

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA) -
COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL

SILAS JUNIOR MUNIZ COSTA

CILIADOS ENDÊMICOS (ALVEOLATA, CILIOPHORA) QUE HABITAM
FITOTELMATA EM BROMÉLIAS DO PARQUE ESTADUAL DO IBITIPOCA, MINAS
GERAIS, BRASIL: DIVERSIDADE, ESPECIFICIDADE E NOTAS SOBRE
CONSERVAÇÃO

JUIZ DE FORA

2019

SILAS JUNIOR MUNIZ COSTA

CILIADOS ENDÊMICOS (ALVEOLATA, CILIOPHORA) QUE HABITAM
FITOTELMATA EM BROMÉLIAS DO PARQUE ESTADUAL DO IBITIPOCA, MINAS
GERAIS, BRASIL: DIVERSIDADE, ESPECIFICIDADE E NOTAS SOBRE
CONSERVAÇÃO

ENDEMIC CILIATES (ALVEOLATA, CILIOPHORA) THAT INHABITING
PHYTOTELMATA IN BROMÉLIAS OF THE IBITIPOCA STATE PARK, MINAS
GERAIS, BRAZIL: DIVERSITY, SPECIFICITY AND NOTES ON CONSERVATION

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

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Xavier Senra
Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias

JUIZ DE FORA

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Costa, Silas Junior Muniz.

Ciliados endêmicos (Alveolata, Ciliophora) que habitam fitotelmata em bromélias do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil : diversidade, especificidade e notas sobre conservação / Silas Junior Muniz Costa. -- 2019.

67 p.

Orientador: Marcus Vinicius Xavier Senra

Coorientador: Roberto Júnio Pedroso Dias

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2019.

1. Ciliados. 2. Fitotelmos. 3. Lambornella. 4. Campo Rupestre. 5. Nanofloresta Nebular. I. Senra, Marcus Vinicius Xavier, orient. II. Dias, Roberto Júnio Pedroso, coorient. III. Título.

Silas Junior Muniz Costa

**CILIADOS ENDÊMICOS (ALVEOLATA, CILIOPHORA) QUE HABITAM
FITOTELMATA EM BROMÉLIAS DO PARQUE ESTADUAL DO IBITIPOCA,
MINAS GERAIS, BRASIL: DIVERSIDADE, ESPECIFICIDADE E NOTAS SOBRE
CONSERVAÇÃO**

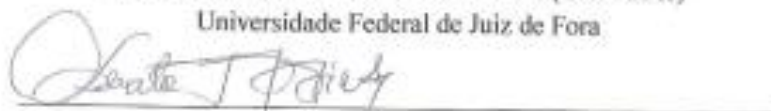
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) – Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 28 de fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Marcus Vinicius Xavier Senra (Orientador)

Universidade Federal de Juiz de Fora



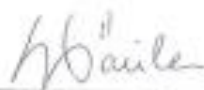
Prof. Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias (Coorientador)

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dra. Isabel Cristina Vidal Siqueira de Castro

Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais - Campus Barbacena



Prof. Dra. Stéfane D'ávila

Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre estar comigo e ser a base da minha vida e do meu caráter. “O Senhor é o meu pastor: nada me faltará” Sl 30.1

Agradeço aos meus pais, Silas Otaviano Costa e Ana Luiza Muniz Costa, pelo seu amor, cuidado, confiança e por todos os seus ensinamentos que me levaram até este momento!

Agradeço aos professores Roberto Dias e Marcus Senra pela orientação, amizade, inspiração e por serem exemplos de profissionais.

Agradeço aos Doutorandos Vitor Halfeld, Franciane Cedrola, Roberto Marchesini e Jéssica Andrade por me ajudarem e por tudo que em ensinaram durante essa etapa.

Agradeço a toda a equipe do laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora por serem exemplos na minha vida, por me ajudarem imensamente e por me receberem nessa família maravilhosa.

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

Agradeço a Professora Ana Paula Gelli Faria e a doutoranda Aline Mystica pelo auxílio na identificação das espécies de bromélias, por toda ajuda durante as coletas e por sua amizade.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) – Comportamento e Biologia Animal por todos os ensinamentos e por tudo que aprendi durante esses dois anos.

Agradeço aos meus colegas da turma de mestrado 2017 – 2019 pela companhia, amizade e por todos os momentos felizes que passamos juntos durante o mestrado.

Agradeço a Marlú e a Dayane por tudo o que fizeram por mim. Vocês são exemplos de dedicação, profissionalismo e competência.

Registro aqui um agradecimento especial para Karine Afonso Florenzano, pelo seu amor, companheirismo, apoio e por nunca me deixar desistir.

RESUMO – O Parque Estadual do Ibitipoca é uma área importante para a conservação da biodiversidade. Embora estudos sobre a fauna e flora já tenham sido realizados na região, pouco se sabe sobre as espécies de protozoários ciliados encontradas no parque. Nosso estudo teve como objetivos principais inventariar a ciliatofauna presente em tanques de bromélias no Parque Estadual do Ibitipoca; ampliar o número de sequências de ciliados endêmicas de ambientes fitotelmais e investigar as relações de especificidades entre ciliados e bromélias presentes na área estudada. Os tanques de bromélias tem a capacidade de armazenar água da chuva e matéria orgânica proveniente da queda de detritos, formando microambientes conhecidos como fitotelmos. A microbiota que habita os tanques de bromélias é formada por algas, fungos, bactérias, flagelados, ciliados, microinvertebrados, entre outros microrganismos. Os ciliados são considerados componentes importantes dos ambientes fitotelmais devido a suas diversas funções dentro desse ambiente: predação, controle de populações bacterianas, ciclagem de nutrientes e transferência de energia entre os níveis tróficos. Devido a essa importância, eles se tornaram alvo do nosso estudo. As coletas ocorreram durante a estação chuvosa entre outubro de 2017 e abril de 2018, onde foram coletadas 261 amostras do conteúdo fitotelmal presente no tanque de 15 espécies de bromélias. As amostras foram observadas com auxílio de microscopia óptica e foram observados 11 táxons de ciliados. Quatro novas sequências de ciliados endêmicos de tanques de bromélias foram obtidos utilizando o marcador molecular 18S-rDNA. Dentre os ciliados observados, destacamos a presença de três morfotipos do gênero *Lambornella*. Análises filogenéticas feitas a partir de sequências do gene Citocromo Oxidase mostraram uma acentuada divergência entre os três morfotipos, podendo indicar a presença de espécies novas. De acordo com a ocorrência e distribuição dos ciliados foi possível verificar que não há especificidade entre ciliados e bromélias que ocorrem no Parque Estadual do Ibitipoca. Diante dos dados obtidos, destacamos a necessidade de aumentar o esforço amostral em ecossistemas neotropicais para melhor entendimento da diversidade de ciliados.

Palavras-chaves: Endemismo, Bromélias, Ciliophora, *Lambornella*, 18S rDNA, COI, Floresta Atlântica.

ABSTRACT - The Ibitipoca State Park is an important area for the conservation of biodiversity. Although studies on fauna and flora have already been carried out in the region, little is known about the ciliates species found in the park. This study had as main goals to inventory the ciliate fauna that are present in bromeliad tanks in the Ibitipoca State Park; to amplify the number of sequences from endemic ciliate from the phytotelmic environment, and to investigate the specificities relationships between ciliate and bromeliad present in the studied area. Bromeliad tanks have the capacity of storing rainwater and organic matter from falling debris, forming microenvironments known as phytotelma. The microbiota that lives in bromeliad tanks is constituted by algae, fungi, bacteria, flagellated, ciliates, microinvertebrates, among other microorganisms. Ciliates are considered as essential components of the phytotelma due to their many functions inside this environment: predation, bacterial population controls, nutrient cycling and energy transference between the trophic levels in the phytotelma. Due to this importance, they are the target of our study. The field excursions occurred during the rainy season between October 2017 and April 2018, where it was collected 261 samples of phytotelmic content present in the tank of 15 bromeliad species. The samples were analyzed with the aid of optical microscopy, and it was observed 11 ciliate taxa. Four new sequences of endemic ciliates from bromeliad tanks were obtained using the molecular marker 18S-rDNA. Among the observed ciliate, we highlight the presence of three morphotypes of the *Lambornella* genus. The phylogenetic analysis made from the Cytochrome Oxidase gene sequences showed a sharp divergence between the three morphotypes, may indicate the presence of new species. According to the ciliate occurrence and distribution, it was possible to notice that it does not occur specificity between ciliate and bromeliad that live in the Ibitipoca State Park. In the face of the obtained data, we highlight the need to increase the sampling effort in neotropical ecosystems to have a better understanding of the ciliate diversity.

Keywords: Endemism, Bromeliad, Ciliophora, *Lambornella*, 18S rDNA, COI, Atlantic Forest

RESUMO ACESSÍVEL: Os ciliados são seres vivos formados por uma única célula (unicelulares), que não produzem seu próprio alimento (heterotróficos) e que possuem um conjunto de cílios recobrimdo todo o seu corpo. Os ciliados podem viver em ambientes aquáticos (mares, rios, lagoas, lagos, poças d'água), terrestres, em musgos, líquens e outros tipos de ambientes. Esses microrganismos também podem viver na água presente em tanques de bromélias. As folhas das bromélias formam tanques que são capazes de armazenar água da chuva e matéria orgânica (pedaços de folhas, flores e galhos ou partes de frutas e animais que possam cair dentro tanques de bromélias) onde vários seres vivos, inclusive os ciliados, podem ser encontrados. Os objetivos do nosso trabalho foram identificar as espécies de ciliados que ocorrem em tanques de bromélias no Parque Estadual do Ibitipoca e descobrir se a mesma espécie de ciliado pode viver em diferentes espécies de bromélia. Durante nosso estudo, coletamos a água e lama presente no tanque de 261 bromélias e foram observados 11 espécies de ciliados. A maioria das espécies de ciliados foi observada habitando mais de uma espécie de bromélia. Além disso, dentre as espécies de ciliados que foram encontradas, algumas delas podem ser espécies novas que ainda não tinham sido estudadas. Destacamos então, que novos estudos são necessários para podermos conhecer mais sobre os ciliados e como eles se relacionam com os outros seres vivos.

Palavras-chaves: Endemismo, Bromélias, Ciliados, Floresta Atlântica.

LISTA DE FIGURAS

Introdução geral

- Figura 1 Fitofisionomias de Campos Rupestres e Nanoflorestas Nebulares presentes no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil.....15
- Figura 2 Representatividade das classes do filo Ciliophora em relação ao número de espécies de ciliados que ocorrem em tanques de bromélias.....24

Seção I

- Figura 1 Ocorrência e distribuição de ciliados em tanques de bromélias do Parque Estadual do Ibitipoca.....30
- Figura 2 Espécies de bromélias do Parque Estadual do Ibitipoca utilizadas neste estudo.....32
- Figura 3 Ciliados encontrados em tanques de bromélias do Parque Estadual de Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil.....37
- Figura 4 Rede de interação entre espécies de ciliados e bromélias do Parque estadual de Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil.....41
- Figura 5 Árvore filogenética contendo espécies de ciliado (filo Ciliophora) que habitam tanques de bromélias.....42
- Figura 6 Árvore filogenética da ordem Hymenostomatida (classe Oligohymenophorea) mostrando o agrupamento da sequência de *Bromeliophrya* sp. dentro da família Bromeliophryidae.....43
- Figura 7 Árvore filogenética da subclasse Peritrichia.....44
- Figura 8 Árvore filogenética da classe Oligohymenophorea contendo as sequências dos três morfotipos do gênero *Lambornella*.....45

LISTA DE TABELAS

Introdução geral

Tabela 1	Ciliados encontrados em tanques de bromélias.....	20
----------	---	----

Seção I

Tabela 1	Primers utilizados nas reações de PCR e de sequenciamento.....	34
Tabela 2	Distribuição de ciliados encontrados em tanques de bromélias do Parque Estadual do Ibitipoca.....	38
Tabela 3	Distribuição de ciliados nas espécies de bromélias e pontos de coleta no Parque Estadual do Ibitipoca.....	39

Anexo 1

Tabela 1	Tabela de divergência entre a sequência de <i>Bromeliophrya</i> sp. e representantes da família Bromeliophryidae.....	61
Tabela 2	Tabela de divergência entre <i>Lagenophrys</i> sp. e <i>Usconophrys</i> sp.....	61
Tabela 3	Tabela de divergência entre <i>Orbopercularia</i> sp. e outros ciliados da subclasse Peritrichia.....	61
Tabela 4	Tabela de divergência entre <i>Pseudovorticella bromelicola</i> e outros ciliados da subclasse Peritrichia.....	62

SUMÁRIO

Introdução geral.....	13
Revisão de Literatura.....	16
1. Classificação dos ciliados.....	16
2. Ciliados que habitam fitotelmos em tanques de bromélias.....	19
2.1. Endemismo.....	24
2.2. Especificidade.....	25
2.3. Dispersão.....	26
Seção I	
1. Introdução.....	27
1.1. Objetivos.....	29
2. Material e Métodos.....	29
2.1. Área de estudo e coleta das amostras.....	29
2.2. Cultivos.....	31
2.3. Técnicas de impregnação pela prata.....	33
2.4. Estudos moleculares.....	33
2.4.1. Inventário.....	34
2.4.2 <i>Glaucomides</i> sp. e os ciliados peritrícheos.....	35
2.4.3 Morfotipos de <i>Lambornella</i>	35
2.5. Especificidade ciliados/bromélias.....	36
3. Resultados.....	36
3.1. Distribuição e ocorrência de ciliados bromelícolas.....	36
3.2. Especificidade entre ciliados X bromélias.....	40
3.3. Caracterização molecular e posição filogenética.....	41
3.3.1. Inventário de ciliados em fitotelmos.....	41
3.3.2. <i>Glaucomides</i> sp. e sua posição filogenética.....	42

3.3.3. Ciliados peritríqueos.....	43
3.3.4. Morfotipos de <i>Lambornella</i>	45
4. Discussão.....	46
4.1. Diversidade de ciliados bromelícolas.....	46
4.2. Filogenia dos morfotipos de <i>Lambornella</i>	48
4.2. Especificidade em fitotelmos.....	49
4.3. Ciliados bromelícolas e a conservação.....	50
5. Conclusão.....	51
6. Referências Bibliográficas.....	52
Considerações Finais.....	58
Referências Bibliográficas.....	59
Anexo 1.....	61
Anexo 2.....	63
Anexo 3.....	65
Anexo 4.....	66

INTRODUÇÃO GERAL

Estudos sobre a classificação dos organismos eucariotos mostram a presença de um clado denominado Alveolata (BALDAUF, 2008; ADL *et al.*, 2012). O clado Alveolata é um táxon monofilético que engloba os filos Ciliophora, Apicomplexa, Dinoflagellata e vários flagelados relacionados com a base do filo Apicomplexa, tendo por sinapomorfia a presença de um sistema alveolar constituído por sáculos membranosos dispostos abaixo da membrana plasmática, além de análises filogenéticas baseados no gene 18S-rDNA que suportam a monofilia do grupo (PAWLOWSKI, 2013).

O filo Ciliophora Doflein, 1901 é formado por organismos eucariotos, heterótrofos e unicelulares denominados ciliados. Este grupo apresenta três sinapomorfias bem marcantes: corpo recoberto por cílios derivados de cinetossomos associados a estruturas fibrilares, presença de macronúcleo e micronúcleo (dimorfismo nuclear) e reprodução sexuada pelo processo de conjugação (ADL *et al.*, 2012). A origem desses microeucariotos ciliados ainda não é bem conhecida. Especialistas acreditam que os ciliados surgiram por volta de dois bilhões de anos atrás, durante o Éon Proterozóico (WRIGHT & LYNN, 1997). Entretanto, os fósseis mais antigos já encontrados são de ciliados tintinnídeos datados de 400 – 450 milhões de anos atrás, no período Ordoviciano, Era Paleozoica. Os ciliados foram observados pela primeira vez por Leeuwenhoek em 1674 e desde então, têm sido observados nos mais diversos ambientes tais como os marinhos, os dulciaquícolas e os terrestres (SLEIGH, 1988).

Os ciliados são frequentemente observados em ambientes pouco explorados como tanques de bromélias e líquens (HALFELD, 2014). Das mais de 12.000 espécies de ciliados já descritas, cerca de 160 já foram observadas habitando os tanques de bromélias e outros ambientes fitotelmais. Estudos de inventário têm ajudado na compreensão sobre a diversidade dos ciliados que habitam tanques de bromélias (DUNTHORN *et al.*, 2012; DÚRAN-RAMÍREZ *et al.*, 2015), mostrando que a medida que novos estudos são realizados, novos táxons vão sendo descobertos e descritos. Um exemplo disso foi o trabalho realizado por Foissner *et al.* (2003) que coletaram amostras do conteúdo fitotelmal de tanques de bromélias de países da América Central da América do Sul e encontraram novas espécies de ciliados. Sendo que esse estudo de inventário taxonômico serviu de base para outros trabalhos que descreveram espécies como *Lambornella trichoglossa* Foissner, 2003, *Bromelioprya brasiliensis* Foissner, 2003, entre outras. Tal fato ressalta a necessidade de novos estudos de

inventário da fauna de ciliados que habitam tanques de bromélias, que ainda constituem um ambiente pouco explorado.

Ecólogos estão tentando descobrir quais são os filtros ambientais que influenciam a estrutura e composição da comunidade microbiana presente e tanques de bromélias. Até o presente, os principais fatores apontados como moduladores das condições físico-químicas desses microambientes são o volume de água presente nos tanques (BUOSI *et al.*, 2015; DUARTE *et al.*, 2013), a temperatura da água dos tanques (KRATINA *et al.*, 2017) e a cobertura do dossel onde as bromélias estão presentes (BUSSE *et al.*, 2018). Diante da condição dinâmica apresentada pelos fitotelmos, esses microambientes são considerados extremamente complexos exercendo grandes pressões seletivas sobre as espécies ali presentes, devido à alta competição por recursos (KITCHING, 2001). Estes ambientes, após prolongada estiagem, acabam muitas vezes por secar, de modo que, apenas as espécies de ciliados capazes de encistar estão aptas a se manter permanentemente no sistema (FOISSNER *et al.*, 2003).

Apesar dos avanços realizados nas últimas décadas, o conhecimento sobre a diversidade de ciliados que habitam tanques de bromélias ainda permanece fragmentado e incompleto. Questões como a colonização dos ambientes fitotelmais pelos ciliados, processos de especiação, dispersão, endemismo e especificidade ainda não são bem compreendidos.

Diante desse cenário, o presente estudo realizado no Parque Estadual do Ibitipoca se mostra como uma boa oportunidade para responder algumas dessas questões, pois se trata de uma área que apresenta relevo com gradiente altitudinal elevado (entre 1100 m e 1784 m), que pode constituir uma barreira natural que afeta a dispersão dos ciliados, além de proporcionar o isolamento geográfico, que influencia processos de especiação e o endemismo de ciliados em tanques de bromélias. Outro fator importante é o mosaico de fitofisionomias constituído por Campos Rupestres, Nanoflorestas Nebulares e Florestas Nebulares que proporcionam diferentes habitats para nosso estudo.

Os Campos Rupestres (Figura 1a, b) são um tipo de vegetação savânica composta principalmente por plantas herbáceas, podendo apresentar áreas de adensamento com arbustos e pequenas árvores (Vasconcelos, 2011). Já as Nanoflorestas Nebulares (Figura 1c) são formações florestais frequentemente envolvidas por neblina e nuvens formando um ambiente úmido e com condições para o estabelecimento de diversas espécies de plantas (Bruijnzeel et

al. 2011), dentre elas, espécies da família Bromeliaceae (Forzza et al. 2013; Moreira et al. 2018).



Figura 1. Fitofisionomias de Campos Rupestres e Nanoflorestas Nebulares presentes no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil.

