UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
Instituto de Pesquisa e Deenvolvimento

ADOLFO JOSÉ DA MOTA

GENOTIPAGEM POR SEQÜENCIAMENTO E PCR-RFLP DO DNA RIBOSSOMAL E VERIFICAÇÃO DA METODOLOGIA DE IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS FATORES DE VIRULÊNCIA EM SETE ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida*

São José dos Campos, SP.
2007

ADOLFO JOSÉ DA MOTA

GENOTIPAGEM POR SEQÜENCIAMENTO E PCR-RFLP DO DNA RIBOSSOMAL E VERIFICAÇÃO DA METODOLOGIA DE IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS FATORES DE VIRULÊNCIA EM SETE ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade do Vale do Paraíba como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Gorgônio da Nóbrega

São José dos Campos, SP.
2007

M871g

Mota, Adolfo José
Genotipágem por seqüenciamento e PCR- RFLP do DNA ribossomal e verificação da metodologia de identificação de possíveis fatores de virulência em sete espécies do gênero *Candida.* / Adolfo José Mota. São José dos Campos: UniVap, 2007.
1 disco laser, color

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2007.

1 Candida 2.Biologia Molecular 3. DNA Ribossômico 4. Análise de Sequência de DNA I. Nóbrega, Francisco Gogôrnio, Orient. II Título

CDU:616.934

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução parcial ou total desta Dissertação, desde que citada a fonte.

Aluno: Adolfo José da Mota

Data: 26/07/2007

"GENOTIPAGEM POR SEQUENCIAMENTO E PCR-RFLP DO DNA RIBOSSOMAL E VERIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS FATORES DE VIRULÊNCIA DE SETE ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida*"

Adolfo José da Mota

Banca Examinadora:

Profª. Dra. **JOSANE MITTMANN** (UNIVAP)_____

Prof. Dr. **FRANCISCO GORGÔNIO DA NÓBREGA** (UNIVAP)_____

Profª. Dra. **CRISTIANE YUMI KOGA-ITO** (UNESP)_____

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

Dedico à minha esposa Simone, e à minha filha Larissa que souberam perdoar minha ausência, apoiar-me nos momentos de indecisão, compartilhar meu entusiasmo, sorrir meu riso, sonhar meu sonho...

Agradecimentos

Permito-me um "clichê" ao agradecer a Deus, pelo dom da vida e compartilhar com as pessoas que amo um mundo tão maravilhoso, onde a cada novo dia há algo novo, um novo aprendizado...

Agradeço aos meus pais, Maria de Jesus e Olivério Mota, por terem me acolhido no seio de uma família que me amou desde a concepção, uma família maravilhosa que mesmo com todas as dificuldades me orientou pelo caminho do bem, da honestidade, do amor ao próximo, de respeitar, sobretudo, à vida. Como professores, me mostraram os valores do estudo, proporcionando sempre, uma oportunidade e um convite ao aprendizado.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Genética Molecular e Genomas, pelo auxílio, desde os tempos da iniciação científica que batizei de "meus primeiros erros".

Muito obrigado aso colaboradores e amigos Dra. Cristiane, Graziela Back e Edson Komiama da UNESP-SJC e à Professora Sônia Khouri da UNIVAP pela valiosa ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Agradeço ao Professor Dr. Mário Shimizo pode ter gentilmente cedido parte de sua coleção contendo várias espécies do gênero Candida e à Professora Dra Claudete de Paula da USP por ter fornecido algumas espécies que eram de nosso interesse.

Agradeço à Professora Dra. Marina Nóbrega, que aceitou meu estágio no Laboratório e desde a época da graduação não se furta aos debates ora desafiadores, ora encorajadores, mas, sempre pontuais em sua forma de ver a vida e interagir com a realidade que nos cerca.

Em especial agradeço ao Professor Dr. Francisco Gorgônio da Nóbrega, pessoa pela qual tenho grande admiração, por seu vasto conhecimento que faz com que consiga transmitir a complexa biologia de forma simples, por sua amizade que tem me amparado nos momentos mais difíceis e que, em alguns deles pensava em desistir, sua forma entusiasmada e verdadeiramente apaixonada por aquilo que faz me mostraram outras perspectivas e aos poucos fizeram com que eu passasse a acreditar em mim mesmo; agradeço por sua sinceridade, por sua honestidade e sobretudo, por sua generosidade. - Professor, sou profundamente grato pela oportunidade recebida, de estudar, aprender, conhecer, de realizar meu sonho...

