciliados. Os diversos fatores bióticos e abióticos que se somam à interação fungo, fotobionte e substrato resultam na formação de um ambiente especializado, no qual ocorrem populações de ciliados – predominantemente terrestres – resistentes às suas condições.

*Hemicycliostyla* sp. n. difere dos demais congêneres por apresentar fileiras de cirros marginais em posição oblíqua ao eixo longitudinal do organismo, pelo tamanho corporal e pela ocorrência em ambiente liquênico. Esta caracterização justifica e sustenta a proposição da espécie encontrada como um novo táxon.

Inventários detalhados da taxocenose de Ciliophora em líquens têm proporcionado a descrição de novas espécies (GÉLLERT, 1955; FOISSNER, 1986), como *Hemicycliostyla* sp.n., no presente estudo. Estas amostragens tornam-se relevantes ainda, por gerarem



informações que contribuem para o entendimento sobre o percentual de espécies endêmicas de ciliados, uma questão sobre biogeografia destes micro-organismos, para a qual ainda não há consenso.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGER, Helmut. **Monograph of the Oxytrichidae (Ciliophora, Hypotrichia)**. Salzburg, Áustria. Kluwer Academic Publishers, 1999, p. 1080.

BERGER, Helmut. **Monograph of the Urostyloidea (Ciliophora, Hypotrichia)**. Salzburg, Áustria. Springer, 2006, p. 1302.

FOISSNER, Wilhelm. Estimating the species richness of soil protozoa using the “non flooded Petri dish method”. **Protocols in protozoology**. Allen Press, 1992.

FOISSNER, Wilhelm. Wimpertiere (Protozoa: Ciliophora) in Flechten. **Biologiezentrum**, n. 26, p. 43-46, 1986.

GELLERT, József. Die Ciliaten des sich unter der Flechte *Parmelia saxatilis* Mass. gebildeten Humus. **Acta Biologica. Hungarian**. n. 6, p. 77-111, 1955.

LEGAZ, Maria; MILLANES, Ana & CÓRDOBA, Carlos. Fisiologia de Líquens. In: FILHO, Lauro X. **Biologia de Líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições LTDA, 2006. P. 99-143.

LÓPEZ, Blanca. Respostas dos Líquens a Fatores Ambientais. In: FILHO, Lauro X. **Biologia de Líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições LTDA, 2006. P. 75-98.

MARCELLI, Marcelo. Fungos Liquenizados. In: FILHO, Lauro X. **Biologia de Líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições LTDA, 2006. P. 21-74.

MAZZITELLI, Suzana. *et al.* Utilização de Líquens no Biomonitoramento da Qualidade do Ar. In: FILHO, Lauro X. **Biologia de Líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições LTDA, 2006. P. 99-143.

PAIVA, Thiago S. *et al.* Morphology and 18S rDNA phylogeny of *Hemicycliostyla sphagni* (Ciliophora, Hypotricha) from Brazil with redefinition of the genus *Hemicycliostyla*.

**International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 62, p. 229–241, 2012.

ROBERTS, Daniel & ZIMMER, Drew. Microfaunal communities associated with epiphytic lichens in Belfast. **Lichenologist**, n. 22, p. 163-171, 1990.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ocorrência de representantes do filo Ciliophora em micro-habitats especializados reflete a ampla distribuição geográfica deste táxon, que é tida como consequência de sua longa história evolutiva e dos diversos modos de vida apresentados por esses microeucariotos. Entretanto, mais do que o senso comum sobre a ecologia de micro-organismos, em ambientes como tanques de bromélias e líquens têm-se registrado espécies novas em proporções diretamente relacionadas ao número de amostragens realizadas. Em ressonância com essa afirmativa, a presente dissertação propõe um novo gênero de ciliado pertencente à família Tetrahymenidae, encontrado em fitotelmos, e *Hemicycliostyla* sp. n., encontrada associada a fungos liquenizados.

A presente dissertação, em sua primeira seção, demonstrou também que o marcador molecular citocromo oxidase sub-unidade I apresenta maior eficácia em análises filogenéticas envolvendo representantes da família Tetrahymenidae, em detrimento da baixa resolução do marcador 18S-rDNA em diferenciar gêneros e espécies pertencentes a essa família.

Além disso, pôde-se concluir com os resultados dessa dissertação, que inventários de ciliados são relevantes por gerar informações sobre a dispersão geográfica de certas espécies. O percentual de endemismo destes micro-organismos é algo indefinido, que só poderá ser adequadamente estimado com o maior conhecimento sobre a taxocenose de Ciliophora em diferentes biomas e micro-habitats existentes.

Observações sobre a estrutura e dinâmica dos meios explorados neste trabalho permitiram entender que as condições especializadas de cada um desses ambientes fornecem pressões seletivas distintas do meio ao redor. Isto fica evidente em fitotelmos, onde se pode perceber o forte isolamento geográfico das populações, com relação às demais comunidades de água doce. Em líquens, entretanto, nota-se que partículas de solo, podendo conter cistos de ciliados, são elementos componentes do micro-habitat estabelecido, representando populações imigrantes e entrada de matéria.