Outro fator importante é a ocorrência de 32 espécies de bromélias numa área de apenas 1,488 hectares (FORZZA *et al.*, 2013), que possibilita a coleta de amostras do conteúdo fitotelmal em bromélias com morfologias diferentes e que ocorrem em áreas com vegetações diferentes. Sendo assim, a presente proposta consta de um inventário das espécies de protozoários ciliados encontradas em tanques de bromélias do Parque Estadual de Ibitipoca, com a caracterização morfológica e molecular das espécies de ciliados; estudo sobre as relações de especificidade entre ciliados e bromélias; além de uma discussão sobre a possibilidade de utilizar os ciliados endêmicos de bromélias em programas de conservação e também abrange as relações de especificidade entre ciliados e bromélias.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Classificação dos Ciliados

A classificação taxonômica do Filo Ciliophora tem se modificado ao longo do tempo de acordo com o aprimoramento das ferramentas de identificação e pelo surgimento de novas tecnologias. Inicialmente a taxonomia do grupo era pautada exclusivamente em caracteres morfológicos baseadas na ciliatura oral e somática, mas os avanços na área da biologia molecular fizeram com que as abordagens genéticas se tornassem cada vez mais populares e utilizadas na classificação dos ciliados (LYNN, 2008, ADL *et al.*, 2012).

Podemos vislumbrar essa mudança temporal na taxonomia do Filo Ciliophora através de alguns estudos que apresentaram propostas de classificação. Lynn (2008) propôs que o filo Ciliophora era constituído por 11 classes organizadas em dois subfilos da seguinte forma: O subfilo Postciliodesmatophora Lynn, 1996 reúne as classes Karyorelictea e Heterotrichea, enquanto que o subfilo Intramacronucleata Lynn, 1996 reúne as classes Spirotrichea, Amorphorea, Litostomatea, Phyllopharyngea, Nassophorea, Colpodea, Prostomatea, Plagiopylea e Oligohymenophorea. No entanto, estudos recentes baseados em dados moleculares mostram modificações nesse padrão de classificação. Gao *et al.* (2016) propõem a classe Cariacotrichea e relata a existência das classes Protocruzia (ORSI *et al.*, 2012) e Mesodiniea (CHEN *et al.*, 2015). Num estudo mais atual, Fernandes *et al.* (2018) apresentam a classe Odontostomatea, considerando ao todo, 15 classes pertencentes ao filo Ciliophora. Em nosso estudo, seguimos a classificação proposta por Gao *et al.* (2016) descrita a seguir.

Filo **CILIPHORA** Doflein, 1901

Subfilo **POSTCILIODESMATOPHORA** Gerassimova e Seravin, 1976

Classe **KARYORELICTEA** Corliss, 1974

Ordem Loxodida Jankowski, 1980

Ordem Protoheterotrichida Nouzarede, 1977

Ordem Protostomatida Small & Lynn, 1985

Classe **HETEROTRICHEA** Stein, 1859

Ordem Heterotrichida Stein, 1859

Classe **MESODINIEA** Chen *et al.*, 2015
 Ordem Mesodiniida Stein, 1859

Subfilo **INTRAMACRONUCLEATA** Lynn, 1996

Classe **SPIROTRICHEA** Butschli, 1889

Subclasse Phacodiniida Small e Lynn, 1985

Ordem Phacodiniida Small e Lynn, 1985

Subclasse Licnophoria Lynn, 2003

Ordem Licnophorida Corliss, 1957

Sub-classe Choreotrichia Small e Lynn, 1985

Ordem Choreotrichida Small e Lynn, 1985

Ordem Tintinnida Kofoid e Campbell, 1929

Subclasse Oligotrichia Butschli, 1887

Ordem Lynnellida Liu *et al.* 2015

Ordem Strombidiida Jankowski, 1980

Subclasse Protohypotrichia Li *et al.*, 2009

Ordem Kiiitrichida Tuffrau e Fleury, 1994

Subclasse Hypotrichia Stein, 1859

Ordem Stichotrichida Faure-Fremiet, 1961

Ordem Sporadotrichida Faure-Fremiet, 1961

Ordem Urostylida Jankowski, 1979

Subclasse Euplotia Adl *et al.*, 2012

Ordem Euplotida Jankowski, 1980

Ordem Discocephalida Miao *et al.* 2011

Classe **ARMOPHOREA** Lynn, 2002

Ordem Armophorida Jankowski, 1964

Ordem Clevelandellida de Puytorac e Grain, 1976

Classe **LITOSTOMATEA** Small e Lynn, 1981

Subclasse Haptoria Corliss, 1974

Ordem Haptorida Corliss, 1974

Ordem Pleurostomatida Schewiakoff, 1896

Subclasse Rhynchostomatia Vd'ačný *et al.*, 2011

Ordem Dileptida Vd'ačný *et al.*, 2011

Ordem Tracheliida Vd'ačný *et al.*, 2011

Subclasse Trichostomatia Butschli, 1889

Ordem Vestibuliferida de Puytorac *et al.*, 1974

Ordem Entodiniomorphida Reichenow Doflein e Reichenow, 1929

Ordem Macropodiniida Lynn, 2008

Classe **PHYLLOPHARYNGEA** de Puytorac *et al.*, 1974

Subclasse Suctoria Claparede e Lachmann, 1859

Ordem Exogenida Collin, 1912

Ordem Endogenida Collin, 1912

Ordem Evaginogenida Jankowski, 1978

Subclasse Rhynchodia Chatton e Lwoff, 1939

Ordem Rhynchodida Chatton e Lwoff, 1939

Ordem Hypocomatida Deroux, 1976

Subclasse Chonotrichia Wallengren, 1895

Ordem Cryptogemmida Jankowski, 1978

Ordem Exogemmida Jankowski, 1972

Subclasse Cyrtophoria Fauré-Fremiet in Corliss, 1956

Ordem Chlamydodontida Deroux, 1976

Ordem Dysteriida Deroux, 1976

Subclasse Synhymenia Puytorac et al. in Deroux, 1978

Ordem Synhymeniida Jankowski, 1973

Classe **NASSOPHOREA** Small e Lynn, 1981

Ordem Nassulida Jankowski, 1968

Ordem Colpodidiida Foissner, Agatha e Berger, 2002

Ordem Microthoracida Jankowski, 1967

Ordem Discotrichida Fan *et al.*, 2014

Classe **COLPODEA** Small e Lynn, 1981

Ordem Colpodida de Puytorac et al., 1974

Ordem Cyrtolophosidida Foissner, 1978

Ordem Bursariomorphida Fernandez-Galiano, 1978

Ordem Platyophryida Puytorac et al. 1979

Classe **PROSTOMATEA** Small e Lynn, 1985

Ordem Prostomatida Schewiakoff, 1896

Ordem Prorodontida Corliss, 1974

Classe **PLAGIOPYLEA** Small & Lynn, 1985

Ordem Plagiopylida Jankowski, 1978

Ordem Odontostomatida Sawava, 1940

Ordem Cyclotrichiida Jankowski, 1980

Classe **OLIGOHYMENOPHOREA** de Puytorac et al., 1974

Subclasse Peniculia Faure-Fremiet in Corliss, 1956

Ordem Peniculida Faure-Fremiet in Corliss, 1956

Ordem Urocentrida Jankowski, 1980

Ordem Paranassulida Deroux in de Puytorac et al. (1993)

Subclasse Peritrichia Stein, 1859

Ordem Sessilida Kahl, 1933

Ordem Mobilida Kahl, 1933
 Subclasse Hymenostomatia Delage e Herouard, 1896
 Ordem Ophryoglenida Canella, 1964
 Ordem Tetrahymenida Faure-Fremiet in Corliss, 1956
 Subclasse Astomatia Schewiakoff, 1896
 Ordem Astomatida Schewiakoff, 1896
 Subclasse Apostomatia Chatton e Lwoff, 1928
 Ordem Apostomatida Chatton & Lwoff, 1928
 Ordem Pilisuctorida Jankowski, 1966
 Ordem Astomatophorida Jankowski, 1966
 Subclasse Scuticociliatia Small, 1967
 Ordem Philasterida Small, 1967
 Ordem Pleuronematida Fauré-Fremiet in Corliss, 1956
 Ordem Loxocephalida Jankowski, 1980

Classe **PROTOCRUZIEA** Gao *et al.*, 2016
 Ordem Protocruziida Jankowski, 1980

Classe **CARIACOTRICHEA** Orsi *et al.*, 2012
 Ordem Cariacotrichida Orsi *et al.*, 2012

2. Ciliados que habitam fitotelmos em tanques de bromélias

Os fitotelmos são microambientes dinâmicos resultantes do acúmulo de água e matéria orgânica, que abrigam fauna, flora e microbiota (FISH, 1983). Embora fitotelmos possam ser formados em buracos em troncos de árvores e nos entrenós de bambus, os mais conhecidos e estudados são os tanques de bromélias. A família Bromeliaceae apresenta distribuição predominante na região neotropical com exceção apenas da espécie *Pitcairnia feliciana* Porembski & Barthlott, 1999, encontrada no continente africano (JACQUES-FÉLIX, 2000).

Dentre as mais de 3200 espécies de bromélias descritas até o presente (LUTHER, 2008), cerca de 1056 já foram observadas ocorrendo no bioma da Mata Atlântica (MARTINELLI, 2000), com destaque para o estado de Minas Gerais, que apresenta 9% das espécies de bromélias já descritas (DRUMMOND, 2005). O padrão morfológico das bromélias, a organização de suas folhas em forma de roseta e a coalescência das axilas foliares possibilitam a formação de reservatórios que retêm a água proveniente da precipitação (MARTINELLI, 2008). Esses microambientes podem abrigar uma significativa diversidade de metazoários e microrganismos (PICADO, 1913).

Os fitotelmos abrigam uma microbiota composta por organismos procariontes, eucariontes unicelulares, metazoários e fungos (BROUARD *et al.*, 2012). Entre os organismos eucariontes unicelulares, os ciliados são geralmente os mais abundantes (SIMÃO *et al.*, 2017). Inicialmente, os ciliados foram observados em ambientes fitotelmais por ecólogos (LAESSLE, 1961; MAGUIRE, 1963; MAGUIRE *et al.*, 1968; VANDERMEER *et al.*, 1972; ESTEVES & SILVA-NETO, 1996; CARRIAS *et al.*, 2001) que consideravam que a fauna de ciliados desses ambientes era composta em sua maioria por espécies ubíquas.

A partir da realização de estudos taxonômicos mais detalhados, espécies de ciliados exclusivas de fitotelmos foram descritas em tanques de bromélias, no Brasil, Equador e República Dominicana por Foissner *et al.* (2003) e também na Costa Rica, Jamaica e México por Dunthorn *et al.* (2012). Com a utilização de técnicas morfológicas apropriadas para o estudo de ciliados, principalmente a impregnação pela prata, novas espécies foram descritas nesses microambientes: *Lambornella trichoglossa* Foissner, 2003; *Bromeliophrya brasiliensis* Foissner, 2003; *Pseudovorticella bromelicola* Foissner *et al.*, 2010, entre outras.

Os dados obtidos nesses trabalhos de inventários apontam que a taxocenose de ciliados que habitam os tanques de bromélias é constituída tanto por espécies ubíquas, quanto por exclusivas, que serão consideradas neste trabalho como “espécies endêmicas de tanques de bromélias”. Esse cenário é bem e exemplificado por Buosi *et al.* (2015) que estudaram os ciliados observados em bromélias da espécie *Aechmea distichantha* Lem., presentes na margem esquerda do Rio Paraná. A proximidade das bromélias com o rio promoveu o acesso de espécies de ciliados ubíquas aos tanques de bromélias, as quais conseguiram se estabelecer nestes ambientes fitotelmais.

Aproximadamente 160 espécies de ciliados já foram observadas habitando tanques de bromélias (Tabela 1). A maior parte desses ciliados é comum a outros ambientes (solo, líquens, rios, lagos). Entretanto, ciliados endêmicos de ambientes fitotelmais são frequentemente observados em tanques de bromélias.

Tabela 1: Ciliados encontrados em tanques de bromélias.

CILIADO	CLASSE	REFERÊNCIA
<i>Acinera uncinata</i>	Litostomatea	[4]
<i>Acineta</i> sp.	Phyllopharyngea	[3]
<i>Anteholosticha muscorum</i>	Spirotrichea	[3]
<i>Arcuospathidium namibiense</i>	Litostomatea	[3]
<i>Arcuospathidium cultriforme</i>	Litostomatea	[3]
<i>Aspidisca cicada</i>	Spirotrichea	[4]

<i>Aspidisca lynceus</i>	Spirotrichea	[4]
<i>Blepharisma steini</i>	Heterotrichea	[3]
<i>Blepharisma</i> sp.	Heterotrichea	[4]
<i>Brachonella spiralis</i>	Armophorea	[4]
<i>Bresslaua vorax</i>	Colpodea	[1]
<i>Bromeliophrya brasiliensis</i>	Oligohymenophorea	[1] [2] [4] [5]
<i>Bromeliophrya minor</i>	Oligohymenophorea	[2]
<i>Bromeliophrya quadristicha</i>	Oligohymenophorea	[1] [12]
<i>Bromeliothrix metopoides</i>	Colpodea	[1] [2] [3] [4] [14]
<i>Bryometopus triquetus</i>	Colpodea	[1]
<i>Bursellopsis spumosa</i>	Prostomatea	[4]
<i>Caenomorpha</i> sp.	Armophorea	[4]
<i>Caenomorpha medulosa</i>	Armophorea	[4]
<i>Calyptotricha lanuginosa</i>	Oligohymenophorea	[4]
<i>Campanella umbellaria</i>	Oligohymenophorea	[4]
<i>Chilodonella uncinata</i>	Phyllopharyngea	[1] [3] [4]
<i>Chilodontopsis depressa</i>	Nassophorea	[4]
<i>Chlamydonellopsis</i> sp.	Phyllopharyngea	[4]
<i>Cinetochilum margaritaceum</i>	Oligohymenophorea	[1] [4]
<i>Coleps hirtus</i>	Prostomatea	[4]
<i>Colpidium colpoda</i>	Oligohymenophorea	[4]
<i>Colpidium kleini</i>	Oligohymenophorea	[4]
<i>Colpoda cucullus</i>	Colpodea	[1] [3] [4]
<i>Colpoda henneguyi</i>	Colpodea	[3]
<i>Colpoda inflata</i>	Colpodea	[1] [3] [4]
<i>Colpoda lucida</i>	Colpodea	[1] [3]
<i>Colpoda magna</i>	Colpodea	[4]
<i>Colpoda maupasi</i>	Colpodea	[1] [3]
<i>Colpoda steinii</i>	Colpodea	[1] [3] [4]
<i>Coriplites proctori</i>	Litostomatea	[2] [3]
<i>Cotterillia bromelicola</i>	Spirotrichea	[2] [3] [11]
<i>Ctedoctema</i> sp.	Oligohymenophorea	[3]
<i>Ctedoctema acanthocryptum</i>	Oligohymenophorea	[4]
<i>Cyclidium glaucoma</i>	Oligohymenophorea	[1] [3] [4]
<i>Cyclidium heptatrichum</i>	Oligohymenophorea	[4]
<i>Cyclidium muscicola</i>	Oligohymenophorea	[1] [3]
<i>Cyrtohymena quadrinucleata</i>	Spirotrichea	[3]
<i>Cyrtolophosis minor</i>	Colpodea	[2]
<i>Cyrtolophosis mucicola</i>	Colpodea	[1] [3] [4]
<i>Dexiostoma campylum</i>	Oligohymenophorea	[4]
<i>Dexiotricha granulosa</i>	Oligohymenophorea	[1] [4]
<i>Dexiotricha</i> sp.	Oligohymenophorea	[1] [2]
<i>Didinium</i> sp.	Litostomatea	[4]
<i>Dileptus</i> sp.	Litostomatea	[4]
<i>Discomorphella pectinata</i>	Plagiopylea	[4]
<i>Drepanomonas pauciciliata</i>	Nassophorea	[3]
<i>Drepanomonas revoluta</i>	Nassophorea	[1] [3] [4]
<i>Epenardia</i> sp.	Oligohymenophorea	[4]
<i>Epistylis</i> sp.	Oligohymenophorea	[1] [2] [4]
<i>Euplotes</i> sp.	Spirotrichea	[3] [4]
<i>Frontonia depressa</i>	Oligohymenophorea	[1] [3] [4]
<i>Frontonia leucas</i>	Oligohymenophorea	[4]
<i>Fuscheria terricola</i>	Litostomatea	[2]
<i>Gastrostyla</i> sp1	Spirotrichea	[2] [3]
Gigantic tetrahymenid	Oligohymenophorea	[1] [2]
<i>Glaucoma reniforme</i>	Oligohymenophorea	[4] [13]
<i>Glaucoma scintillans</i>	Oligohymenophorea	[4] [13]
<i>Glaucomidis bromelicola</i>	Oligohymenophorea	[1] [2] [3] [13]
<i>Glaucomidis</i> sp.	Oligohymenophorea	[2]
<i>Gonostomum affine</i>	Spirotrichea	[3]

<i>Gonostomum kuehnelti</i>	Spirotrichea	[3]
Gonostomum sp.	Spirotrichea	[2]
<i>Halteria grandinella</i>	Spirotrichea	[1] [3] [4]
<i>Holophryasp.</i>	Prostomatea	[4]
<i>Holophrya teres</i>	Prostomatea	[4]
<i>Holosticha sp.</i>	Spirotrichea	[4]
<i>Holosticha muscorum</i>	Spirotrichea	[3]
<i>Lagenophrys sp.</i>	Oligohymenophorea	[15]
<i>Lagynophrya sp.</i>	Litostomatea	[4]
Lambornella sp.	Oligohymenophorea	[2] [3]
Lambornella trichoglossa	Oligohymenophorea	[1] [2] [3] [4] [6]
<i>Lembadion bullinum</i>	Oligohymenophorea	[4]
<i>Lembadion lucens</i>	Oligohymenophorea	[4]
Leptopharynx bromelicola	Nassophorea	[2] [3] [10]
Leptopharynx bromeliophilus	Nassophorea	[2] [3] [9]
<i>Leptopharynx costalus</i>	Nassophorea	[1] [3] [4]
<i>Litonotus sp.</i>	Litostomatea	[1]
<i>Litonotus crystallinus</i>	Litostomatea	[4]
<i>Litonotus varsaviensis</i>	Litostomatea	[4]
<i>Loxodes sp.</i>	Karyorelictea	[4]
<i>Maryna sp.</i>	Colpodea	[2]
<i>Meseres corlissi</i>	Spirotrichea	[1]
<i>Mesodinium pulex</i>	Litostomatea	[4]
<i>Metopus sp.</i>	Armophorea	[4]
<i>Metopus minor</i>	Armophorea	[1]
<i>Metopus striatus</i>	Armophorea	[4]
<i>Microdiaphanosoma arcuatum</i>	Colpodea	[1]
<i>Microthorax pusillus</i>	Nassophorea	[1] [4]
<i>Monodinium sp.</i>	Litostomatea	[4]
<i>Mykophagophrys terricola</i>	Colpodea	[3]
<i>Nassula picta</i>	Nassophorea	[4]
<i>Odontochlamys gouraudi</i>	Phyllopharyngea	[3]
Opercularia sp.	Oligohymenophorea	[1] [3] [4]
Orborhabdostyla bromelicola	Oligohymenophorea	[2] [8]
Orthoamphisiella sp.	Spirotrichea	[2]
Oxytricha sp. 1	Spirotrichea	[2] [3]
<i>Oxytricha sp. 2</i>	Spirotrichea	[2] [4]
<i>Oxytricha haematoplasma</i>	Spirotrichea	[4]
Oxytricha longigranulosa	Spirotrichea	[1] [2]
<i>Oxytricha opisthomuscorum</i>	Spirotrichea	[3]
<i>Oxytricha ottowi</i>	Spirotrichea	[2]
<i>Oxytricha setigera</i>	Spirotrichea	[3] [4]
<i>Paramecium multimicronucleatum</i>	Oligohymenophorea	[4]
<i>Paramecium putrinum</i>	Oligohymenophorea	[4]
<i>Pattersoniella vitiphila</i>	Spirotrichea	[1] [4]
<i>Phialina sp.</i>	Litostomatea	[4]
<i>Philasterides armatus</i>	Oligohymenophorea	[4]
<i>Plagiocampa sp.</i>	Prostomatea	[3]
<i>Plagiocampa rouxi</i>	Prostomatea	[1] [4]
<i>Plagiopyla nasuta</i>	Plagiopylea	[4]
Platyophrya bromelicola	Colpodea	[2] [3] [7]
<i>Platyophrya vorax</i>	Colpodea	[1] [4]
<i>Pleuronema cf. smalli</i>	Oligohymenophorea	[4]
<i>Podophrya sp.</i>	Phyllopharyngea	[3]
<i>Pseudochilonopsis algivora</i>	Phyllopharyngea	[4]
<i>Pseudocyrtolophosis alpestris</i>	Colpodea	[1] [3]
<i>Pseudomicrothorax agilis</i>	Nassophorea	[4]
Pseudovorticella bromelicola	Oligohymenophorea	[8]
<i>Pseudourostyla franzi</i>	Spirotrichea	[3]
Rhabdostyla sp.	Oligohymenophorea	[1] [2] [4]