"Não quero ter a terrível limitação de quem vive apenas do que é passível de fazer sentido. Eu não: quero é uma verdade inventada".

Clarice Lispector

GENOTIPAGEM POR SEQÜENCIAMENTO E PCR-RFLP DO DNA RIBOSSOMAL E VERIFICAÇÃO DA METODOLOGIA DE IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS FATORES DE VIRULÊNCIA EM SETE ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida*

RESUMO

As técnicas disponíveis em biologia molecular para identificação e diferenciação de espécies microbianas e mesmo sub-espécies, têm resultado, não apenas na geração de um grande volume de dados, mas também, em informações mais confiáveis. Neste trabalho identificamos, através do seqüenciamento de aproximadamente 600 bp do rDNA 28S, 39 isolados clínicos previamente classificados presuntivamente e 7 linhagens padrão ATCC. Cerca de 38 seqüências foram depositadas no GenBank. Subseqüente ao seqüenciamento foi realizada a análise por PCR-RFLP de 2800 bp do rDNA, uma metodologia simples que desenvolvemos e que se mostrou capaz de diferenciar as amostras em nível de espécie. Os 46 fungos identificados corresponderam a 7 espécies do gênero *Candida* (*C. albicans, C. dubliniensis, C. glabrata, C. tropicalis, C. guilliermondii, C. krusei e C. lusitaniae*) e uma espécie do gênero *Picchia* (*P. anomala*). A comparação entre as metodologias de identificação, molecular e presuntiva, mostrou que apenas 13 dos 39 isolados clínicos estavam corretamente identificadas pelos métodos fenotípicos. Adicionalmente, uma investigação do teste clássico de placa para secreção de fosfolipase, considerada um possível fator de virulência, revelou incertezas frente ao significado preciso dos resultados. Um teste de filamentação alternativo foi desenvolvido revelando a possível existência de fatores estimuladores e inibidores do soro no processo.

Palavras-chave: *Candida spp;* PCR, gene para o rDNA 28S ribossomal; seqüenciamento de DNA, genoma mitocondrial; regiões polimórficas; fosfolipase; filamentação

GENOTIPING BY SEQUENCING AND RFLP OF RIBOSSOMAL rDNA AND ASSESMENT OF ONE IDENTIFICATION METODOLOGY FOR PUTATIVE VIRULENCE FACTORS IN SEVEN SPECIES OF THE *Candida* GENERA

Abstract

The molecular biology techniques used of for the identification and differentiation of microbial species resulted in abundant data and also in information that is particularly trustworthy. In this work we identified, through the DNA sequencing of approximately 600 bp of rDNA 28S, 39 clinical isolated previously identified presumptively and 7 standard ATCC strains. Subsequently we carried out a new PCR-RFLP analysis of 2800 bp of the rDNA, an alternative simple methodology that we developed and shown capable of differentiating at the species level. The 46 fungal samples identified correspond to 7 species of the *Candida* genera (*C. albicans, C. dubliniensis, C. glabrata, C. tropicalis, C. guilliermondii, C. krusei* and *C. lusitaniae*) and one species of the *Picchia* genera (*P. anomala*). The comparison between the presumptive and molecular methodologies of identification, revealed that only 13 of the 39 clinical isolated correctly matched the molecular assignment. Additionally, our studies suggest that the classical plate test for phospholipase activity detection, considered a possible virulence factor, is imprecise in terms of interpretation. An alternative filamentation test was designed and showed the apparent presence, in serum, of inducers and inhibitors of this phenomenon.