Entretanto, como adendo, salienta-se neste texto a dependência da taxonomia de ciliados de técnicas de impregnação pela prata cuja reprodutibilidade é contestável e invariavelmente proporcionam perda de espécimes de modo comprometedor para a produção científica. Dessa forma, torna-se de suma importância a busca por novos métodos ou aprimoração das técnicas de estudo morfológico, no intuito de se obter informações taxonômicas, reprodutibilidade eficaz e durabilidade para que os organismos processados possam ser armazenados como tipos nomenclaturais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

BOURLAND, Willian & STRÜDER-KYPKE, Michaela. *Agolohymena aspidocauda* nov. gen., nov. spec., a histophagous freshwater tetrahymenid ciliate in the family Deltopylidae (Ciliophora, Hymenostomatia) from Idaho (northwest U.S.A.): Morphology, ontogenesis and molecular phylogeny. **European Journal of Protistology**, n.46, p. 221-242, 2010.

DRUMMOND, Gustavo *et al.* **Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação**. 2ª edição, Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2005. P. 222.

DUNTHORN, Micah *et al.* Diversity and endemism of ciliates inhabiting Neotropical phytotelmata. **Systematics and Biodiversity**, iFirst, p. 1–11, 2012.

FENCHEL, Tom & FINLAY Bland J. The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. **BioScience**, n. 54, p. 777–784, ago. 2004.

FOISSNER, Wilhelm *et al.* Endemic ciliates (Protozoa, Ciliophora) from tank bromeliads (Bromeliaceae): a combined morphological, molecular, and ecological study. **European Journal of Protistology**, n. 39, p. 365–372, 2003.

FOISSNER, Wilhelm. Biogeography and Dispersal of Micro-organisms: A Review Emphasizing Protists. **Acta Protozoologica**, n. 45, p. 111-136, mar. 2006.

FOISSNER, Wilhelm. **Protists diversity and geographical distribution**. Springer. 1ªed. 2009. P. 213.

FOISSNER, Wilhelm. Wimpertiere (Protozoa: Ciliophora) in Flechten. **Biologiezentrum**, n. 26, p. 43-46, 1986.

HILLEBRAND, Helmut & AZOVSKY, Andrey I. Body size determines the strength of the latitudinal diversity gradient. **ECOGRAPHY**, n. 24, p. 251–256, ago. 2001.

HONDA, Neli. Técnicas Químicas Aplicadas à Taxonomia de Fungos Liquenizados. In: FILHO, Lauro X. **Biologia de Líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições LTDA, 2006. P. 389-400.

KATZ, Laura *et al.* Reframing the ‘Everything is everywhere’ debate: evidence for high gene flow and diversity in ciliate morphospecies. **Aquatic Microbiol Ecology**. n. 41, p. 55–65, 2005.

LUTHER, Hillebrand. **An alphabetical list of bromeliad binomials**. 11<sup>a</sup> edição. Sarasota: The Marie Selby Botanical Gardens, 2008.

LYNN, Denis H. **The Ciliated Protozoa**. 3<sup>a</sup> edição. Guelph, Canadá: Springer, 2008. 605p.

MARCELLI, Marcelo. Fungos Liquenizados. In: FILHO, Lauro X. **Biologia de Liquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições LTDA, 2006. P. 21-74.

MARTINELLI, Gustavo. Gefährdete Raritäten. Bromelien im atlantischen Regenwald. **Spektrum der Wissenschaft** n. 6, p. 66–73, 2000.

PAIVA, Thiago & SILVA-NETO, Inácio. *Deviata estevesi* sp. n. (Ciliophora: Spirotrichea), a new ciliate protist from a restinga lagoon in Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Protozoologica**, n. 44, p. 351 – 362, 2005.

PICADO, Carl. Les broméliacees épiphytes. Considérées comme milieu biologique. **Bull. scientist fr. Belgium**, n. 47, p. 215–360, 1913.

RAVEN, Peter; EVERT, Ray F. & Eichhorn, Susan, E. Fungos. In: **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A. 1996. Cap. XXII, p. 192-225.

SABAGH, Leandro *et al.* News records of phoresy and hyperphoresy among treefrogs, ostracods, and ciliates in bromeliad of Atlantic forest. **Biodiversity and Conservation**, n. 20, p. 1837–1841, 2011.

UTZ, Laura & COATS, Wayne. Spatial and Temporal Patterns in the Occurrence of Peritrich Ciliates as Epibionts on Calanoid Copepods in the Chesapeake Bay, USA. **Journal of Eukaryotical Microbiology**, n. 52, p. 236–244, 2005.

WILHELM, Foissner. An Updated Compilation of World Soil Ciliates (Protozoa, Ciliophora), with Ecological Notes, New Records, and Descriptions of new Species. **European Journal of Protistology**, n. 34, p. 195-235, 1998.



WILHELM, Foissner. Soil ciliates (Protozoa: Ciliophora) from evergreen rain forests of Australia, South America and Costa Rica: diversity and description of new species. **Biology and Fertility of the Soils** n. 25, p. 317–339, 1997.

WRIGHT, Andre-Denis G., & LYNN, Denis H. Maximum ages of ciliate lineages estimated using a small subunit rRna molecular clock: Crown eukaryotes date back to the Paleoproterozoic. **Archiv für Protistenkunde**, n. 148, p. 329–341, dez. 1997c.