<i>Rimostrombidium humile</i>	Spirotrichea	[4]
<i>Saprodinium dentatum</i>	Plagiopylea	[4]
<i>Sathrophilus muscorum</i>	Oligohymenophorea	[1] [3]
<i>Spathidium sp.</i>	Litostomatea	[2] [4]
<i>Spathidium claviforme</i>	Litostomatea	[3]
<i>Spirostomum ambiguum</i>	Heterotrichea	[2]
<i>Spirostomum minus</i>	Heterotrichea	[4]
<i>Stammeridium kahli</i>	Nassophorea	[1]
<i>Stentor sp.</i>	Heterotrichea	[4]
<i>Sterkiella sp.</i>	Spirotrichea	[2]
<i>Sterkiella cavicola</i>	Spirotrichea	[3]
<i>Sterkiella histriomuscorum</i>	Spirotrichea	[1] [4]
<i>Stylonychia mytilus</i>	Spirotrichea	[4]
<i>Tetrahymena sp.</i>	Oligohymenophorea	[4]
<i>Tetrahymena rostrata</i>	Oligohymenophorea	[1] [3]
<i>Tokophrya sp.</i>	Phyllopharyngea	[3]
<i>Tokophrya infusionum</i>	Phyllopharyngea	[2] [3]
<i>Trochilioides recta</i>	Phyllopharyngea	[4]
<i>Urocentrum turbo</i>	Oligohymenophorea	[4]
<i>Usconophrys sp.</i>	Oligohymenophorea	[2]
<i>Uroleptus sp.</i>	Spirotrichea	[4]
<i>Uroleptus lepisma</i>	Spirotrichea	[1] [2] [3]
<i>Urotricha farcta</i>	Prostomatea	[4]
<i>Vorticella gracilis</i>	Oligohymenophorea	[2] [8]
<i>Vorticella convallaria</i>	Oligohymenophorea	[2]
<i>Vorticellides sp.</i>	Oligohymenophorea	[4]
<i>Vorticellides aquadulcis</i>	Oligohymenophorea	[2] [3] [4] [8]
<i>Vorticellides astyliformis</i>	Oligohymenophorea	[2] [8]

¹ Foissner *et al.* (2003), ² Dunthorn *et al.* (2012), ³ Dúran-Ramires *et al.* (2015), ⁴ Buosi *et al.* (2015), ⁵ Foissner (2003b), ⁶ Foissner (2003a), ⁷ Foissner & Wolf (2009), ⁸ Foissner *et al.* (2010), ⁹ Omar & Foissner (2011), ¹⁰ Foissner *et al.* (2011), ¹¹ Foissner & Stoeck (2011), ¹² Foissner & Stoeck (2013), ¹³ Foissner (2013), ¹⁴ Weisse *et al.* (2013), ¹⁵ Sabagh *et al.* (2011). Classificação segundo Gao *et al.* (2016). Os ciliados em negrito são considerados espécies endêmicas de tanques de bromélias pelos autores dos artigos citados.

O domínio das comunidades de ciliados em fitotelmos por espécies pertencentes às classes Oligohymenophorea e Spirotrichea (Figura 2) já havia sido observado por Dunthorn *et al.* (2012). Esse padrão é observado em ambientes terrestre e de água doce, sendo um reflexo da grande diversidade de espécies apresentada por essas duas classes (LYNN, 2008).

Ao contabilizar as sequencias de ciliado que ocorriam em ambientes fitotelmais, Dunthorn *et al.* (2012) relataram que não haviam espécies de ciliados das classes Armophorea, Plagiopylea, Karyorelictea, e Prostomatea. Com a realização de novos estudos e o aumento do número de sequências (Buosi *et al.*, 2015; Dúran-Ramírez *et al.*, 2015), espécies das classes Armophorea, Plagiopylea, e Prostomatea foram observadas em tanques de bromélias. Até o presente momento, apenas espécies de ciliados pertencentes à classe

Karyorelictea ainda não foram observados em fitotelmos, já que a maioria das espécies desta classe ocorre nas zonas entremarés (ANDREOLI *et al.*, 2009).

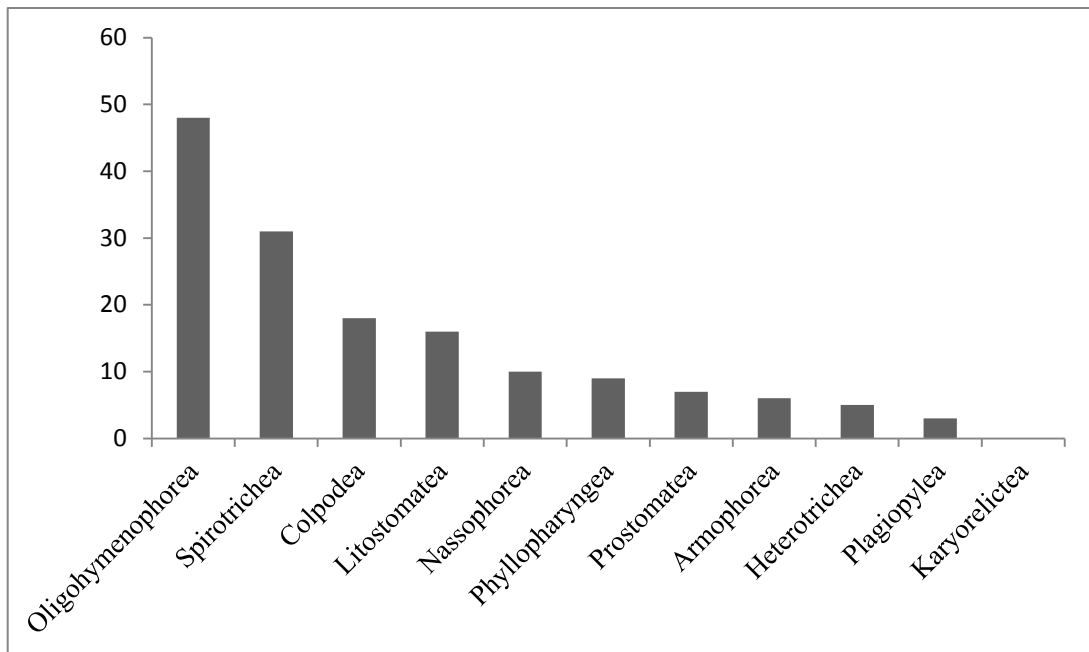


Figura 2. Representatividade das classes do filo Ciliophora em relação ao número de espécies de ciliados que ocorrem em tanques de bromélias

A ampliação do conhecimento sobre os ciliados que habitam os tanques de bromélias depende da realização de novos estudos, sejam eles de inventário taxonômico, ecológicos ou genéticos. A utilização de novas técnicas vem ajudando a melhorar o entendimento sobre os ciliados. Uma delas é o metabarcoding que visa identificar os microrganismos presentes nos tanques de bromélias através de suas sequências de DNA (SIMÃO *et al.*, 2017). Visto que o aprimoramento dessa e de outras abordagens aplicadas ao estudo dos ciliados levará algum tempo, questões relacionadas ao endemismo, especificidade e dispersão ainda permanecem sem resposta.

2.1. Endemismo

Os ambientes fitotelmais são dinâmicos e exercem grandes pressões seletivas sobre as espécies de microrganismos, devido à alta competição por recursos (KITCHING, 2001). Os ciliados que habitam esses microambientes possuem adaptações como a alternância entre formas de microssomos bacteriófagos e macrossomos predadores, além de mudanças gerais nas estruturas orais e capacidade de encistamento (FOISSNER *et al.*, 2003). Tais

características possibilitam que as espécies de ciliados endêmicas de tanques de bromélias consigam enfrentar a alta competição intra e interespecífica e se estabelecer.

Dentre os ciliados encontrados em tanques de bromélias (Tabela 1), 25 táxons são considerados endêmicos de fitotelmos. Dunthorn *et al.* (2012) destacam que a maioria desses ciliados pertencem às ordens Oligohymenophorea e Spirotrichea. É possível que a chave para entender um pouco mais sobre o surgimento de espécies endêmicas de fitotelmos esteja nos ancestrais dos ciliados dessas classes, visto a grande diversidade de espécies dessas classes presentes em tanques de bromélias, mas são necessários novos estudos para desvendar esse assunto.

Outra questão importante relacionada ao endemismo de ciliados de fitotelmos é a amostragem. O déficit da amostragem na região Neotropical é um entrave para se conhecer mais sobre os ciliados que habitam tanques de bromélias e outros tipos de fitotelmos (DUNTHORN *et al.*, 2012). Diante do cenário atual e das projeções futuras acerca de políticas para a proteção da biodiversidade no Brasil, não se trata apenas de amostrar mais áreas e sim uma corrida contra o tempo. A perda de habitats nos principais biomas brasileiros (Mata Atlântica, Cerrado e Amazônia) leva à extinção de milhares de espécies de animais e plantas, dentre elas as bromélias e toda a microbiota associada aos seus tanques (DRUMMOND *et al.*, 2008).

2.2. Especificidade

A relação entre as espécies de ciliados e bromélias tem sido estudada desde a descoberta desses organismos habitando os tanques de bromélias. Dunthorn *et al.* (2012) sugerem que não há especificidade entre as bromélias e os ciliados que habitam seus tanques, apontando que a composição da comunidade fitotelmal deve ser influenciada por outros fatores como a disponibilidade de água e matéria orgânica, incidência de luz solar, produção bacteriana, localização da bromélia (planta terrestre ou epífita) e o tamanho do tanque (HAUBRICH, 2009; BROUARD *et al.*, 2012; CARRIAS *et al.*, 2012).

Em um estudo realizado no México com ciliados presentes em tanques de bromélias das espécies *Tillandsia heterophylla* e *Tillandsia prodigiosa*, foi observado que espécies de bromélias do mesmo gênero são capazes de abrigar comunidades com composição distinta de ciliados (DÚRAN-RAMÍREZ *et al.*, 2015). Esses resultados indicam uma possível inexistência de especificidade entre ciliados e bromélias.

2.3. Dispersão

A origem dos ciliados endêmicos de fitotelmos é desconhecida, mas acredita-se que os primeiros ciliados a chegar aos tanques de bromélias tenham vindo de poças de água doce ou de musgos por processos de dispersão (FOISSNER *et al.*, 2003) e a partir de eventos de especiação teriam surgido espécies de ciliados mais adaptadas às esses microambientes. A dispersão é essencial para a colonização e recolonização dos tanques de bromélias por ciliados e outros microrganismos, e pode ser realizada com auxílio de vertebrados, invertebrados, pelo vento, pela água e até mesmo pela ação humana (FOISSNER, 2006).

Ciliados da subclasse Peritrichia são comumente encontrados em associação de epibiose com microinvertebrados. Sabagh *et al.* (2011) observaram ciliados do gênero *Lagenophrys* aderidos a valvas de ostrácodas. Esses microcrustáceos podem se dispersar aderidos no corpo de anuros (LOPEZ *et al.*, 1999, 2005) e de ácaros aderidos ao corpo de aves (GARCÍA-FRANCO *et al.*, 2001) e abelhas (GUERRA *et al.*, 2010), o que também pode influenciar na dispersão do ciliado *Lagenophrys* sp. A epibiose e a zoocoria, portanto, podem ser um bom ponto de partida para se entender os processos de dispersão de ciliados peritríqueos.

Estudando os ciliados presentes em bromélias sem tanque no México, Dúran-Ramírez *et al.* (2018) observaram a presença de cistos de ciliados das espécies *Bromeliothrix metopoides*, *Glaucomides bromelicola*, *Gonostomum bromelicola*, *Leptopharynx bromelicola* e *Leptopharynx bromeliophilus*, que são endêmicos de tanques de bromélias. Esse achado fornece evidências da ligação entre as capacidades de encistamento e dispersão dos ciliados, uma vez que os cistos podem ser transportados para outros tanques de bromélias ou para ambientes diferentes por meio da ação de dispersores. Ainda não se sabe se o agente dispersor desses ciliados são polinizadores das bromélias (invertebrados e vertebrados), o vento ou a chuva, sendo necessários mais estudos voltados para a dispersão dos ciliados.

Seção 1

Ciliados endêmicos (Alveolata, Ciliophora) que habitam fitotelmata em bromélias do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil: diversidade, especificidade e notas sobre conservação

Resumo: O Parque Estadual do Ibitipoca constitui uma importante área de conservação no Brasil devido à riqueza de espécies animais e vegetais endêmicas e por suas características biogeográficas e fitofisionômicas únicas. No presente estudo foram analisadas amostras do conteúdo fitotelmal do tanque de 15 espécies de bromélias e registrados 11 táxons de ciliados. Foram obtidas quatro novas sequências do gene 18S rDNA dos ciliados *Pseudovorticella bromelicola*, *Glaucomides* sp., *Lagenophrys* sp. e *Orbopercularia* sp., ampliando o número de sequências de ciliados exclusivos de tanques de bromélias. Dentre as 11 morfoespécies de ciliados observadas, destacamos a presença de três morfotipos do gênero *Lambornella*, com acentuada divergência genética com base no marcador COI, sugerindo três possíveis novas espécies para o gênero. A análise de 261 amostras de fitotelmo, com objetivo de investigar relação das 11 morfoespécies de ciliados com as 15 espécies de bromélias, demonstrou que não há especificidade entre ciliados e bromélias no Parque Estadual do Ibitipoca, Brazil. Visto que diversas espécies de bromélias que ocorrem na Floresta Atlântica Brasileira estão ameaçadas e que este risco ameaça a microbiota endêmica associada a seus tanques, destacamos aqui a necessidade de se ampliar os estudos sobre a taxocenose de microeucariotos ciliados que habitam os tanques de bromélias e de utilizá-los em futuros programas de conservação da biodiversidade.

Palavras-chaves: Endemismo, Bromélias, Ciliophora, *Lambornella*, 18S rDNA, COI, Floresta Atlântica.

1. Introdução

A Serra da Mantiqueira é um dos complexos montanhosos mais importantes em termos de biodiversidade, no sudeste brasileiro (ALMEIDA & CARNEIRO, 1998). Nesta região, o Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB) se destaca por ser um maciço montanhoso com gradiente altitudinal elevado e vegetação composta por um mosaico de fitofisionomias com

áreas de Florestas Ombrófilas, Nanoflorestas Nebulares e *Campos Rupestres* (OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2013). Essa região abriga uma elevada diversidade vegetal, com destaque para a família Bromeliaceae (FORZZA *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2018). Dentre as 3086 espécies de bromélias que ocorrem na região tropical do continente americano (LUTHER, 2008), trinta e duas já foram identificadas no PEIB (FORZZA *et al.* 2013).

As bromélias apresentam o corpo em formato de roseta devido à coalescência das axilas de suas folhas (MARTINELLI, 2007). Essas estruturas são capazes de captar e armazenar água da chuva e detritos orgânicos formando microambientes conhecidos como fitotelmos (FISH, 1983). A disponibilidade de recursos e as condições físico-químicas presentes nos tanques de bromélias propiciam o estabelecimento de uma ampla diversidade de protozoários e metazoários (MAGUIRE, 1971; BENZING, 1972; MARTINELLI, 2000; CARRIAS, 2001; KITCHING, 2001). Os protozoários ciliados foram inicialmente observados habitando tanques de bromélias através de estudos ecológicos (PICADO, 1911; LAESSLE, 1961; MAGUIRE, 1963; VANDERMEER *et al.*, 1972; ESTEVES & SILVA-NETO, 1996) e acreditava-se que esses microrganismos eram ubíquos. Com a realização de estudos taxonômicos mais apurados foi possível constatar a presença de espécies de ciliados exclusivas dos ambientes fitotelmais em tanques de bromélias (FOISSNER *et al.*, 2003; DÚRAN-RAMÍREZ *et al.*, 2015), que serão consideradas neste trabalho como “espécies endêmicas de tanques de bromélias”.

Os ciliados são componentes importantes da microbiota fitotelmal e participam ativamente da ciclagem de nutriente e transferência de energia entre os níveis tróficos nos fitotelmos (KRATINA *et al.*, 2017). Atualmente são conhecidas cerca de 8000 espécies de ciliados (LYNN, 2008), sendo que aproximadamente 160 táxons já foram observados em tanques de bromélias e apenas 25 destes considerados endêmicos de tanques de bromélias (FOISSNER *et al.*, 2003; DURÁN-RAMÍREZ *et al.*, 2015). Essa diversidade de espécies de ciliados provavelmente é subestimada pela presença de espécies encistadas, que não se tornam ativos mesmo quando cultivados (FENCHEL *et al.*, 1997; ESTEBAN & FINLAY, 2003).

Uma compreensão ampla sobre a diversidade de ciliados em ambientes fitotelmais deve ser alcançada por meio da utilização de diversas abordagens em conjunto, fornecendo dados mais robustos sobre morfologia, ecologia, taxonomia e relações filogenéticas das espécies de ciliados (MODEO *et al.*, 2013). Embora os ciliados possam ser bons modelos para estudos moleculares, filogenéticos e de genética de populações devido a elevada quantidade de sequências disponíveis no GenBank (DUNTHORN *et al.*, 2012), o número de sequências de espécies de ciliados endêmicos de tanques de bromélias é escasso, restringindo a

possibilidade de estudos filogenéticos que possam elucidar perguntas sobre a origem, especiação e endemismo de ciliados em ambientes fitotelmais.

Do ponto de vista ecológico, os fitotelmos são microecossistemas complexos e dinâmicos que apresentam condições ambientais características, isolamento geográfico e forte competição intra e interespecífica (FOISSNER *et al.*, 2003). Estudos ecológicos buscam entender quais são os filtros ambientais que influenciam diretamente a estrutura da microbiota associada aos ambientes fitotelmais (HAUBRICH *et al.*, 2009; FARJALLA *et al.*, 2012; DUARTE *et al.*, 2013) e se existe alguma relação de especificidade entre as bromélias e os ciliados (DURÁN-RAMÍREZ *et al.*, 2015). A teoria mais aceita atualmente é que não há relação de especificidade entre esses dois grupos de organismos (DUNTHORN *et al.*, 2012).

1.1. Objetivos

O presente estudo teve como objetivos inventariar a fauna de ciliados que habitam tanques de bromélias no PEIB, ampliar o número de sequências de ciliados endêmicas de ambientes fitotelmais e utilizá-las na delimitação de espécies; investigar as relações de especificidades entre ciliados e bromélias em um âmbito local, bem como iniciar uma discussão que aponta os ciliados que habitam tanques de bromélias são potenciais ferramentas para programas de conservação da biodiversidade.