Key-words: *Candida spp;* PCR, rDNA 28S gene, DNA sequencing, mitochondrial genome, polymorphic DNA regions, phospholipase, filamentation

Lista de figuras

Figura 1: Estrutura do ascocarpo de um Ascomyceto hipotético. 22

Figura 2: Diferentes tipos de ascocarpos. 23

Figura 3: Hifas septadas evidenciando os microporos, em A único e em B múltiplos. 25

Figura 4: Metabolismo da lecintina por fosfolipases encontradas em *C. albicans*. FA1 e 2, ácidos graxos. 31

Figura 5: (A) Forma de levedura, crescendo em YPD; (B) forma filamentosa crescendo em SFB 32

Figura 6: Representação esquemática de uma reação de PCR. 36

Figura 7: Gel de agarose a 1% do PCR multiplex com um par de primer genérico para *Candida spp* e um par específico para *C. dubliniensis*. 1 e 7 – STOP MIX A, 2 - padrão de peso molecular, 3 – controle negativo (sem DNA), 4 – *C. albicans* ATCC 10231, 5 e 6 – *C. dubliniensis*, CD 33 e CD 36, respectivamente 37

Figura 8: Auto-radiografia de um gel de seqüenciamento, tirado do trabalho original de sequenciamento por interrupção de cadeia de Sanger, Nicklen e Coulson de (1977). 39

Figura 9: Cromatograma obtido do seqüenciamento de *C. albicans* ATCC 10231, evidenciando a representação das quatro bases por picos de cores diferentes 39

Figura 10: Primeira identificação de fragmentos de restrição a partir da digestão do DNA do símio-vírus SV40 com a enzima *Hind*II. 40

Figura 11: Os onze fragmentos do DNA do símio-vírus SV40 gerados pela digestão com a enzima *Hind*II foram dispostos num mapa genético com uma forma física circular, gerando o primeiro mapa de restrição 40

Figura 12: Esquema geral de amplificação do rDNA com os primers 377 e 572, ligação do inserto no vetor de clonagem, transformação bacteriana, extração do pDNA e sequenciamento automático 51

Figura 13: Mapa do vetor de clonagem utilizado no trabalho. 55

Figura 14: Sítio de restrição reconhecido pela enzima *Dde*I. 59

Figura 15: Eletroforese em gel de agarose a 0,8% do DNA genômico extraído dos fungos *C. albicans* FCF 14 (números pares) e *C. dubliniensis* ATCC 777 (números ímpares). 1 e 8 controle negativo (AD e STOP MIX A); 2 e 3, extração pelo método com proteinase K; 4 e 5, extração pelo método com TE e zimoliase; 6 e 7, extração pelo método da fervura em água. 62

Figura 16: Eletroforese em gel de agarose a 1% da amplificação do rDNA de *C. albicans* FCF 14. 1 e 8, AD e STOP MIX A; 2, padrão de peso molecular; 3, controle negativo da reação (AD); 4, controle positivo (DNA de *C. dubliniensis*, produto de extração anterior que sabidamente amplificava). 5, 6 e 7 amplificação a partir do produto de extração das três metodologias: com proteinase K, com TE e zimoliase e da fervura em água, respectivamente. 63

Figura 17: Eletroforese em gel de agarose a 1% do produto da amplificação por PCR do rDNA e do intron ACT1. 1 e 19, AD e STOP MIX A; 2, padrão de peso molecular; 3 e 4, *C. albicans*;. 5 e 6, *C. krusei*; 7 e 8, *C. guilliermondii*; 9 e 10, *C. tropicalis*; 11 e 12 *C.*

parapsilosis; 13 e 14, *C. dubliniensis* 15, 16 e 17; *C. glabrata.* (A) e (B), 20 e 60 min de eletroforese, respectivamente à 100V.....63

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose a 1% do rDNA amplificado e eletroeluído. 1 e 17, AD e STOP MIX A; 2, padrão de tamanho e massa molecular; 3 e 4, *C. albicans*; 5 e 6, *C. glabrata*; 7 e 8, *C. krusei*; 9 e 10, *C. guilliermondii*; 11 e 12 *C. parapsilosis*; 13 e 14, *C. tropicalis*; 15 e16 *C. dubliniensis.* 64

Figura 19: Eletroforese em gel de agarose a 1% do pDNA extraído de alguns clones. 1, 8, 9 e 16 AD e STOP MIX A; 2 e 10, controle negativo (vetor p21, recircularizado); 7 e 15 controle positivo (vetor com inserto confirmado por seqüenciamento); 3 a 6 e 11 a 14, confirmação da clonagem com o inserto de 2800, (a) e (b), 20 e 40 min de eletroforese respectivamente, à 100V 65