2. Material e Métodos

2.1. Área de estudo e coleta das amostras

O PEIB está localizado no estado de Minas Gerais, na região sudeste do Brasil. (21°40'-21°44' S e 43°52'-43°55' W) e apresenta uma área de 1,488 ha com relevo formado por escarpas altas com altitudes entre 1100 m e 1784 m (RODELA & TARIFA, 2002). Segundo Köppen (1948), o clima da região é classificado como Subtropical de altitude (Cwb) com invernos secos e verões chuvosos com temperaturas amenas. A precipitação anual média fica em torno de 1532 mm e a temperatura anual média é de 18.9° C (CETEC, 1983). A vegetação do PEIB (Figura 1) é composta predominantemente por áreas de vegetação savânicas conhecidas como *Campos Rupestres* (OLIVEIRA-FILHO, 2009), que é composta por gramíneas e outras plantas herbáceas, podendo apresentar áreas de adensamento com arbustos e pequenas árvores (VASCONCELOS, 2011). No interior das áreas de *Campos Rupestres* ocorrem formações florestais conhecidas como Nanoflorestas Nebulares, geralmente

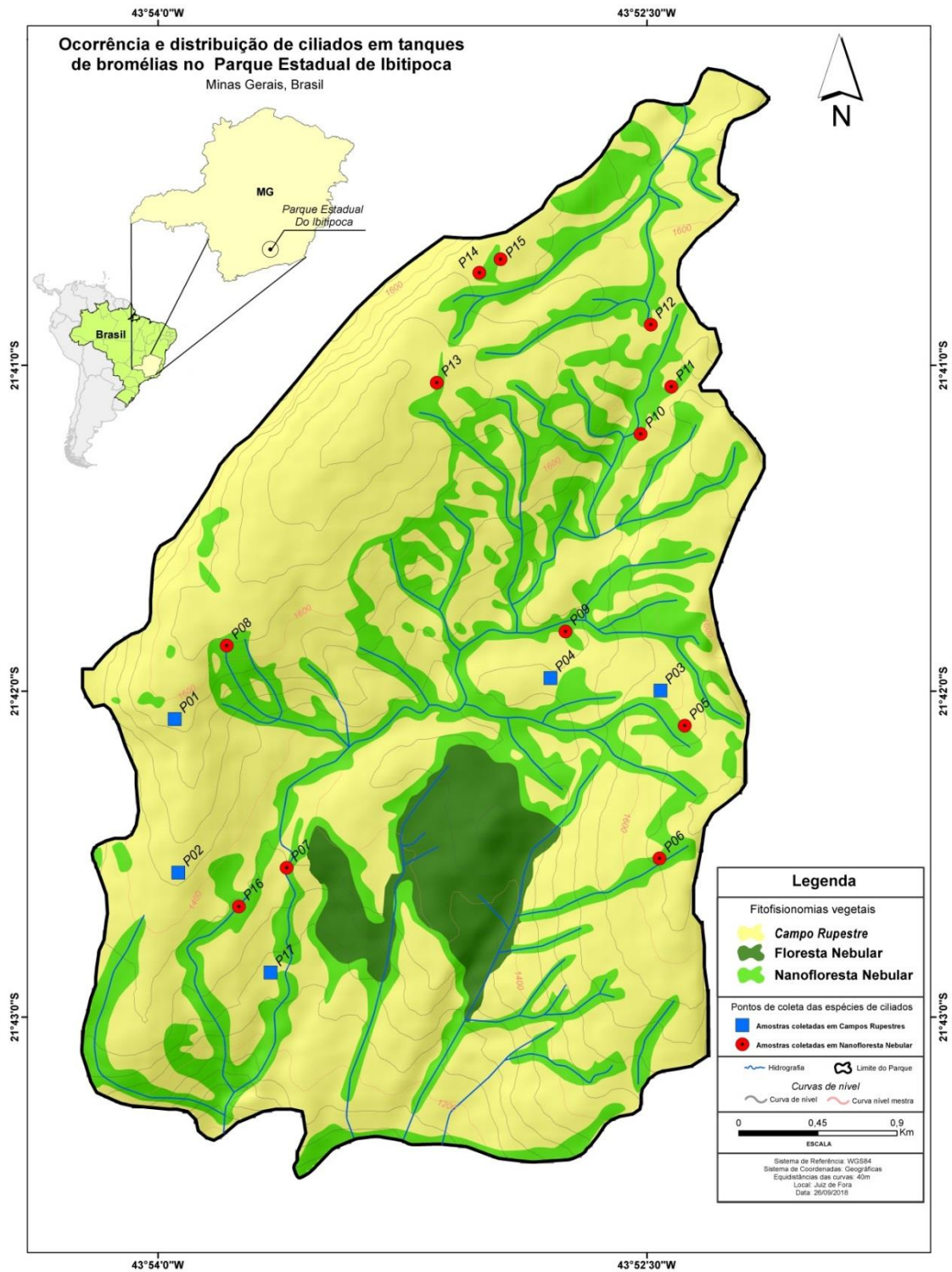


Figura 1. Ocorrência e distribuição de ciliados em tanques de bromélias do Parque Estadual do Ibitipoca. Pontos de coleta: Trilha 1 (P03; P04), Trilha 2 (P01; P02), Gruta do Pião (P05), Gruta dos Viajantes (P06), Prainha (P07), Gruta da Cruz (P08), Trilha 3 (P09; P10; P11; P12; P13), Gruta dos Fugitivos (P14), Gruta dos Três Arcos (P15), Gruta dos Coelhos (P16) e Ponte de Pedra (P17).

relacionadas com a rede de drenagem do PEIB. As Nanoflorestas Nebulares são formações florestais conhecidas por serem frequentemente envolvidas por neblina e nuvens (BRUIJNZEEL *et al.*, 2011; FORZZA *et al.*, 2013), possibilitando que a copa das árvores seja capaz de interceptar a umidade dos nevoeiros e adicionar água ao ecossistema (BRUIJNZEEL *et al.*, 2011). Esta fitofisionomia ocorre geralmente em áreas de altitudes elevadas e correspondem a 2,5% da área total dos bosques tropicais do mundo (BUBB *et al.*, 2004).

Amostras de conteúdo fitotelmal (água e sedimentos) de tanques de bromélias foram coletadas em sete campanhas de campo realizadas durante a estação chuvosa entre outubro de 2017 e abril de 2018 (uma campanha por mês, exceto em dezembro de 2017). Foram coletadas 261 amostras do conteúdo fitotelmal de tanques de bromélias (Figura 2) pertencentes às espécies *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb, 1864; *Aechmea phanerophlebia* Baker, 1899; *Billbergia alfonsojoannis* Reitz, 1952; *Billbergia distachia* (Vell.) Mez, 1892; *Neoregelia ibitipocensis* (Leme) Leme, 1998; *Neoregelia oligantha* L.B.Sm., 1955; *Nidularium ferdinandocoburgii* Wawra, 1880; *Nidularium marigoii* Leme, 1991; *Vriesea bituminosa* Wawra, 1862; *Vriesea cacuminis* L.B.Sm., 1968; *Vriesea friburgensis* Mez, 1952; *Vriesea heterostachys* (Baker) L.B.Sm., 1970; *Vriesea hoehneana* L.B.Sm., 1933; *Vriesea penduliflora* L.B.Sm., 1943 e *Wittrockia gigantea* (Baker) Leme, 1997.

Em cada espécime de bromélia, foram coletados 40 mililitros do conteúdo fitotelmal com o auxílio de uma pipeta acrílica. As amostras foram acondicionadas em tubos Falcon de 50 mililitros e transportadas para o Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora para serem analisadas em um microscópio estereoscópio. As análises dos ciliados *in vivo* foram realizadas em até 12 horas após as coletas. Os ciliados encontrados foram triados com o auxílio de micropipetas de vidro (FOISSNER, 2014) e observados *in vivo* em microscópio Olympus BX 51 equipado com contraste por interferência diferencial (DIC). A identificação dos ciliados foi baseada na literatura especializada (FOISSNER, 2003a, 2003b; FOISSNER *et al.*, 2003, 2010; SABAGH, 2011) e a classificação seguiu Lynn (2008).

2.2. Cultivos

Após análise inicial das amostras de conteúdo fitotelmal, estas foram acondicionadas em placas de Petri de tamanho médio para a realização de cultivos. Foram realizados três tipos de cultivos: o primeiro era composto apenas pela água coletada nos tanques de bromélias, com o acréscimo de três grãos de arroz com casca (fonte de nutrientes para as



Figura 2. Espécies de bromélias do Parque Estadual do Ibitipoca utilizadas neste estudo. **A:** *Aechmea phanerophlebia*; **B:** *Billbergia alfonsojoannis*; **C:** *Billbergia distachia*; **D:** *Aechmea nudicaulis*; **E:** *Nidularium marigoii*; **F:** *Nidularium ferdinandocoburgii*; **G:** *Wittrockia gigantea*; **H:** *Neoregelia ibitipocensis*; **I:** *Neoregelia oligantha*; **J:** *Vriesea penduliflora*; **K:** *Vriesea cacuminis*; **L:** *Vriesea friburgensis*; **M:** *Vriesea bituminosa*; **N:** *Vriesea heterostachys*.

populações bacterianas); o segundo era composto de água coletada nos tanques de bromélias e água mineral sem gás (na proporção 1:1) e também houve o acréscimo de três grãos de arroz com casca; o terceiro foi feito com a utilização de um meio de cultivo de Cerophyl, produzido segundo Sonneborn (1957).

Durante a realização deste estudo, não houve sucesso nas tentativas de se cultivar as espécies de ciliados coletadas em tanques de bromélias. Possivelmente as condições físico-químicas presentes nos três meios de cultivo eram diferentes das condições naturais encontradas nos fitotelmos, fazendo com que as populações de ciliados declinassem nas amostras. Uma hipótese é que a acidez apresentada pela água em tanques de bromélias (MARINO *et al.*, 2011) não foi reproduzida pelo meios de cultivo utilizados neste estudo, sendo necessário novos estudos para produzir meios de cultivo mais apropriados para ciliados que ocorrem em ambientes fitotelmais.

2.3. Técnicas de impregnação pela prata

Para a realização da caracterização morfológica das espécies de ciliados observadas nas amostras de conteúdo fitotelmal do PEIB, foram realizadas técnicas de impregnação pela prata. Esse tipo de técnica de coloração utilizando prata é um dos principais métodos utilizados para o estudo morfológico de ciliados (FOISSNER, 1991). As técnicas de prata a seco (ver protocolo no anexo 2) e carbonato de prata (ver protocolo no anexo 3) a o ciliado do gênero *Glaucoides* e para os três morfotipos do gênero *Lambornella*. Embora Foissner (2014) afirme que ambas as técnicas são indicadas para ciliados da ordem Tetrahymenida, não conseguimos realizar as técnicas com sucesso.

2.4. Estudos Moleculares

Para a extração do DNA genômico, cerca de 30 ciliados de cada morfoespécies (*Pseudovorticella bromelicola*, *Glaucoides* sp., *Lagenophrys* sp., *Orbopercularia* sp., *Lambornella* sp. 1, *Lambornella* sp. 2 e *Lambornella* sp. 3) foram triados e fixados em etanol absoluto. O DNA genômico foi extraído usando o kit DNeasy® (Blood and Tissue – QIAGEN), seguindo o protocolo especificado pelo fabricante (Anexo 4). As reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) e de sequenciamento foram feitas de acordo com as especificações descritas na Tabela 1.

Para realizar a amplificação do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) de *Lambornella* sp. 3 foram criados primers específicos LambCOI 23F (5'–

ACAGCTGCTGCTAATACAGG – 3’) e LambCOI 638R (5’–TGGTTTTTGATACAGCCTTGTGG–3’). A ciclagem utilizada foi: 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação das fitas de DNA), 55°C por 30 segundos (anelamento dos iniciadores) e 72°C por 1 minuto (etapa de polimerização); por fim, um ciclo de 72°C por 7 minutos. Os produtos do PCR foram purificados utilizando o kit “QIAquick PCR Purification Kit – Qiagen” seguindo as orientações do fabricante. As amostras purificadas foram sequenciadas em um analisador genético Applied Biosystems® 3130x.

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de PCR e de sequenciamento.

Ciliado	Marcador Genético	Primers - PCR	Primers - Sequenciamento	Referência
<i>Glaucoides</i> sp.	18S rDNA	eukA/eukB	eukA/eukB/536R/1052R/783F	Medlin et al. 1988
<i>Pseudovorticella bromelicola</i>	18S rDNA	Peri 57F/Peri 1385R	Peri 57F/Peri 1385R/Peri 779R/Peri 975F/peri 1042R	Dias, 2012
<i>Orbopercularia</i> sp.	18S rDNA	Peri 57F/Peri 1385R	Peri 57F/Peri 1385R/Peri 779R/Peri 975F/peri 1042R	Dias, 2012
<i>Lanenophrys</i> sp.	18S rDNA	Peri 57F/Peri 1385R	Peri 57F/Peri 1385R/Peri 779R/Peri 975F/peri 1042R	Dias, 2012
<i>Lambornella</i> sp. 1	COI	F388dT/R1184dT	F388dT/R1184dT	Strüder-Kypke and Lynn 2010
<i>Lambornella</i> sp. 2	COI	F388dT/R1184dT	F388dT/R1184dT	Strüder-Kypke and Lynn 2010
<i>Lambornella</i> sp. 3	COI	LambCOI 23F/ LambCOI 638R	LambCOI 23F/ LambCOI 638R	Present study

2.4.1. Inventário

Para a realização do inventário de ciliados e para entender quais as relações filogenéticas que existem entre os as espécies de ciliados que habitam ambientes fitotelmais, as quatro sequências do gene 18S rDNA obtidas nesse trabalho dos ciliados *Lagenophrys* sp., *Orbopercularia* sp., *Pseudovorticella bromelicola* e *Glaucoides* sp. foram incluídas em um *data set* contendo sequências obtidas no GenBank de representantes de todas as classes de Ciliophora (LYNN, 2008), incluindo espécies de vida livre e com hábito restrito a tanques de bromélia. O alinhamento das sequências foi feito no programa SINA (PRUESSE *et al.*, 2012) e a reconstrução filogenética foi realizada utilizando máxima verossimilhança. Para isso usamos o programa RAxML (STAMATAKIS, 2006) e aplicamos o modelo evolutivo GTR+G+I, como sugerido pela análise realizada no programa jModeltest 2.1.4 (GUIDON & GASCUEL, 2003). Foi utilizado o algoritmo New Hill Climbing para buscar a melhor topologia.

2.4.2. *Glaucoides* sp. e os ciliados peritricheos

Para ajudar na identificação dos ciliados da ordem Peritrichia e para investigar se o táxon do gênero *Glaucoides* encontrada nesse estudo é uma espécie nova, foram preparados

dois outros *data sets*. No primeiro, incluímos *Glaucomides* sp. e um conjunto de representantes da ordem Hymenostomatida (Oligohymenophorea); no segundo incluímos *Lagenophrys* sp., *Orbopercularia* sp., *Pseudovorticella bromelicola* e um conjunto de representantes da ordem Peritrichia (Oligohymenophorea). O Modelo evolutivo utilizado foi o GTR +G +I como sugerido pela análise realizada no programa jModeltest 2.1.4 (GUIDON & GASCUEL, 2003). Os alinhamentos foram feitos no programa SINA (PRUESSE *et al.*, 2012) e a reconstrução das filogenias foi realizada utilizando os métodos de máxima verossimilhança (PhyML (GUINDON *et al.*, 2010)) e bayesiana (Mrbayes (RONQUIST *et al.*, 2012)). A credibilidade dos ramos das árvores ML foi avaliada empregando Bootstrap de 1000 pseudoreplicas. As análises no Mrbayes foram processadas em quatro cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC), cada uma com 5.000.000 gerações, amostradas a cada 1.000 gerações e em duas corridas paralelas. A convergência foi estabelecida garantindo que o desvio padrão da média da frequência de separação (split frequencies) fosse menor que 0,01. Os primeiros 25% das árvores foram descartadas “burn-in”. A árvore consenso (Majority rule) foi construída a partir das árvores resultantes para estimar as probabilidades posteriores. A visualização da árvore foram feitas utilizando o software FigTree versão 1.4.2 (RAMBAUT *et al.*, 2012).

2.4.3. Morfotipos de *Lambornella*

Para investigar se os três morfotipos do gênero *Lambornella* (Tetrahymenidae: Hymenostomatida) encontrados no PEIB são polimorfismos da espécie *Lambornella trichoglossa* ou espécies novas, foram realizadas análises filogenéticas a partir de um *data set* que incluiu sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) obtidas no presente estudo e sequências de representantes da ordem Hymenostomatida e de outras ordens da classe Oligohymenophorea como: Peniculida, Urocentrida, Apostomatida, Philasterida disponíveis no Bold (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007). As sequências foram alinhadas com o programa MAFFT (KATOH *et al.*, 2005) utilizando FFT-NS-i (iterative refinement method). As reconstruções filogenéticas foram feitas utilizando o método de máxima verossimilhança (PhyML (GUINDON *et al.*, 2010)) e bayesiana (Mrbayes (RONQUIST *et al.*, 2012)). O Modelo evolutivo utilizado foi o GTR +G +I, como sugerido pela análise realizada no programa jModeltest 2.1.4 (GUIDON & GASCUEL, 2003). As tabelas de divergência genética foram calculadas utilizando o pacote de programas ARB (LUDWIG *et al.*, 2004).

2.5. Especificidade ciliados/bromélias

Para investigar as relações de especificidade entre ciliados e bromélias foi construída de uma rede de interações de espécies. O Parâmetro utilizado na construção da rede de interações foi a presença das espécies de ciliados nos tanques de cada uma das espécies de bromélias. Na construção da rede de interação foram utilizados os pacotes *vegan* (OKSANEN *et al.*, 2018) e *bipartite* (DORMANN *et al.*, 2009) do programa R (R Development Core Team, 2018).

3. Resultados

3.1. Distribuição e ocorrência de ciliados bromelícolas

Durante este estudo foram observados 11 táxons de ciliados pertencentes a três classes do filo Ciliophora (Figura 3). A classe Oligohymenophorea foi a mais representativa com 8 táxons de ciliados, *Glaucomides* sp., *Pseudovorticella bromelicola*, *Lagenophrys* sp., *Orbopercularia* sp., uma espécie de tetrahymenideo gigante e três morfotipos do gênero *Lambornella* (*Lambornella* sp. 1, *Lambornella* sp. 2, *Lambornella* sp. 3). Os outros ciliados observados foram duas espécies do gênero *Metopus* (Armophorea) e uma morfoespécie de hipotríqueo (Spirotrichea).

Para a identificação das espécies *Lagenophrys* sp. e *Orbopercularia* sp. observadas no PEIB, estudos morfológicos mais apurados utilizando técnicas de impregnação pela prata precisam ser realizados. O tetrahymenideo gigante é uma espécie nova e endêmica de tanques de bromélias. Embora esta espécie ainda não tenha sido descrita, estudos morfológicos e moleculares já foram feitos por Halfeld (2014). Já a espécie *Pseudovorticella bromelicola* foi descoberta em tanques de bromélias na Costa Rica por (FOISSNER *et al.* 2010), sendo considerada endêmica de ambientes fitotelmais.