Figura 20: BLAST N com o "Query" da linhagem ATCC 10231. BLAST em 21 de abril de 2007. 66

Figura 21: BLAST N com o "Query" da linhagem FCF 14. BLAST em 21 de abril de 2007.67

Figura 22: BLAST N com o "Query" da linhagem FCF 14,1. BLAST em 21 de abril de 2007. 68

Figura 23: BLAST N com o "Query" da linhagem ICB 58. BLAST em 21 de abril de 2007. 69

Figura 24: BLAST N com o "Query" da linhagem 15 D. BLAST em 21 de abril de 2007.....70

Figura 25: BLAST N com o "Query" da linhagem LGMG 1D. BLAST em 21 de abril de 2007. 71

Figura 26: BLAST N com o "Query" da linhagem LGMG 1H. BLAST em 21 de abril de 2007. 72

Figura 27: BLAST N com o "Query" da linhagem LGMG J. BLAST em 21 de abril de 2007. 73

Figura 28: BLAST N com o "Query" da linhagem LGMG 1K. BLAST em 21 de abril de 2007. 74

Figura 29: BLAST N com o "Query" da linhagem CD 33. BLAST em 21 de abril de 2007..75

Figura 30: BLAST N com o "Query" da linhagem CD 36. BLAST em 21 de abril de 2007..76

Figura 31: BLAST N com o "Query" da linhagem ATCC 777. BLAST em 21 de abril de 2007. 77

Figura 32: BLAST N com o "Query" da linhagem ATCC 778157. BLAST em 21 de abril de 2007. 78

Figura 33: BLAST N com o "Query" da linhagem LGMG 2A. BLAST em 21 de abril de 2007. 79

Figura 34: BLAST N com o "Query" da linhagem LGMG 2B. BLAST em 21 de abril de 2007. 80

Figura 35: BLAST N com o "Query" da linhagem LGMG 2C. BLAST em 21 de abril de 2007. 81

Figura 36: BLAST N com o "Query" da linhagem LGMG 2D. BLAST em 21 de abril de 2007. 82

Figura 37: BLAST N com o "Query" da linhagem LGMG 2E. BLAST em 21 de abril de 2007. 83

Figura 38: BLAST N com o “Query” da linhagem ATCC 34135. BLAST em 21 de abril de 2007. 84

Figura 39: BLAST N com o “Query” da linhagem ATCC 6258. BLAST em 15 de maio de 2007. 85

Figura 40: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 3A. BLAST em 21 de abril de 2007. 86

Figura 41: BLAST N com o “Query” da linhagem ICB 06. BLAST em 21 de abril de 2007. 87

Figura 42: BLAST N com o “Query” da linhagem H585. BLAST em 21 de abril de 2007.... 88

Figura 43: BLAST N com o “Query” da linhagem H1020. BLAST em 21 de abril de 2007.. 89

Figura 44: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 4B. BLAST em 21 de abril de 2007. 90

Figura 45: BLAST N com o “Query” da linhagem ICB 15. BLAST em 21 de abril de 2007. 91

Figura 46: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5A. BLAST em 21 de abril de 2007. 92

Figura 47: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5C. BLAST em 21 de abril de 2007. 93

Figura 48: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5D. BLAST em 21 de abril de 2007. 94

Figura 49: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5E. BLAST em 27 de abril de 2007. 95

Figura 50: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5F. BLAST em 27 de abril de 2007. 96

Figura 51: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5G. BLAST em 21 de abril de 2007. 97

Figura 52: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5H. BLAST em 27 de abril de 2007. 98

Figura 53: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5I. BLAST em 30 de abril de 2007. 99

Figura 54: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5J. BLAST em 21 de abril de 2007. 100

Figura 55: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5K. BLAST em 02 de juho de 2007. 101

Figura 56: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5L. BLAST em 21 de abril de 2007. 102

Figura 57: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 6A. BLAST em 21 de abril de 2007. 103

Figura 58: BLAST N com o “Query” da linhagem FCF 426. BLAST em 21 de abril de 2007. 104

Figura 59: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 7A. BLAST em 30 de abril de 2007. 105

Figura 60: BLAST N com o "Query" da linhagem LGMG 7B. BLAST em 21 de abril de 2007. 106

Figura 61: BLAST N com o "Query" da linhagem LGMG 7D. BLAST em 21 de abril de 2007. 107

Figura 62: BLAST N com o "Query" da linhagem LGMG 7E. BLAST em 02 de junho de 2007. 108

Figura 63: BLAST N com o "Query" da linhagem LGMG 8A. BLAST em 02 de maio de 2007. 109

Figura 64: BLAST N com o "Query" da linhagem LGMG 5B. BLAST em 27 de abril de 2007. 110

Figura 65: Identificação presuntiva com CHROMagar: (A) *C. parapsilosis* LGMG 5K; (B) *C. dubliniensis* CD 33; (C) *C. albicans* ATCC10123 112

Figura 66: Mapas dos sítios de restrição da enzima *Dde*I das 7 espécies estudadas no trabalho de uma seqüência aproximada de 2800 bp contendo os genes 18S e 5.8S completos, as regiões ITS 1 e 2 completas e o gene 28S incompleto. 116

Figura 67: Gel de agarose 2% da RFLP com *Dde*I: 1 padrão de tamanho molecular; 2 *C. tropicalis*; 3, 4 e 6 *C. parapsilosis*; 5 e 7 *C. albicans*; 8 *C. dubliniensis* 118

Figura 68: Gel de agarose 1,5% da RFLP com *Dde*I: 1 e 10 Stop Mix A e água; 2 padrão de tamanho molecular; 3 *C. albicans*; 4 *C. glabrata*; 5 *C. Krusei*; 6 *C. guilliermondii*; 7 *C. parapsilosis*; 8 *C. tropicalis*: 9 2800 bp de *C. albicans* não digerido. 119

Figura 69: Mapa do mtDNA de *C. albicans.* rRNA rnl – RNA ribossomal subunidade maior; rRNA rns – RNA ribossomal subunidade menor; COX 1, 2 e 3 – citocromo oxidase subunidades 1, 2 e 3; NAD 1, 2, 3, 4, 5 e 6 – NADH desidrogenase subunidades 1, 2, 3, 4, 5, 6; ATP 6, 8 e 9 – ATPase subunidades 6, 8 e 9; COB – provável apocitocromo b; VAR1 provável proteína ribossomal mitocondrial VAR1. 120

Figura 70: Mapa do mtDNA de *K. thermotolerans.* COX 1, 2 e 3 – citocromo oxidase subunidades 1, 2 e 3; ATP 6, 8 e 9 – ATPase subunidades 6, 8 e 9; COB – provável apocitocromo b; VAR1 provável proteína ribossomal mitocondrial VAR1 121

Figura 71: Mapa do mtDNA de *C. glabrata.* COX 1, 2 e 3 – citocromo oxidase subunidades 1, 2 e 3; ATP 6, 8 e 9 – ATPase subunidades 6, 8 e 9; CyB – provável apocitocromo B; VAR1 provável proteína ribossomal mitocondrial VAR1. 121

Figura 72: Gel de agarose 1% : amplificação do mtDNA de *P. anômala* com os iniciadores mitocondriais: 1padrão de peso molecular; 2 par 577/576; 3 par 577/578; 4 par 579/578; 5 par 579/576 ; 6 577/580; 7 579/50; 8 controle negativo. 124

Figura 73: Ensaio da fosfolipase: A, B, C e D: *C. albicans,* linhagens FCF 14,1, 15D, LGMG 1H e ATCC 10123, respectivamente. E e F, *C. dubliniensis*, linhagens CD 33 e CD 36. Ao centro, controle positivo, *C. albicans* FCF 14. Os diagramas indicam a forma como foi obtido o Pz. 125

Figura 74: Teste de filamentação e invasão do Agar. (A e B) padrões encontrados em *C. albicans, C. tropicalis* e *C. glabrata*. (C e D) padrões encontrado em *C. krusei*. (E e F) Invasão no sentido vertical e horizontal da placa, respectivamente. (G) padrão encontrado em *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis*. (H) colônia da linhagem LGMG de *C. guilliermondii* que não filamentou. 127