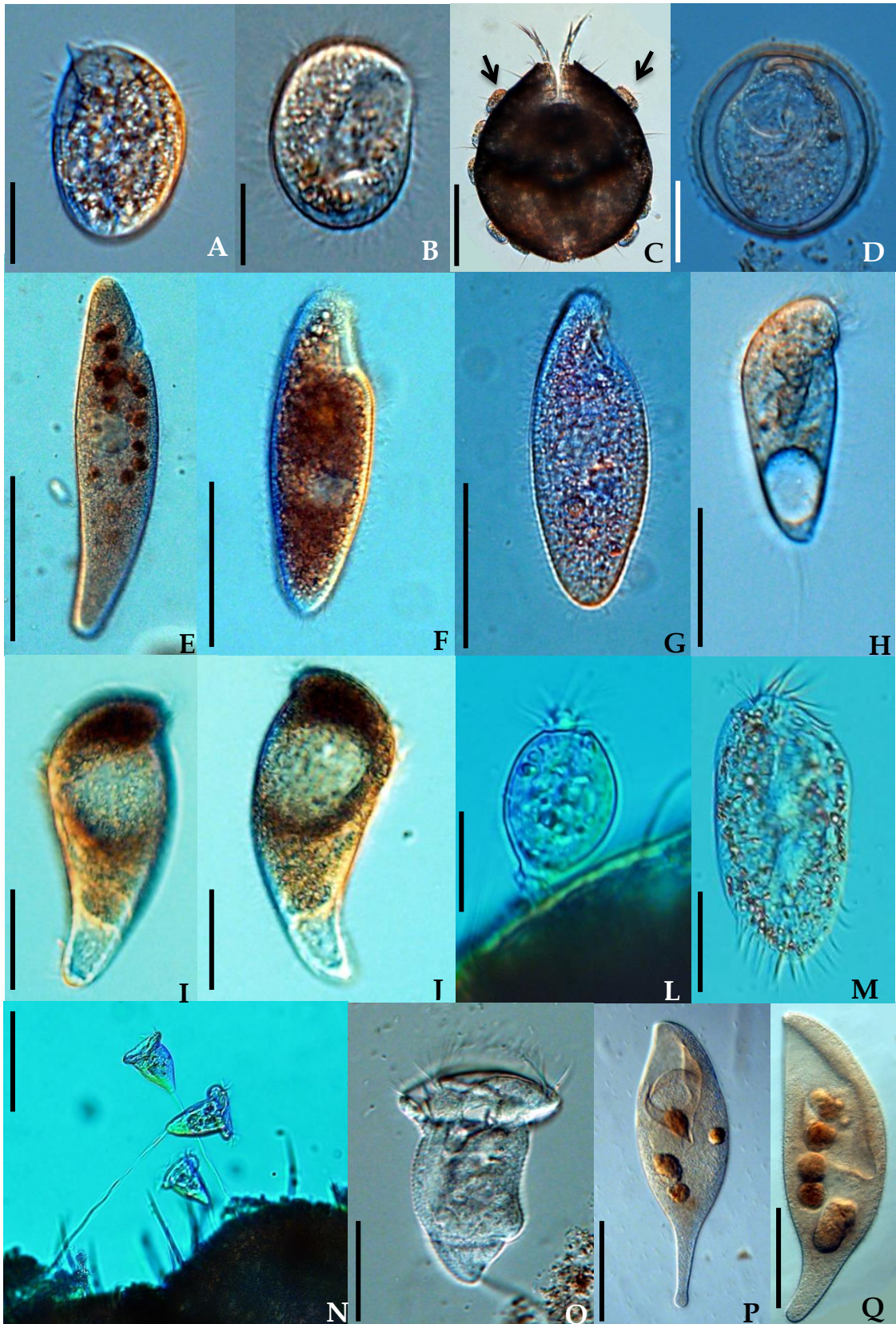


Figura 3. Ciliados encontrados em tanques de bromélias do Parque Estadual de Ibitipoca, Minas Gerias, Brasil. Ciliates observed *in vivo*. **A - B:** *Glaucomides* sp. **C:** *Lagenophrys* sp. (setas) agarrados em ostracodas. **D:** *Lagenophrys* sp. **E:** *Lambornella* sp. 3. **F:** *Lambornella* sp. 2. **G:** *Lambornella* sp. 1. **H:** *Metopus* sp. 1. **I - J:** *Metopus* sp. 2. **L:** *Orbopercularia* sp. **M:** Morfoespécie de Hipotríqueo. **N - O:** *Pseudovorticella bromelicola*. **P - Q:** Tetrahymenidae gigante. Barras de escala: (A, B, H) 20 μm ; (D, L, O) 30 μm ; (I, J, M) 50 μm ; (C) 70 μm ; (F, G) 100 μm ; (E, N, P, Q) 130 μm .

As espécies *Lagenophrys* sp., *Lambornella* sp. 1, *Glaucomides* sp. e o tetrahymenídeo gigante foram os ciliados que apresentaram distribuição mais ampla entre os pontos de coleta no PEIB (Tabela 2), tendo ocorrido em mais de dez diferentes espécies de bromélia. Já a morfoespécie *Lambornella* sp. 3 apresentou a distribuição mais restrita, sendo observada apenas em amostras coletadas nas bromélias *Aechmea phanerophlebia* (P05) e *Nidularium ferdinandocoburgii* (P09) localizadas em áreas com Nanoflorestas Nebulares mais densas.

Tabela 2. Distribuição de ciliados encontrados em tanques de bromélias do Parque Estadual do Ibitipoca.

Ciliate species	Bromeliad species														Total	
	<i>Aechmea nudicaulis</i>	<i>Aechmea phanerophlebia</i>	<i>Billbergia alfonsojoannis</i>	<i>Billbergia distachia</i>	<i>Neoregelia ibitipocensis</i>	<i>Neoregelia oligantha</i>	<i>Nidularium ferdinando-coburgii</i>	<i>Nidularium marigoii</i>	<i>Vriesea bituminosa</i>	<i>Vriesea cacuminis</i>	<i>Vriesea friburgensis</i>	<i>Vriesea heterostachys</i>	<i>Vriesea hoehneana</i>	<i>Vriesea penduliflora</i>		<i>Wittrockia gigantea</i>
<i>Glaucomides</i> sp.	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	10
<i>Lagenophrys</i> sp.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	12
<i>Lambornella</i> sp. 1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	11
<i>Lambornella</i> sp. 2	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	6
<i>Lambornella</i> sp. 3	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Metopus</i> sp. 1	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	4
<i>Metopus</i> sp. 2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	3
<i>Orbopercularia</i> sp.	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	2
Morfoespécie de Hipotríqueo	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	4
<i>Pseudovorticella bromelicola</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	10
Tetrahymenídeo gigante	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	10
Total	5	8	4	2	7	5	9	3	6	4	6	5	2	7	2	

Os 11 táxons de ciliados foram observados em amostras coletadas em áreas de Nanoflorestas Nebulares, enquanto que em áreas de *Campos Rupestres* foram encontrados sete desses táxons (Tabela 3). A composição da comunidade de ciliados presente em uma espécie de bromélia variou de acordo com o ponto de coleta. Um exemplo disso é a bromélia da espécie *Vriesea bituminosa*, quando localizada no ponto P04, ela apresentava apenas a ciliado tetrahymenídeo gigante. Já outro indivíduo da mesma espécie localizado no ponto P05 apresentava seis espécies de ciliados.

Tabela 3. Distribuição de ciliados nas espécies de bromélias e pontos de coleta no Parque Estadual do Ibitipoca.

Ponto	Bromélia	<i>Lambornella</i> sp. 1	<i>Tetrahymenideo</i> gigante	<i>Lagenophrys</i> sp.	<i>Pseudovorticella bromelicola</i>	<i>Metopus</i> sp. 1	<i>Glaucomides</i> sp.	<i>Metopus</i> sp. 2	<i>Lambornella</i> sp. 2	<i>Lambornella</i> sp. 3	<i>Orbopercularia</i> sp.	Morfoespécie de Hipotríqueo	Altitude	Vegetação
P01	<i>Vriesea cacuminis</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	1600	CR
	<i>Vriesea friburgensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1600	CR
P02	<i>Vriesea friburgensis</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	1450	CR
P03	<i>Vriesea friburgensis</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1485	CR
	<i>Vriesea penduliflora</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1485	CR
P04	<i>Vriesea bituminosa</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1454	CR
	<i>Vriesea friburgensis</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	1454	CR
	<i>Vriesea penduliflora</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1454	CR
P05	<i>Aechmea phanerophlebia</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	1620	DF
	<i>Neoregelia ibitipocensis</i>	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	1620	DF
	<i>Nidularium ferdinandocoburgii</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	1620	DF
	<i>Vriesea bituminosa</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	1620	DF
	<i>Vriesea penduliflora</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	1620	DF
P06	<i>Aechmea phanerophlebia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1655	DF
	<i>Nidularium marigoii</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1655	DF
	<i>Vriesea bituminosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1655	DF
	<i>Vriesea hoehneana</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	1655	DF
	<i>Vriesea penduliflora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1655	DF
	<i>Wittrockia gigantea</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	1655	DF
P07	<i>Vriesea bituminosa</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1346	DF
P08	<i>Neoregelia ibitipocensis</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	1661	DF
	<i>Nidularium ferdinandocoburgii</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	1661	DF
	<i>Vriesea penduliflora</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1661	DF
P09	<i>Nidularium ferdinandocoburgii</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	1481	DF
	<i>Vriesea bituminosa</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1481	DF
	<i>Vriesea friburgensis</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	1481	DF
P10	<i>Billbergia distachia</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1586	DF
	<i>Vriesea bituminosa</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	1586	DF
	<i>Vriesea penduliflora</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	1586	DF
P11	<i>Neoregelia ibitipocensis</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	1642	DF
	<i>Nidularium ferdinandocoburgii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1642	DF
	<i>Vriesea bituminosa</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1642	DF
	<i>Vriesea heterostachis</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	1642	DF
P12	<i>Vriesea bituminosa</i>	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	1636	DF
	<i>Vriesea penduliflora</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1636	DF
P13	<i>Vriesea bituminosa</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	1652	DF

Continuação da tabela 3.

Ponto	Bromélia	<i>Lambornella</i> sp. 1	<i>Tetrahymenideo gigante</i>	<i>Lagenophrys</i> sp.	<i>Pseudovorticella bromelicola</i>	<i>Metopus</i> sp. 1	<i>Glaucomides</i> sp.	<i>Metopus</i> sp. 2	<i>Lambornella</i> sp. 2	<i>Lambornella</i> sp. 3	<i>Orbopercularia</i> sp.	Morfoespécie de Hipotríqueo	Altitude	Vegetação
P14	<i>Aechmea nudicaulis</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	1689	DF
	<i>Billbergia alfonsojoannis</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	1689	DF
	<i>Neoregelia ibitipocensis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1689	DF
	<i>Neoregelia oligantha</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	1689	DF
	<i>Nidularium ferdinandocoburgii</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	1689	DF
	<i>Vriesea bituminosa</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	1689	DF
	<i>Vriesea penduliflora</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	1689	DF
P15	<i>Nidularium marigoii</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	1688	DF
	<i>Neoregelia ibitipocensis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1688	DF
P16	<i>Billbergia distachia</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1369	DF
P17	<i>Vriesea bituminosa</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1288	CR
	<i>Vriesea cacuminis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1288	CR
	<i>Vriesea friburgensis</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1288	CR
	<i>Vriesea penduliflora</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1288	CR

Trilha 1 (P03; P04), Trilha 2 (P01; P02), Gruta do Pião (P05), Gruta dos Viajantes (P06), Prainha (P07), Gruta da Cruz (P08), Trilha 3 (P09; P10; P11; P12;P13), Gruta dos Fugitivos (P14), Gruta dos Três Arcos (P15), Gruta dos Coelho (P16) e Ponte de Pedra (P17). DF – Nanofloreta Nebular; CR – Campos Rupestres.

3.2. Especificidade entre ciliados X bromélias

Os 11 táxons de ciliados observados no PEIB apresentaram diferentes padrões de ocorrência em tanques de bromélias (Figura 4). Ao observarmos as amostras do conteúdo fitotelmal de 15 espécies de bromélias pertencentes aos gêneros *Aechmea*, *Billbergia*, *Neoregelia*, *Nidularium*, *Vriesea* e *Wittrockia* e identificarmos os ciliados presentes em cada uma das amostras, podemos perceber que espécies como *Glaucomides* sp., *Pseudovorticella bromelicola*, *Lambornella* sp. 1 e *Lagenophrys* sp. apresentaram uma distribuição ampla, ocorrendo em pelo menos 10 espécies diferentes. Enquanto isso, houve ciliados com distribuição mais restrita, como no caso das espécies *Lambornella* sp. 3 e *Orbopercularia* sp. que ocorreram apenas em tanques de três espécies de bromélias.

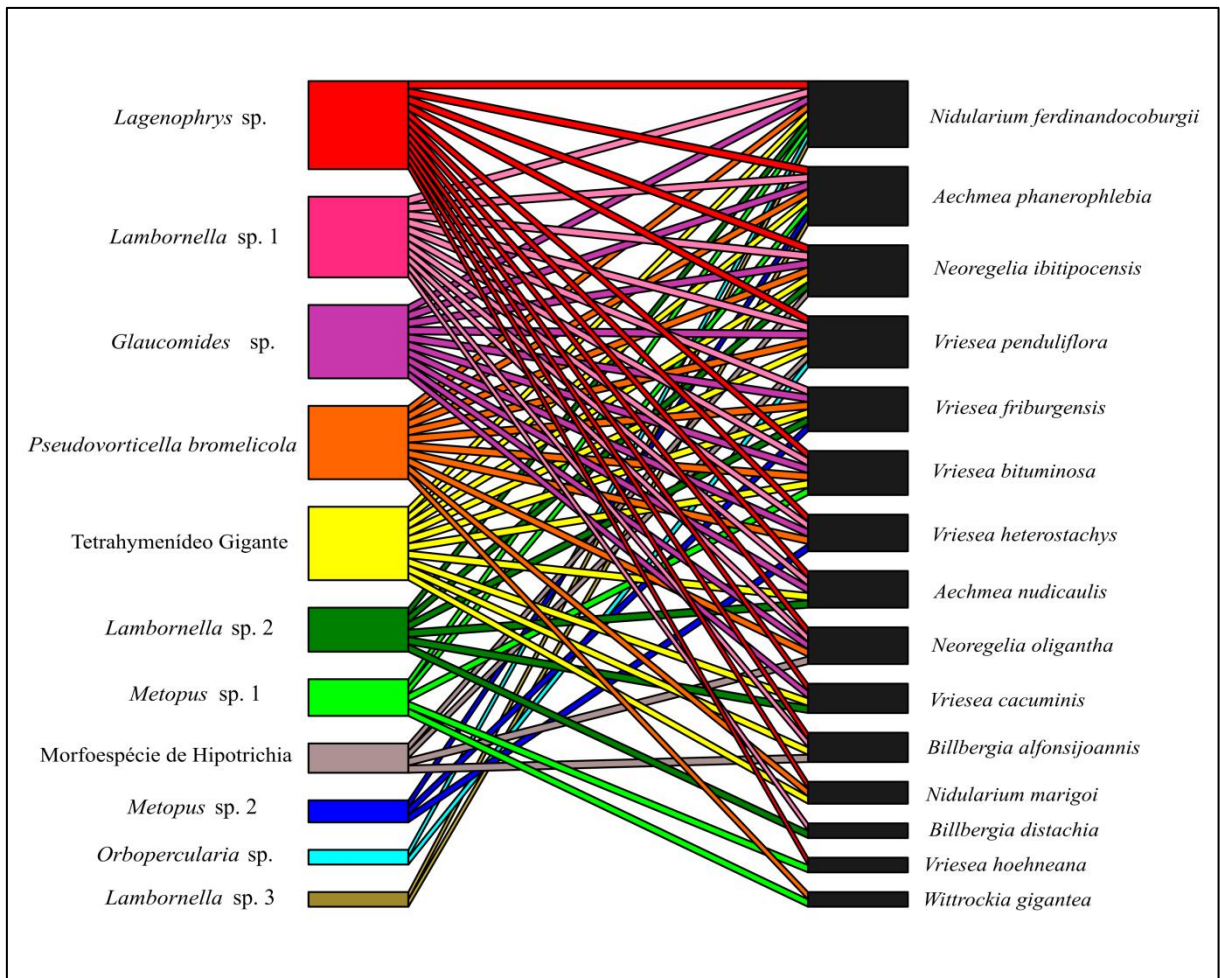


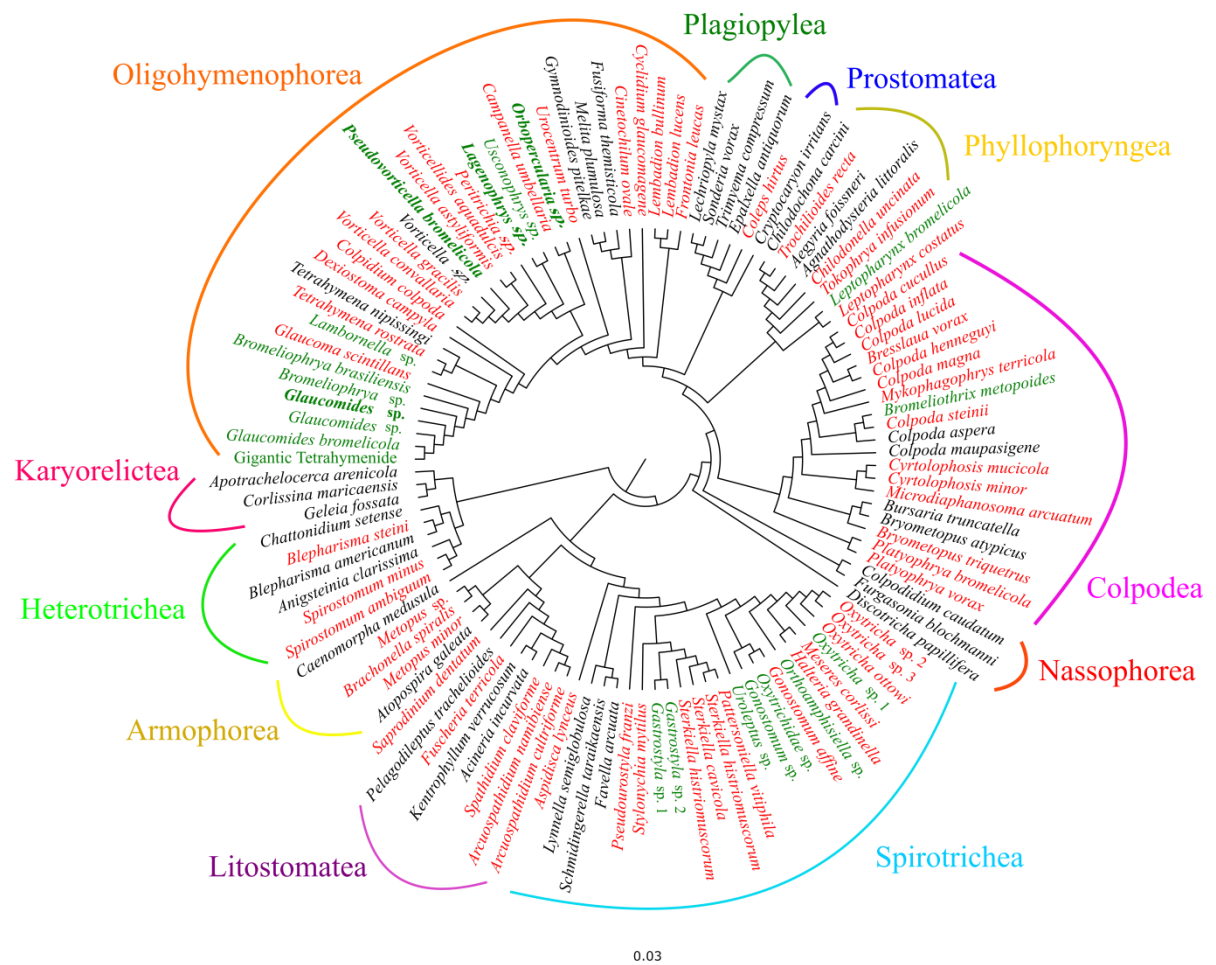
Figura 4. Rede de interação entre espécies de ciliados e bromélias do Parque estadual de Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil.

3.3. Caracterização molecular e posição filogenética

3.3.1. Inventário de ciliados em fitotelmos

A árvore filogenética do inventário (Figura 5) gerada com as sequências de 18S rDNA dos ciliados obtidas nesse estudo e outros ciliados que já foram observados em tanques de bromélias. As sequências de *Lagenophrys* sp., *Orbopercularia* sp., *Pseudovorticella bromelicola* e *Glaucoides* sp. se agruparam dentro da classe Oligohymenophorea, que apresentam maior número de representantes do filo Ciliophora em ambientes fitotelmais.

Esta árvore filogenética demonstra que nos fitotelmos ocorrem espécies de ciliados pertencentes as nove das 11 classes do filo Ciliophora estabelecidas por Lynn (2008). Sendo necessário ressaltar que a classe Nassophorea engloba as espécies *Leptopharynx bromelicola* e *Leptopharynx bromeliophilus* que não se agruparam neste clado.



Ciliados encontrados apenas em fitotelmos

Ciliados encontrados em fitotelmos e em outros ambientes

Ciliados que ocorrem somente em outros ambientes

Figura 5. Árvore filogenética contendo espécies de ciliado (filo Ciliophora) que habitam tanques de bromélias. Reconstrução filogenética utilizando o método da máxima verossimilhança. Classificação taxonômica segundo Lynn (2008). As seqüências obtidas no presente trabalho estão em negrito.