Figura 75: Gel de agarose de 20 μL do produto das três metodologias de extração: Esquerda, TE zimoliase; ao centro, fervura em água e à direita, proteinase K, lisozima e SDS 128

Figura 76: Digestão parcial com a enzima *Dde*I: 1 e 8, padrões de peso molecular; 2 *C. albicans*; 3 *C. glabrata*; 4 *C. krusei*; 5. *C. guilliermondii*; 6 *C. parapsilosis*; 7 *C. tropicalis.* 130

Figura 77: Viabilidade das 7 espécies em YPD por 48h a 30ºC, após vários ciclos de congelamento a –80ºC e descongelamento. 133

Figura 78: Meio WO acrescido de 5% BSA fração V v/v. Em torno das colônias FCF 14, FCF 14,1 e ATCC 10123, todas de *C. albicans* ocorreu a formação de um halo de coagualçao. As linhagens CD 33 e CD 36 de *C. dubliniensis* foram usadas como controle negativo. 135

Lista de tabelas

Tabela 1: Classificação dos seres vivos em 5, 4 e 3 reinos. 20
Tabela 2: Distribuição dos fungos em três reinos eucariotos. 21
Tabela 3: Diferenças taxonômicas entre anamorfo e telemorfos 26
Tabela 4: Genoma de *C. albicans.* 33
Tabela 5: Organização da unidade de repetição do rDNA em *C. albicans.* 34
Tabela 6: As espécies e respectivas linhagens utilizadas no trabalho. 47
Tabela 7: iniciadores utilizados nesse trabalho 50
Tabela 8: Seqüências do rDNA usadas para análise de padrões de restrição *in silico.* 59
Tabela 9: Genomas mitocondriais completos disponíveis no NCBI 60
Tabela 10: Posição dos sítios de clivagem para *Dde*I na seqüência do rDNA. 114
Tabela 11: Tamanho dos fragmentos de restrição gerados pela *Dde*I 117
Tabela 12: Comparação entre a RFLP, identificação prévia e seqüenciamento 118
Tabela 13: Regiões conservadas em cada gene que foram selecionadas em primeira análise 122
Tabela 14: Seqüências consenso dos genes entre os 3 fungos selecionadas para desenho dos iniciadores 123
Tabela 15: Números de acesso das seqüências publicadas em colaboração durante a realização do mestrado e as respectivas espécies identificadas 144
Tabela 16: Números de acesso das seqüências geradas no projeto de mestrado 144

Lista de Quadros

Quadro 1: Resultado da identificação fenotípica..... 111
Quadro 2: Identificação presuntiva das espécies com CHROMagar 113
Quadro 3: Comparação entre as diferentes metodologias de identificação..... 115
Quadro 4: Iniciadores Mitocondriais..... 123
Quadro 5: Resultado do ensaio da fosfolipase..... 125

Lista de abreviaturas e símbolos

µL	microlitro
µg	micrograma
ACT1	Actina 1
AD	água destilada
BD	Becton e Dicson
BSA	albumina sérica bovina
bp	“base par” - pares de base
$CaCl_2$	cloreto de cálcio
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídios trifosfato
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
EtOH	etanol
FCI	Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico
ITS	Espaçador interno transcrito
Kb	Kilo bases (1000 bp)
Krpm	mil rotações por minuto
LA	meio de cultura de Luria e Bertani com Ampicilina
LB	meio de cultura de Luria e Bertani
M	molar
Mg^{2+}	íon magnésio
$MgCl_2$	cloreto de magnésio
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mtDNA	DNA mitocondrial
NaCl	cloreto de sódio
NEB	New England Biolabs
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH_4OAc	acetato de amônia
ng	nanograma
PCR	"polymerase chain reaction"
pDNA	DNA plasmidial

pH	potencial hidrogeniônico
PK	proteinase K
qsp	quantidade suficiente para
RAPD	amplificação randômica de DNA polimórfico
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
RNA	ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossomal
rDNA	DNA ribossomal
rpm	rotação por minuto
SAP	aspartil proteinase
SFB	Soro Fetal Bovino
SDS	dodecil sulfato de sódio
TBE	Tris, borato e EDTA
TE	Tris-Cl e EDTA
Tris	tris hidroximetil aminometano
UV	ultravioleta
V	volts
vol	volume
v/v	volume/volume
WL	“Wave Length”
YNB	“Yeast Nitrogen Base”