3.3.2. *Glaucoides* sp. e sua posição filogenética

A árvore filogenética da ordem Hymenostomatida (Figura 6), mostra a seqüência do gênero *Glaucoides*, obtida a partir de amostras do conteúdo fitotelmal presente em tanques de bromélias do PEIB, se agrupando com outros membros da família Bromeliophryidae. A seqüência de *Glaucoides* sp. apresentou 1,4% de divergência genética em relação ao espécime de *Glaucoides bromelicola* (Ver anexo 1 - tabela 1), podendo se tratar de nova espécie do mesmo gênero.

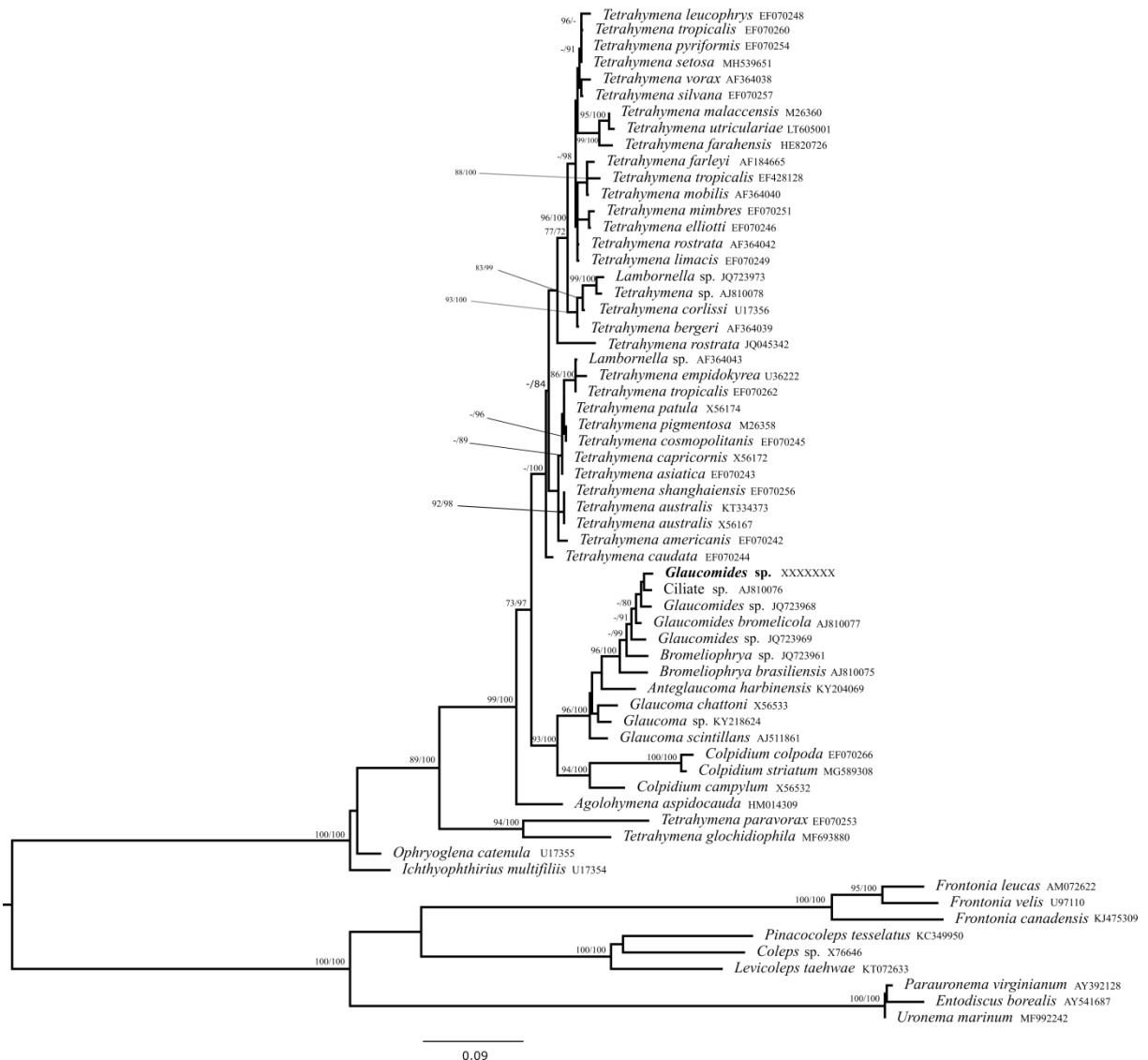


Figura 6. Árvore filogenética da ordem Hymenostomatida (classe Oligohymenophorea) mostrando o agrupamento da sequência de *Glaucomides sp.* dentro da família Bromeliophryidae. Reconstrução filogenética utilizando o método da máxima verossimilhança e valores de suporte de nós: ML bootstraps/BI. Valores < 70 são mostrados como ‘-’ (Valores não mostrados quando ambos foram < 70). A sequência obtida no presente trabalho está em negrito. Como outgroup nesta análise utilizamos os representantes das ordens Peniculida, Philasterida, Prorodontida (Classe Prostomatea).

3.3.3. Ciliados peritríqueos

A árvore filogenética contendo representantes da subclasse Peritrichia (Figura 7) inclui novas sequências obtidas no presente estudo. *Pseudovorticella bromelicola* se agrupou em clado contendo representantes da família Vorticellidae, apresentando 99,8% de identidade no 18S rDNA com *Pseudovorticella sp.* (KU363284) e 99,7% de identidade com *Vorticella sp.* (DQ868349) (ver tabela de divergência no material suplementar).

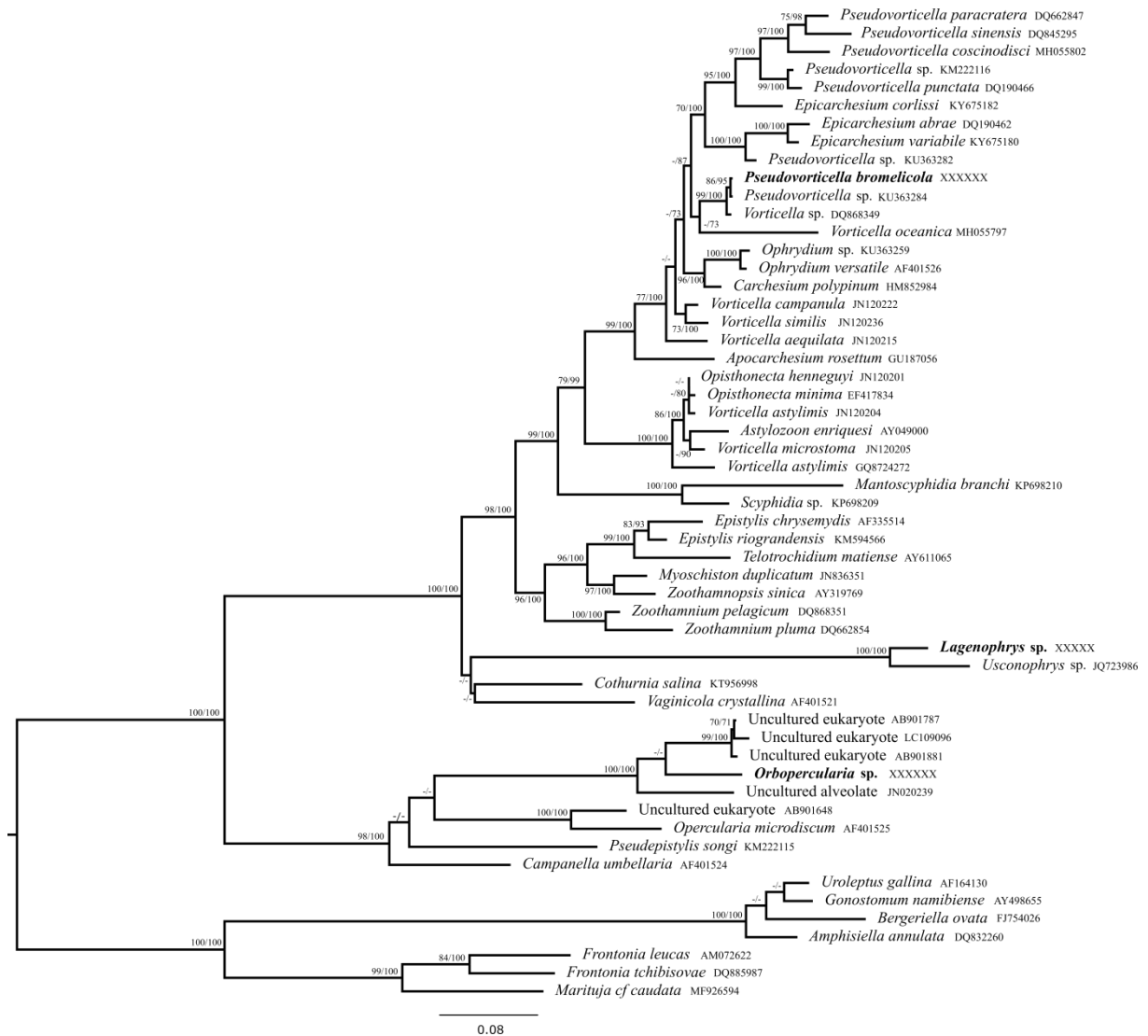


Figura 7. Árvore filogenética da subclasse Peritrichia. Reconstrução filogenética utilizando o método da máxima verossimilhança e valores de suporte de nós: ML bootstraps/BI. Valores < 70 são mostrados como ‘-’. Sequências obtidas no presente trabalho estão em negrito. Como outgroup nesta análise utilizamos os representantes das ordens Peniculida, Urostylida (Classe Spirotrichea).

Lagenophrys sp. (família Lagenophryidae) permaneceu em um ramo isolado (com valor de suporte de 100/100), tendo como clado irmão a sequência de *Usconophrys* sp. (família Usconophryidae), sendo que a divergência genética entre estas sequências foi de 3,4%. *Orbopercularia* sp. (família Operculariidae), permaneceu em um clado contendo sequência desconhecidas, denominadas “Uncultured eukaryote” que provavelmente pertencem a ciliados da família Operculariidae, apresentando uma divergência média de 4,8% (ver anexo 1 – tabela 2 e 3).

3.3.4. Morfotipos de *Lambornella*

A árvore filogenética com sequências do gene COI de representantes da classe Oligohymenophorea (Figura 8) mostram as sequências dos morfotipos de *Lambornella* se agrupando entre sequências de ciliados do gênero *Tetrahymena*. Além disso, os três morfotipos se separam em dois grupos, onde *Lambornella* sp. 1 se agrupou com *Lambornella* sp. 2 e o morfotipo *Lambornella* sp. 3 ficou como grupo irmão dos demais.

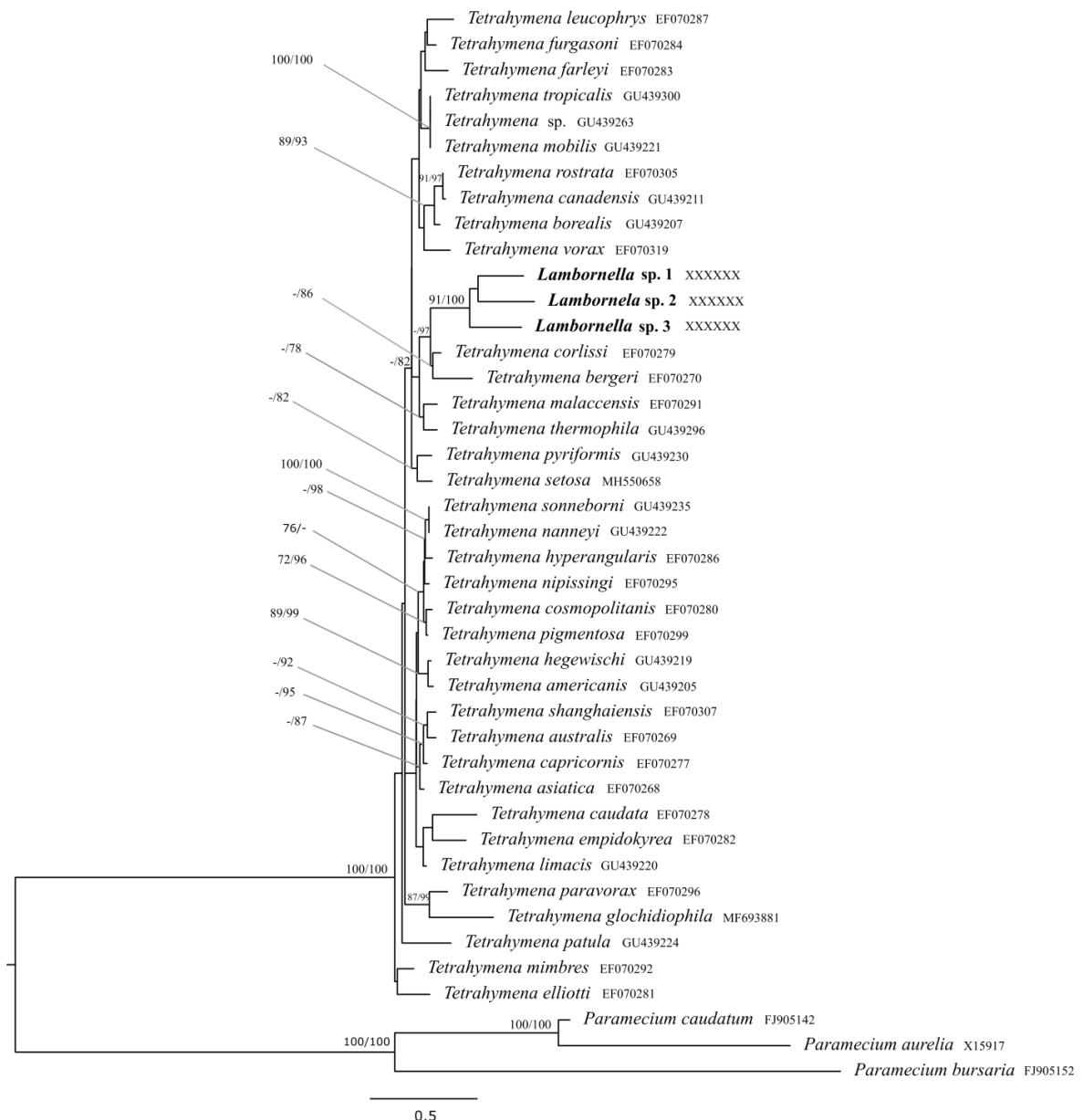


Figura 8: Árvore filogenética da classe Oligohymenophorea contendo as sequências dos três morfotipos do gênero *Lambornella*. Reconstrução filogenética utilizando o método da máxima verossimilhança e valores de suporte de nós: ML bootstraps/BI. Valores < 70 são mostrados como ‘-’ (Valores não mostrados quando ambos foram < 70). As sequências obtidas no presente trabalho estão em negrito. Como outgroup nesta análise utilizamos os representantes das ordens Peniculida.

4. Discussão

4.1. Diversidade de ciliados bromelícolas

A riqueza de ciliados fitotelmais encontrada no PEIB pode ser considerada baixa quando comparada a outros trabalhos de inventários. Contudo, a proporção de espécies que ocorrem apenas em tanques de bromélia foi de 72.7%, aparentemente maior que em outros locais já estudados por Foissner *et al.* (2003) que analisaram áreas de Floresta Atlântica, encontrando 92 espécies de ciliados (31% exclusivas de ambientes fitotelmais), Dunthorn *et al.* (2012) que identificaram 33 espécies em tanques de bromélia na Jamaica (58% exclusivas de ambientes fitotelmais) e Dúran-Ramírez *et al.* (2015) que encontraram 61 espécies (22.2% ocorriam apenas em bromélias). No presente estudo, acredita-se que as características da região, tais como sua fitofisionomia e o gradiente altitudinal do relevo, formem uma barreira natural que dificulta a chegada de mais espécies de ciliados aos tanques de bromélias por dispersão.

Estudos com ciliados em ambientes fitotelmais realizados por Dunthorn *et al.* (2012) relataram que em tanques de bromélias não foram encontrados ciliados das classes Armophorea, Plagiopylea e Karyorelictea. Contudo, Buosi *et al.* (2015) observaram representantes da classe Armophorea habitando bromélias na margem esquerda do Rio Paraná no Brasil. Mais recentemente, estudos com metabarcoding mostraram a presença de ciliados da classe Plagiopylea em tanques de bromélias (SIMÃO *et al.*, 2017) ressaltando a importância de estudos moleculares para a ampliação do conhecimento sobre a diversidade de ciliados. Além disso, o número limitado de sequência de ciliados endêmicos de tanques de bromélias disponíveis nos bancos de dados utilizados nesta árvore ressalta a necessidade da aquisição de novas sequências.

Embora a classificação do filo Ciliophora utilizada neste estudo tenha sido baseado na proposta por Lynn (2008), estudos mais recentes tem mostrado a existência de novas classes dentro deste filo (GAO *et al.*, 2016, FERNANDES *et al.*, 2018). Um dado interessante é que na árvore do inventário (Figura 5), a sequência de *Saprodinium dentatum* não se agrupou em nenhuma das 11 classes. Esse fato pode ser explicado pelo trabalho de Fernades *et al.* (2018) que apresenta a classe Odontostomatea, na qual *Saprodinium dentatum* pertenceria.

O tetrahymenídeo gigante observado no PEIB (Figura 3.P) é semelhante ao encontrado por Foissner *et al.* (2003) em tanques de bromélias do Equador e República Dominicana. Tal espécie ainda não foi descrita, mais dados moleculares indicam que seja um ciliado do gênero *Tetrahymena* (Tetrahymenidae: Hymenostomatida). Além disso, o fato desse ciliado ter sido

observado apenas em tanques de bromélias sugere que se trata de uma espécie endêmica desse microambiente, um possível *flagship ciliate* (FOISSNER, 2006) de ambientes fitotelmais. Contudo, há a necessidade da descrição detalhada dessa espécie e de mais estudos de inventários taxonômicos para elucidar essa questão.

Ciliados da subclasse Peritrichia foram observados em relações epibióticas com invertebrados diversos. *Pseudovorticella bromelicola* foi encontrada aderida na carapaça de ostracodas (Figura 3.N,O), o mesmo foi observado com *Lagenophrys* sp. (Figura 3.C) e *Orbopercularia* sp. (Figura 3.L). A relação ecológica de hiperforesia entre *Lagenophrys* sp., ostracodas e anuros já havia sido relatada por Sabagh *et al.* (2011). *Lagenophrys* sp. e *Orbopercularia* sp. também foram observados estabelecendo relações de epibiose com ácaros. Todas essas relações de epibiose precisam ser estudadas mais a fundo, considerando que o potencial de dispersão dos ciliados peritríqueos em tanques de bromélias pode ser influenciado pela dispersão de ostracodas aderidos ao corpo de anuros (LOPEZ *et al.*, 1999, 2005) e de ácaros aderidos ao corpo de aves (GARCÍA-FRANCO *et al.*, 2001) e abelhas (GUERRA *et al.*, 2010).

A ampliação do conhecimento sobre a distribuição geográfica de espécies de ciliados endêmicas de tanques de bromélias como *Pseudovorticella bromelicola* e do tetrahymenídeo gigante comprova que a ampliação da amostragem é extremamente necessária e um grande desafio para compreendermos a diversidade de ciliados que habitam tanques de bromélias (DUNTHORN *et al.*, 2012). As estimativas atuais sobre a diversidade de ciliados sugerem que 90% das espécies que ocorrem na natureza ainda não foram identificadas (DORIGO *et al.*, 2005; FOISSNER *et al.*, 2007) devido a dificuldade em isolar e estabelecer esses ciliados em meios de cultura (KHER *et al.*, 2011). Essa limitação pode ser verificada na riqueza de espécies de ciliados endêmicas de ambientes fitotelmais identificadas (ver Tabela 1- Revisão de Literatura) e no número de sequências disponíveis nos bancos de dados. Sendo assim, o acréscimo das quatro sequências de 18S rDNA para os ciliados *Pseudovorticella bromelicola*, *Glaucoides* sp., *Lagenophrys* sp. e *Orbopercularia* sp. obtidas nesse trabalho são uma contribuição significativa para o conhecimento da diversidade de ciliados que compõe a microbiota de ambientes fitotelmais. Além disso, essas sequências mostram a possibilidade da utilização de abordagens moleculares na delimitação de espécies.

A família Bromeliophryidae é composta pelos gêneros *Bromeliophrya* e *Glaucoides*, sendo que ambos os gêneros apresentam espécies que são consideradas endêmicas de tanques de bromélias (DUNTHORN *et al.*, 2012). O gênero *Glaucoides* atualmente é composto pela espécie *G. bromelicola* encontrada em tanques de bromélias na República Dominicana

(FOISSNER, 2013) e *Glaucoides* spp. observada em tanques de bromélias na Jamaica (Dunthorn *et al.*, 2012). Os dados moleculares apontam que a espécie do gênero *Glaucoides* observada habitando tanques de bromélias do PEIB pode ser uma nova espécie. Entretanto, estudos morfológicos mais detalhados são necessários para identificar a espécie que encontramos e qual a sua relação com os demais membros do gênero. O que sabemos até então é que as reconstruções filogenéticas mostram a sequência de *Glaucoides* sp. encontrada no presente estudo se agrupou com a sequência (AJ810076) de um ciliado encontrado por Foissner *et al.* (2003) apontado como um possível novo gênero da família Bromeliophryidae. Entretanto, as características morfológicas apontam que possivelmente se trata de uma espécie de gênero *Glaucoides*. Como a espécie encontrada na República Dominicana não foi descrita em um novo gênero, provavelmente se trata de mais uma espécie do gênero *Glaucoides*, que permanece como um táxon válido com o potencial acréscimo de duas espécies.

4.2. Filogenia dos morfotipos de *Lambornella*

No presente estudo foram observados três morfotipos identificados como pertencentes ao gênero *Lambornella*. Esses morfotipos parecem ser distintos entre si e diferentes da espécie *Lambornella trichoglossa* descrita por Foissner (2003a) em tanques de bromélias. As três linhagens de *Lambornella*, as quais correspondem aos três morfotipos observados em tanques de bromélias do PEIB formaram um agrupamento dentro do clado *Tetrahymena*. Desde sua criação, o gênero *Lambornella* teve a sua validade contestada (CORLISS, 1960; STRÜDER-KYPKE *et al.*, 2011) e análises filogenéticas atuais utilizando o gene COI (presente estudo) e o gene ribossomal 18S-rDNA (DUNTHORN *et al.*, 2012) indicam que o gênero *Lambornella* aparentemente possa ser uma sinonímia do gênero *Tetrahymena*. Observando a árvore filogenética gerada (Figura 8), verifica-se a presença de uma subdivisão do agrupamento em dois ramos distintos devido a uma acentuada divergência entre os morfotipos, indicando que pode se tratar de pelo menos duas espécies diferentes.

Observações morfológicas iniciais apontam que os três morfotipos poderiam ser um polimorfismo da espécie *Lambornella trichoglossa* ou espécies crípticas. Embora a análise morfológica superficial possa sugerir a presença de espécimes polimórficos de *L. trichoglossa*, as elevadas distâncias genéticas observadas para os COI destes morfotipos (~15%) em comparação com o descrito para outras espécies de Tetrahymenidae (CHANTANGSI *et al.*, 2007), sugerem que os 3 morfotipos devam representar espécies

distintas. Espécies de ciliados consideradas crípticas, geralmente apresentam características morfológicas indistinguíveis e são geneticamente diferentes, como ocorre com a espécie *Carchesium polypinum* (GENTEKAKI & LYNN, 2009, 2010, 2012). No caso dos três morfotipos do gênero *Lambornella* encontrados no PEIB, uma análise morfológica mais profunda possivelmente revelará características morfológicas que podem distingui-los, corroborando com os dados moleculares. Nossos resultados sugerem que nenhum dos três morfotipos seja a espécie *L. trichoglossa* e que possivelmente representem três espécies novas. Contudo, um estudo taxonômico mais detalhado, com caracterização morfológica e ontogenética, deve ser realizados para elucidação desta questão.

4.3. Especificidade em fitotelmos

Ao analisarmos as amostras coletadas em tanques de 261 bromélias de 15 espécies distribuídas pelo PEIB, foi possível observar ciliados como a *Lambornella* sp. 1 habitando tanques de 11 espécies de bromélias, enquanto que *Orbopercularia* sp. e *Lambornella* sp. 3 apresentaram uma distribuição mais restrita, ocorrendo em apenas duas espécies de bromélias. Com relação à riqueza de ciliados encontrada nas espécies de bromélia, enquanto *Nidularium ferdinadocoburgii* continha 9 táxons de ciliados em seus tanques, as espécies de bromélias *Billbergia distachia*, *Vriesea hoehneana* e *Wittrockia gigantea* abrigaram apenas duas espécies de ciliados. Ou seja, diferentes espécies de bromélias podem fornecer um ambiente propício para o estabelecimento de uma mesma espécie de ciliado, sendo possível afirmar que não existe especificidade entre ciliados e bromélias no PEIB. O presente estudo, com análise em ampla área amostral e expressivo número de espécies de bromélias analisadas, constitui importante contribuição para entendimento desta baixa especificidade.

Outros autores já apontaram que a espécie de bromélia não é um fator determinante para a ocorrência de ciliados em tanques de bromélias (DUNTHORN *et al.*, 2012; DURÁN-RAMÍREZ *et al.*, 2015). Trabalhos ecológicos relacionados à fauna associada a tanques de bromélias apontam que as comunidades fitotelmais são influenciadas por outros fatores, como a disponibilidade de matéria orgânica, incidência de luz solar, produção bacteriana, localização da bromélia (planta terrestre ou epífita) e o tamanho do tanque (HAUBRICH, 2009; BROUARD *et al.*, 2012; CARRIAS *et al.*, 2012).

A espécie *Aechmea phanerophlebia* é um exemplo interessante de como indivíduos de uma mesma espécie de bromélia, mas localizados em áreas diferentes, podem apresentar a taxocenose de ciliados totalmente diferente. Ao analisarmos amostras desta espécie no ponto P06, nenhuma espécie de ciliado foi observada. Enquanto isso, amostras de *A.*

phanerophlebia coletadas no ponto P05 apresentaram oito espécies de ciliado. Isso mostra que a mesma espécie de bromélia pode abrigar uma taxocenose de ciliados diferente de acordo com o ambiente onde está localizada. É possível que essas diferenças entre bromélias da mesma espécie sejam devidas a variações nas condições ambientais presentes em seus tanques. Entretanto, novos estudos são necessários para se compreender quais fatores atuam sobre estrutura da comunidade de ciliados que habitam ambientes fitotelmais.

4.4. Ciliados bromelícolas e a conservação

Assim como outras áreas montanhosas, o Parque Estadual do Ibitipoca é uma região importante para a conservação da biodiversidade, sendo indicada como área prioritária para realização de inventários (MARTINELLI, 2007). Classificado por Costa *et al.* (1998) na categoria de “Importância Biológica Extrema” e por Drummond *et al.* (2005) na categoria de “Importância Biológica Especial”, a região se destaca por apresentar um mosaico de fitofisionomias características que englobam desde florestas nebulares até savanas arbustivas ou arbustivo-arbóreas e campinas (OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2013), além de abrigar uma alta diversidade de espécies vegetais e animais.

O presente estudo fornece dados sobre os microeucariotos ciliados que mostram a presença de espécies endêmicas e potenciais espécies novas em ambiente fitotelmais presentes nas bromélias da região. Dentre as espécies de bromélias estudadas, seis estão enquadradas em alguma categoria de ameaça de extinção em listas regionais ou nacionais. *Neoregelia ibitipocensis* (Leme) Leme é endêmica das nanoflorestas nebulares da Serra da Mantiqueira, sendo classificada como “Criticamente em Perigo” na lista das espécies da flora ameaçada de extinção do Estado de Minas Gerais (DRUMMOND *et al.* 2008). Ainda nesta avaliação regional, *Nidularium marigoii* Leme e *Vriesea hoehneana* L.B.Sm. foram classificadas na categoria “Vulnerável”. *Neoregelia oligantha* L.B.Sm. ocorre exclusivamente no estado de Minas Gerais onde possui pequenas populações localizadas na região do Vale do Rio Doce e no Parque Estadual do Ibitipoca e na avaliação nacional, a espécie está enquadrada na categoria “Vulnerável” (FORZZA *et al.*, 2013). Na mesma avaliação, *Vriesea cacuminis* L.B.Sm., com distribuição exclusiva para o estado de Minas Gerais e *Vriesea penduliflora* L.B.Sm., endêmica das nanoflorestas nebulares e campos de altitude da Serra da Mantiqueira estão classificadas como “Em Perigo”.

Os incêndios que assolam a região do Parque Estadual de Ibitipoca são identificados como a principal ameaça a estas espécies. Além disso, o pisoteio por turistas coloca em risco o desenvolvimento de algumas subpopulações (ex. *V. cacuminis*), uma vez que vivem

próximo às trilhas (FORZZA *et al.*, 2013). Os riscos que as espécies de bromélia correm ameaçam a microbiota presente a seus tanques. Destacamos aqui a necessidade de se estudar os microrganismos que habitam os tanques de bromélias e utilizá-los em programas de conservação da biodiversidade.

5. Conclusão

Concluimos que a realização de estudos taxonômicos e inventários da fauna de ciliados são importantes para ampliar o conhecimento sobre a diversidade desses microeucariotos. Embora o número de táxons de ciliados tenha sido menor que o encontrado em outras áreas, o PEIB apresenta espécies consideradas endêmicas de tanques de bromélias que podem nos auxiliar no entendimento de processos de dispersão, colonização e sucessão ecológica em microecossistemas fitotelmais. As sequências de 18S-rDNA e Citocromo Oxidase I obtidas irão enriquecer os bancos de dados e ajudar no reconhecimento da real diversidade do filo Ciliophora. Em um âmbito local, comprovamos que não há especificidade entre ciliados e bromélias, sendo necessários mais estudos para entender quais os filtros ecológicos que influenciam a ocorrência dos ciliados em tanques de bromélias. Por fim, diante do cenário de ameaças que varias espécies de bromélias se encontram e que esse risco também afeta a microbiota associada, destacamos aqui a necessidade de se estudar os microeucariotos ciliados que habitam os tanques de bromélias e utilizá-los em programas de conservação da biodiversidade.

6. Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, Fernando Flávio Marques de & CARNEIRO, Celso Dal Ré. Origem e evolução da Serra do Mar. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 28, n. 2, p. 135-150, 2017.
- BENZING, D. H.; DERR, J. A.; TITUS, J. E. The water chemistry of microcosms associated with the bromeliad *Aechmea bracteata*. **American Midland Naturalist**, p. 60-70, 1972.
- BROUARD, Olivier et al. Understorey environments influence functional diversity in tank-bromeliad ecosystems. **Freshwater Biology**, v. 57, n. 4, p. 815-823, 2012.
- BRUIJNZEEL, Leendert Adriaan; SCATENA, Frederick N.; HAMILTON, Lawrence S. (Ed.). Tropical montane cloud forests: science for conservation and management. **Cambridge University Press**, 2011.
- BUBB, Philip *et al.* Cloud forest agenda. Cambridge: **PNUMA-CMVC**, 2004. 32p.
- BUOSI Paulo *et al.* Effects of seasonality and dispersal on the ciliate community inhabiting bromeliad phytotelmata in riparian vegetation of a large tropical river. **Journal of Eukaryotic Microbiology** 62: 737–749, 2015.
- CARRIAS, Jean-François; CUSSAC, Marie-Eve; CORBARA, Bruno. A preliminary study of freshwater protozoa in tank bromeliads. **Journal of Tropical Ecology**, v. 17, n. 4, p. 611-617, 2001.
- CARRIAS, Jean-François *et al.* An ant–plant mutualism induces shifts in the protist community structure of a tank-bromeliad. **Basic and Applied Ecology**, v. 13, n. 8, p. 698-705, 2012.
- CETEC. Diagnóstico ambiental do estado de Minas Gerais. **Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 1983.
- CHANTANGSI, Chitchai et al. Barcoding ciliates: a comprehensive study of 75 isolates of the genus *Tetrahymena*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2412-2423, 2007.
- CORLISS, John O. *Tetrahymena chironomi* sp. nov., a ciliate from midge larvae, and the current status of facultative parasitism in the genus *Tetrahymena*. **Parasitology**, v. 50, n. 1-2, p. 111-153, 1960.
- COSTA, Cláudia Maria Rocha; HERMANN, Gisela; MARTINS, Cássio Soares. Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação. In: **Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação**. Fundação Biodiversitas, 1998.
- DIAS, Roberto Pedroso Dias. **Taxonomia, morfologia e filogenia molecular de representantes das subclasses Peritrichia Stein, 1859 e Mobilida Kahl, 1933 (Protista, Ciliophora, Oligohymenophorea) de ecossistemas do sudeste brasileiro**. 337 f. Tese (Doutorado em Zoologia) Museu Nacional – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- DORMANN, Carsten F. et al. Indices, graphs and null models: analyzing bipartite ecological networks. **The Open Ecology Journal**, v. 2, n. 1, 2009.

- DORIGO, Ursula; VOLATIER, Laurence; HUMBERT, Jean-François. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. **Water Research**, v. 39, n. 11, p. 2207-2218, 2005.
- DRUMMOND, Gláucia Moreira et al. Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação. **Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas**, v. 2, 2005.
- DRUMMOND, G. M. et al. Listas vermelhas das espécies da fauna e da flora ameaçadas de extinção em Minas Gerais. **Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas. CD-Rom**, 2008.
- DUARTE, Gisele Silva Costa *et al.* Flagellate protist abundance in phytotelmata of *Aechmea distichantha* Lem.(Bromeliaceae) in the upper Paraná river basin. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 35, n. 4, 2013.
- DUNTHORN, Micah *et al.* Diversity and endemism of ciliates inhabiting Neotropical phytotelmata. **Systematics and Biodiversity**, iFirst, p. 1–11, 2012.
- DURÁN-RAMÍREZ, Carlos Alberto *et al.* Free-living ciliates from epiphytic tank bromeliads in Mexico. **European Journal of Protistology**, v. 51, n. 1, p. 15-33, 2015.
- ESTEBAN, Genoveva F.; FINLAY, Bland J. Cryptic freshwater ciliates in a hypersaline lagoon. **Protist**, v. 154, n. 3-4, p. 411-418, 2003.
- 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.
- FARJALLA, Vinicius F. *et al.* Ecological determinism increases with organism size. **Ecology**, v. 93, n. 7, p. 1752-1759, 2012.
- FENCHEL, Tom; ESTEBAN, Genoveva F.; FINLAY, Bland J. Local versus global diversity of microorganisms: cryptic diversity of ciliated protozoa. **Oikos**, p. 220-225, 1997.
- FERNANDES, Noemi M. et al. Molecular phylogeny and comparative morphology indicate that odontostomatids (Alveolata, Ciliophora) form a distinct class-level taxon related to Armophorea. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 126, p. 382-389, 2018.
- 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. Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated Protozoa. **European Journal of Protistology**, v. 27, p. 313–330, 1991.
- 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. Morphology and ontogenesis of *Lambornella trichoglossa* nov. spec., a new tetrahymenid ciliate (Protozoa, Ciliophora) from Brazilian tank bromeliads (Bromeliaceae). **European Journal of Protistology**, v. 39, n. 1, p. 63, 2003a.

- FOISSNER, Wilhelm. Morphology and ontogenesis of *Bromeliophrya brasiliensis* gen. n., sp. n., a new ciliate (Protozoa: Ciliophora) from Brazilian tank bromeliads (Bromeliaceae). **Acta Protozoologica**, v. 42, n. 1, p. 55-70, 2003b.
- FOISSNER, Wilhelm. Biogeography and Dispersal of Micro-organisms: A Review Emphasizing Protists. **Acta Protozoologica**, n. 45, p. 111-136, mar. 2006.
- FOISSNER, Wilhelm; CHAO, Anne; KATZ, Laura A. Diversity and geographic distribution of ciliates (Protista: Ciliophora). In: **Protist Diversity and Geographical Distribution**. Springer, Dordrecht, p. 111-129, 2007.
- FOISSNER, Wilhelm *et al.* Morphological and molecular characterization of some peritrichs (Ciliophora: Peritrichida) from tank bromeliads, including two new genera: *Orborhabdostyla* and *Vorticellides*. **Acta Protozoologica**, v. 48, n. 4, p. 291, 2010.
- FOISSNER, Wilhelm. Description of *Glaucoides bromelicola* n. gen., n. sp. (Ciliophora, Tetrahymenida), a macrostome forming inhabitant of bromeliads (Bromeliaceae), including redescrptions of *Glaucoides scintillans* and *G. reniformis*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 137-157, 2013.
- FOISSNER, Wilhelm. An update of 'basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa'. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. 1, p. 271-292, 2014.
- FORZZA, Rafaela Campostrini *et al.* Bromeliaceae. In: Martinelli G & Moraes MA. **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Pp. 315-397, 2013.
- GARCÍA-FRANCO, José G.; BURGOA, Daniel Martínez; PÉREZ, Tila María. Hummingbird flower mites and *Tillandsia* spp. (Bromeliaceae): polyphagy in a cloud forest of Veracruz, Mexico. **Biotropica**, v. 33, n. 3, p. 538-542, 2001.
- GAO, Feng *et al.* The all-data-based evolutionary hypothesis of ciliated protists with a revised classification of the phylum Ciliophora (Eukaryota, Alveolata). **Scientific Reports**, v. 6, p. 24874, 2016.
- GENTEKAKI, Eleni .& LYNN, Denis H. High-level genetic diversity but no population structure inferred from nuclear and mitochondrial markers of the peritrichous ciliate *Carchesium polypinum* in the Grand River basin (North America). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 10, p. 3187-3195, 2009.
- GENTEKAKI, Eleni & LYNN, Denis H. Evidence for cryptic speciation in *Carchesium polypinum* Linnaeus, 1758 (Ciliophora: Peritrichia) inferred from mitochondrial, nuclear, and morphological markers. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 508-519, 2010.
- GENTEKAKI, Eleni & LYNN, Denis. Spatial genetic variation, phylogeography and barcoding of the peritrichous ciliate *Carchesium polypinum*. **European Journal of Protistology**, v. 48, n. 4, p. 305-313, 2012.
- GUERRA, T. J. *et al.* Phoretic dispersal on bumblebees by bromeliad flower mites (Mesostigmata, Melicharidae). **Insectes Sociaux**, v. 59, n. 1, p. 11-16, 2012.

- GUINDON, Stéphane & GASCUEL, Olivier. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, n. 5, p. 696-704, 2003.
- GUINDON, Stéphane *et al.* New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p. 307-321, 2010.
- HAUBRICH, Camilla S. *et al.* Bottom-up regulation of bacterial growth in tropical phytotelm bromeliads. **Hydrobiologia**, v. 632, n. 1, p. 347-353, 2009.
- KATOH, Kazutaka *et al.* MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 2, p. 511-518, 2005.
- KHER, Chandni P. *et al.* Barcoding *Tetrahymena*: discriminating species and identifying unknowns using the cytochrome c oxidase subunit I (cox-1) barcode. **Protist**, v. 162, n. 1, p. 2-13, 2011.
- KITCHING, R. L. Food webs in phytotelmata: “bottom-up” and “top-down” explanations for community structure. **Annual Review of Entomology**, v. 46, n. 1, p. 729-760, 2001.
- KÖPPEN, Wladimir. Das geographische System der Klimate – handbuch der klimatologie. Vol. 1. Part C. Berlin: **Gebr. Bornträger Verlag**, p. 388, 1948.
- KRATINA, Pavel *et al.* Environmental control of the microfaunal community structure in tropical bromeliads. **Ecology and Evolution**, v. 7, n. 5, p. 1627-1634, 2017.
- LAESSLE, Anthony. A micro-limnological study of Jamaican bromeliads. **Ecology**, n. 42, p. 499-517, 1961.
- LOPEZ, Luiz Carlos Serramo; RODRIGUES, Pablo JF Pena; RIOS, Ricardo Iglesias. Frogs and Snakes as Phoretic Dispersal Agents of Bromeliad Ostracods (Limnocytheridae: Elpidium) and Annelids (Naididae: Dero) 1. **Biotropica**, v. 31, n. 4, p. 705-708, 1999.
- LOPEZ, Luiz Carlos Serramo *et al.* Phoretic behaviour of bromeliad annelids (Dero) and ostracods (Elpidium) using frogs and lizards as dispersal vectors. **Hydrobiologia**, v. 549, n. 1, p. 15-22, 2005.
- LUDWIG, Wolfgang *et al.* ARB: a software environment for sequence data. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 4, p. 1363-1371, 2004.
- LUTHER, Hillebrand. **An alphabetical list of bromeliadbinomials**. 11^a edição. Sarasota: TheMarie Selby Botanical Gardens, 2008.
- LYNN, Denis H. **The Ciliated Protozoa**. 3^a edição. Guelph, Canadá: Springer, 2008. 605p.
- MAGUIRE, Basset-Jr. The exclusion of Colpoda (Ciliata) from superficially favorable habitats. **Ecology** 44, 781-784, 1963.
- MAGUIRE, Basset-Jr. Phytotelmata: biota and community structure determination in plantheld waters. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Vol. 2, p. 439-464, 1971.
- MARINO, Nicholas AC *et al.* Habitat size determine algae biomass in tank-bromeliads. **Hydrobiologia**, v. 678, n. 1, p. 191-199, 2011.

- MARTINELLI, G. Gefährdete Raritäten. Bromelien im Atlantischen Regenwald. **Spektrum der Wissenschaft**, v. 6, p. 66-73, 2000.
- MARTINELLI, Gustavo. Mountain biodiversity in Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 30, n. 4, p. 587-597, 2007.
- MEDLIN, Linda *et al.* The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. **Gene**, v. 71, n. 2, p. 491-499, 1988.
- MODEO, Letizia *et al.* Morphological, ultrastructural, and molecular characterization of *Euplotidium rosati* n. sp.(Ciliophora, Euplotida) from Guam. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 25-36, 2013.
- MOREIRA, Breno *et al.* Phanerogamic flora and phytogeography of the Cloud Dwarf Forests of Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 18, n. 2, 2018.
- OLIVEIRA-FILHO, Ary Teixeira. Classificação das fitofisionomias da América do Sul cisandina tropical e subtropical: proposta de um novo sistema – prático e flexível – ou uma injeção a mais de caos? **Rodriguésia** 60(2): 237 – 258, 2009.
- OLIVEIRA-FILHO, Ary Teixeira de *et al.* O mosaico de fitofisionomias do Parque Estadual do Ibitipoca. In: Forzza, R.C.; Menini Neto, L.; Salimena, F.R.G. & Zappi, D. (orgs.). **Flora do Parque Estadual do Ibitipoca e seu entorno**, Juiz de Fora. Pp. 53-93, 2013.
- OKSANEN, Jari *et al.* vegan: Community ecology package. **R package version 2.5-2.**, 2018.
- PICADO, Carl. Les broméliacees épiphytes: considérées comme milieu biologique. **Bull. scientist fr. Belgium**, n. 47, p. 215–360, 1913.
- PRUESSE, Elmar; PEPLIES, Jörg; GLÖCKNER, Frank Oliver. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. **Bioinformatics**, v. 28, n. 14, p. 1823-1829, 2012.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing 3.4.0. Vienna, Austria: **Foundation for Statistical Computing**, 2018.
- RAMBAUT, Andrew *et al.* FigTree: Tree figure drawing tool, v1. 4.2. **Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh**, 2012.
- RATNASINGHAM, Sujeevan & HEBERT, Paul DN. BOLD: The barcode of life data system (<http://www.barcodinglife.org>). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007.
- RODELA, Luciana Graci & TARIFA, José Roberto. The climate of Serra do Ibitipoca, southeast of Minas Gerais State. **GEOUSP: Espaço e Tempo (Online)**, n. 11, p. 101-113, 2002.
- RONQUIST, Fredrik *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539-542, 2012.
- 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.
- SIMÃO, Taiz LL *et al.* Characterization of ciliate diversity in bromeliad tank waters from the Brazilian Atlantic Forest. **European Journal of Protistology**, v. 61, p. 359-365, 2017.

SONNEBORN, T.M. Breeding systems, reproductive methods and species problems in Protozoa. In *The Species Problem* (E. Mayr, ed.) Amer. **Association for the Advancement of Science**, Washington, p.155-324. 1957

STAMATAKIS, Alexandros. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, v. 22, n. 21, p. 2688-2690, 2006.

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.

VANDERMEER, John *et al.* Observations of *Paramecium* occupying arboreal standing water in Costa Rica. **Ecology**, v. 53, n. 2, p. 291-293, 1972.

VASCONCELOS, Marcelo Ferreira de. O que são campos rupestres e campos de altitude nos topos de montanha do Leste do Brasil?. **Brazilian Journal of Botany**, v. 34, n. 2, p. 241-246, 2011.

Considerações Finais

A presente dissertação trouxe novas informações sobre a ocorrência e distribuição dos ciliados em ambientes fitotelmais de tanques de bromélias. Diante da necessidade de se ampliar o número de sequências de ciliados que habitam os fitotelmos, obtivemos quatro novas sequências, sendo três delas de possíveis espécies novas: *Lagenophrys* sp., *Glaucoides* sp. e *Orbopercularia* sp. Contudo, estudos morfológicos mais aprofundados são necessários.

A presença de três morfotipos do gênero *Lambornella*, que também podem ser espécies novas, mostram que a diversidade de ciliados conhecida atualmente é inferior ao número real de espécies que ocorrem na natureza. Sendo necessário aumentar o esforço amostral em diferentes ambientes para melhorar nosso entendimento sobre esse tema. Além disso, nosso estudo mostrou a eficácia do marcador molecular Citocromo Oxidase I em análises filogenéticas envolvendo representantes do gênero *Lambornella*.

Por fim, verificamos que em um âmbito local não há especificidade entre ciliados e bromélias. No entanto, é prematuro afirmar que isso ocorra em toda a região neotropical. Com o aumento da amostragem, abrangendo diferentes ambientes e espécies de bromélias, essa resposta poderá ser alcançada.

Os estudos sobre a diversidade de ciliados, anteriormente pautados em características morfológicas, precisam abranger novas áreas como a ecologia e biologia molecular, utilizando ferramentas diversas e complementares para gerar dados mais robustos e com possibilidade de ajudar a responder as diversas questões que ainda pairam sobre o campo da ciliatologia.

Referências Bibliográficas

- ADL, Sina M. *et al.* The revised classification of eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 429-514, 2012.
- ANDREOLI, Ilaria *et al.* Filogenia molecular de Karyorelictea incurável (Alveolata, Ciliophora). **Zoologica Scripta**, v. 38, n. 6, p. 651-662, 2009.
- BALDAUF, Sandra L. An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 46, n. 3, p. 263-273, 2008.
- CHEN, Xiao *et al.* Molecular data suggests the ciliate *Mesodinium* (Protista: Ciliophora) might represent an undescribed taxon at class level. *动物分类学报*, v. 40, n. 1, p. 31-40, 2015.
- HALFELD, Vítor Ribeiro *et al.* Caracterização morfológica e molecular de microeucariotos ciliados (Alveolata, Ciliophora) encontrados em ambientes pouco explorados. Dissertação (Mestrado em Zoologia) Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014. 67f.
- JACQUES-FÉLIX, Henri. The discovery of a bromeliad in Africa: *Pitcairnia feliciana*. **Selbyana**, p. 118-124, 2000.
- FOISSNER, Wilhelm & WOLF, Klaus W. Morphology and ontogenesis of *Platyophrya bromelicola* nov. spec., a new macrostome-forming colpodid (Protists, Ciliophora) from tank bromeliads of Jamaica. **European Journal of Protistology**, v. 45, n. 2, p. 87-97, 2009.
- FOISSNER, Wilhelm *et al.* Description of *Leptopharynx bromelicola* n. sp. and characterization of the genus *Leptopharynx* Mermod, 1914 (Protista, Ciliophora). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 134-151, 2011.
- FOISSNER, Wilhelm & STOECK, Thorsten. *Cotterillia bromelicola* nov. gen., nov. spec., a gonostomatid ciliate (Ciliophora, Hypotricha) from tank bromeliads (Bromeliaceae) with de novo originating dorsal kineties. **European Journal of Protistology**, v. 47, n. 1, p. 29-50, 2011.
- FOISSNER, Wilhelm & STOECK, Thorsten. Morphology of *Bromeliophrya quadristica* n. spec., an Inhabitant of Tank Bromeliads (Bromeliaceae), and Phylogeny of the Bromeliophryidae (Ciliophora, Tetrahymenida). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 223-234, 2013.
- OMAR, Atef *et al.* Description of *Leptopharynx bromeliophilus* nov. spec. and *Leptopharynx australiensis* nov. spec. (Ciliophora, Nassulida). **Acta Protozoologica**, v. 2011, n. 2, p. 89-103, 2011.
- ORSI, William *et al.* Class Cariacotrichea, a novel ciliate taxon from the anoxic Cariaco Basin, Venezuela. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1425–1433, 2012.
- PAWLOWSKI, Jan. The new micro-kingdoms of eukaryotes. **BMC Biology**, v. 11, n. 1, p. 40, 2013.
- SLEIGH, Michael. Protozoa and other Protists. **Chapman and Hall**, New York, 399p. 1988.

WEISSE, Thomas *et al.* Functional ecology of the ciliate *Glaucomides bromelicola*, and comparison with the sympatric species *Bromeliothrix metopoides*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 578-587, 2013.

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. 1997.

Anexo 1. Tabelas de divergências

Tabela 1. Tabela de divergência entre a sequência de *Glaucomides* sp. e representantes da família Bromeliophryidae

	AJ810075	JQ723961	JQ723969	AJ810077	JQ723968	<i>Glaucomides</i> sp.	AJ810076
AJ810075_ <i>Bromeliophrya brasiliensis</i>	0	1,5	1,6	1,4	1,3	1,5	1,5
JQ723961_ <i>Bromeliophrya</i> sp.	1,5	0	1,2	1,1	1,1	0,9	1,1
JQ723969_ <i>Glaucomides</i> sp. 2	1,6	1,2	0	0,7	1,1	0,9	1,1
AJ810077_ <i>Glaucomides bromelicola</i>	1,4	1,1	0,7	0	0,7	0,6	0,6
JQ723968 <i>Glaucomides</i> sp. 1	1,3	1,1	1,1	0,7	0	0,6	0,7
<i>Glaucomides</i> sp.	1,5	0,9	0,9	0,6	0,6	0	0,5
AJ810076_ <i>Ciliate</i> sp.	1,5	1,1	1,1	0,6	0,7	0,5	0
Minimum:	0.000000						
Maximum:	1.649.971						
Average:	0.882810						

Tabela 2. Tabela de divergência entre *Lagenophrys* sp. e *Usconophrys* sp.

	<i>Lagenophrys</i> sp.	JQ723986_ <i>Usconophrys</i> sp.
<i>Lagenophrys</i> sp.	0	3,4
JQ723986_ <i>Usconophrys</i> sp.	3,4	0
Minimum:	0.000000	
Maximum:	3.401.361	
Average:	1.700.680	

Tabela 3. Tabela de divergência entre *Orbopercularia* sp. e outros ciliados da subclasse Peritrichia

	AF401524	KM222115	AB901648	AF401525	JN020239	<i>Orbopercularia</i> sp.	AB901881	AB901787	LC109096
AF401524_ <i>Campanella umbellaria</i>	0	7,9	9,1	9,1	10,3	9,1	9,9	9,6	9,8
KM222115_ <i>Pseudepistylis songi</i>	7,9	0	9	9,5	11,1	11,2	11,6	11,5	11,6
AB901648_ Uncultured eukaryote	9,1	9	0	4,3	10,3	10,2	10,2	10,4	10,3
AF401525_ <i>Opercularia microdiscum</i>	9,1	9,5	4,3	0	10,9	11,4	11,3	11,4	11,3
JN020239_ Uncultured alveolate	10,3	11,1	10,3	10,9	0	5,7	5,6	5,5	5,6
<i>Orbopercularia</i> sp.	9,1	11,2	10,2	11,4	5,7	0	4,7	4,7	5,1
AB901881_ Uncultured eukaryote	9,9	11,6	10,2	11,3	5,6	4,7	0	0,4	0,8
AB901787_ Uncultured eukaryote	9,6	11,5	10,4	11,4	5,5	4,7	0,4	0	0,6
LC109096_ Uncultured eukaryote	9,8	11,6	10,3	11,3	5,6	5,1	0,8	0,6	0
Minimum:	0.000000								
Maximum:	11.606.511								
Average:	7.432.250								

Anexo 2. Método de impregnação por prata a seco (FOISSNER, 2014)

1. Pegue 5–10 lâminas limpas e espalhe uma camada muito fina de albumina no terço médio de cada um com a ponta do dedo. Secar por pelo menos 1 min.
2. Coloque uma gota de fluido contendo os ciliados no centro e espalhe com uma agulha (não toque na camada de albumina). Secar a preparação à temperatura ambiente.
3. Aplique algumas gotas de nitrato de prata no material seco por cerca de 5 - 15 min.

Observações: O tempo de reação varia de acordo com a espécie de ciliados.

4. Lave a lâmina por cerca de 3 s com água destilada e de novo.

Observações: Lave suavemente! Aplique corrente de água a partir do topo terço do escorregador inclinado para que a água escorra suavemente material seco. Deixe o lâmina inclinado durante a secagem.

5. Desenvolva previamente a lâmina seca, expondo-a por 5–60 segundos a Luz ultravioleta a uma distância de 3–10 cm.

Observações: Intensidade da impregnação é influenciada pelo tempo e distância.

6. Aplique algumas gotas de revelador na preparação seca por cerca de 60 s.
7. Enxague delicadamente a lâmina em água corrente por 5– 10 s, e mergulhe-o no fixador (tiosulfato de sódio) por 5 min.

Reagentes:

- a) Solução de nitrato de prata (estabilidade a longo prazo em frasco castanho)

- 1 g de nitrato de prata (AgNO_3)
- água destilada a 100 ml

- b) Desenvolvedor (estável por cerca de 1 a 3 dias)

- 20 ml de solução A
- 1 ml de solução B
- 1 ml de solução C

Solução A (estável por um ano em marrom garrafa)

- 1000 ml de água quente da torneira (cerca de 40°C)
- 10 g de ácido bórico (H_3BO_3)
- 10 g de bórax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)

- 5 g de hidroquinona ($C_6H_6O_2$)
- 100 g de sulfito de sódio anidro (Na_2SO_3)
- 2,5 g de metol5metilamino-fenol-sulfato ($(CH_3NHC_6H_4OH)_2 \cdot H_2SO_4$)

Solução B (estável por cerca de 6 meses quando armazenado em copos cheios)

- 100 ml de água destilada
- 0,4 g de metol5metilamino-fenol-sulfato ($(CH_3NHC_6H_4OH)_2 \cdot H_2SO_4$)
- 5,2 g de sulfito de sódio anidro (Na_2SO_3)
- 1,2 g de hidroquinona ($C_6H_6O_2$)
- 10,4 g de carbonato de sódio (Na_2CO_3)
- 10,4 g de carbonato de potássio (K_2CO_3)
- 0,4 g de brometo de potássio (KBr)

Solução C (estável por vários anos)

- 10 g de hidróxido de sódio (NaOH)
- água destilada a 100 ml

c) Fixador para impregnação (estável por anos)

- 50 g de tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)
- água destilada 1000 ml

Anexo 3. Método de Impregnação pelo Carbonato de Prata (Foissner, 1991)

1. Colocar 1 gotícula (aproximadamente 0,05 mL) de rica cultura contendo ciliados em um recipiente.
2. Adicionar 1-2 gotas de formalina 4% e deixar fixando por 1–3 minutos. Mexer o recipiente em movimentos circulares.

Observação: Para ciliados que apresentem película grossa: 3 minutos ou mais.

Para ciliados que apresentem película muito delgada: 1 minuto ou menos.

3. Adicionar 3 gotas da solução de Fernandez-Galiano.
4. Colocar o recipiente em uma placa aquecida a 60–80°C. A mistura torna-se marrom, cor de conhaque. Mexer em movimentos circulares, por aproximadamente 2-4 minutos. A impregnação pode ser controlada por meio de microscópio.

Observação: O controle da impregnação é difícil, pois o sucesso da coloração depende do tamanho das gotas utilizadas, da temperatura em que se encontra a placa aquecida, da espécie de ciliado.

5. Interrompa a impregnação no momento desejado removendo o recipiente da placa aquecida e adicionando 1 gota de Tiosulfato de Sódio.

Reagentes:

1. Para fixar os organismos:

- 0,1 mL de formalina 37%
- 10 mL de água destilada

2. Solução de Fernandez-Galiano:

Pode ser preparada imediatamente antes do uso. Os componentes devem ser adicionados na sequência indicada.

Deve ser armazenada em frasco marrom, ao abrigo da luz. Se armazenada adequadamente, pode ser utilizada por muitos anos.

- 0,3 mL de Piridina em concentração comercial
- 2-4 mL de Rio-Hortega (Carbonato de prata amoniacal)
- 0,8 mL de uma Solução de proteose peptona
- 16 mL de água destilada

3. Tiosulfato de Sódio:

- 2,5g de Tiosulfato de Sódio
- 100 mL de água destilada

4. Rio Hortega (Carbonato de prata amoniacal): As proporções são importantes!

- 50 mL de Nitrato de Prata Aquoso a 10% é colocado em um frasco
- 150 mL de carbonato de sódio a 5% são adicionados pouco a pouco.
- Uma solução de amônia a 25% é adicionada gota a gota até dissolver o precipitado. Tomar cuidado para não adicionar amônia em excesso.
- Completar o volume da solução com 750 mL de água destilada.

5. Proteose Peptona:

- 0,6 mL de água destilada
- 4g de Proteose Peptona
- 0,5 mL de formalina 37%

Anexo 4. Protocolo de extração de DNA com o Kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen).

1. Fixar os protozoários ciliados em álcool absoluto em um microtubo de 1,5 mL.
2. Precipitar os ciliados a aproximadamente 10.000 rpm por 10 minutos em centrífuga.
3. Retirar o máximo possível de álcool, de preferência tudo, esvaziando o conteúdo sobrenadante do microtubo numa saleira e verificar com o auxílio de um microscópio estereoscópio se não foram perdidos muitos espécimes.
4. Adicionar no microtubo 180 µL do tampão **ATL**.
5. Adicionar 20 µL da **Proteinase K** e misturar (utilize vortex®) por 10 segundos.
6. Incubar em banho-maria em temperatura de 56 °C por 1-2 horas.
7. Vortexar (utilize vortex®) por 15 segundos.
8. Adicionar 200 µL de tampão **AL**.
9. Incubar em banho-maria em temperatura de 56 °C por 10 minutos.
10. Adicionar 200 µL de **Etanol absoluto** e vortexar (utilize vortex®) por 15 segundos.

11. Retire todo o líquido do microtubo de 1,5 mL e coloque na coluna, exatamente sobre a membrana, cuidadosamente, evitando perfurá-la.
12. Centrifugue a 8.000 rpm por 1 minuto.
13. Jogue fora o líquido
14. Adicione 500 µL de tampão **AW1** sobre a membrana da coluna e centrifugue a 8.000 rpm por 1 minuto.
15. Jogue fora o líquido junto com o tubo coletor.
16. Adicione 500 µL de tampão **AW2** à membrana da coluna e centrifugue a 14.000 rpm por 3 minutos para secar a membrana. Jogue fora o tubo coletor junto ao líquido.
17. Centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos e jogue o líquido fora
18. Centrifugar (de novo) a 14000 rpm por 3 minutos e jogue o líquido fora
19. Coloque a coluna em um microtubo de 1,5 mL e coloque na coluna 50 µL do tampão **AE**. Deixe aguardando na bancada por 1 minuto e, após, centrifugue a 8.000 rpm por 1 minuto.
20. Guarde o microtubo de 1,5 mL com o DNA extraído dentro do freezer a -20 °C.