Sumário

1 INTRODUÇÃO 19
1.1 Os fungos 19
1.2 Classificação 20
1.3 O filo Ascomycota 21
1.4 Classe Plectomycetes 23
1.5 Ordem Saccharomycetales 24
1.6 O gênero *Candida* 24
1.6.1 Virulência e Patogenicidade 27
1.6.1.1 Aderência ao epitélio do hospedeiro 28
1.6.1.2 Secreção de aspartil proteinases 29
1.6.1.3 Secreção de fosfolipases 30
1.6.1.4 Formação de hifas 32
1.6.2 Métodos moleculares de identificação e filogenia 33
1.6.2.1 Reação em cadeia da Polimerase - PCR 34
1.6.2.2 Sequenciamento do DNA 38
2 OBJETIVOS 42
2.1 Objetivo Geral 42
2.2 Objetivos específicos 42
3 MATERIAL E MÉTODOS 43
3.1 Meios de cultura para bactéria. 43
3.2 Meios de cultura para levedura 43
3.3 Ensaio da fosfolipase 43
3.4 Ensaio da proteinase 44
3.5 Ensaio de filamentação e invasão do agar 45
3.5.1 Meio SDC 45
3.5.2 Meio SPIDER 45
3.5.3 Meio SDC modificado 46
3.6 Gêneros, espécies e linhagens utilizadas nesse trabalho 46
3.7 Extração do DNA genômico 46
3.7.1 Extração do DNA genômico em água. 47
3.7.2 Extração do DNA genômico em TE zimoliase. 48
3.7.3 Extração do DNA genômico com SDS, Proteínas e K e lisozima 48
3.8 Eletroforese em gel de agarose 49
3.8.1 Preparo do gel e aplicação das amostras para a eletroforese 49
3.9 iniciadores utilizados 50
3.10 Amplificação por PCR 51
3.11 Purificação de DNA através do método de eletroeluição 52
3.12 Quantificação em espectrofotômetro 53
3.13 Preparo de células competentes 53
3.14 Clonagem 54
3.15 Transformação bacteriana 54
3.16 Coleta dos clones em meio seletivo 55
3.17 Mini-preparação de DNA plasmidial 56
3.18 Seqüenciamento de DNA 57
3.19 Precipitação das reações de sequenciamento 57
3.20 Seqüenciamento automático 58

3.21 Análise das seqüências completas 58
3.22 Análise de PCR-RFLP 58
3.23 Digestão com a enzima DdeI 59
3.24 Análise dos genomas mitocondriais 60
3.25 Identificação fenotípica 60
4 RESULTADOS 62
4.1 Extração do DNA genômico 62
4.2 Amplificação do DNA por PCR 62
4.3 Purificação de DNA através do método de eletroeluição 64
4.4 Clonagem molecular 64
4.5 Análise das seqüências através do GenBank 65
4.6 Identificação fenotípica 110
4.7 Identificação presuntiva com CHROMagar 112
4.8 Comparação entre as diferentes metodologias de identificação 114
4.9 Análise in silico dos padrões de diversas endonucleases de restrição 114
4.10 RFLP com a enzima Dde I 117
4.11 Análise dos genomas mitocondriais 119
4.12 PCR com os iniciadores mitocondriais 124
4.13 Ensaio da Fosfolipase 124
4.14 Ensaio da Proteinase 124
4.15 Ensaio de Filamentação e Invasão do Agar 126
5 Discussão 128
5.1 Extração do DNA genômico 128
5.2 PCR "multiplex" 129
5.3 Purificação de DNA através do método de eletroeluição 130
5.4 Genotipagem por seqüenciamendo do DNA 131
5.5 Genotipagem por RFLP com a DdeI 131
5. 6 Identificação fenotípica clássica 132
5.7 Ensaio da fosfolipase 134
5.8 Ensaio da filamentação 135
6 Conclusão 136
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 138
ANEXO 143

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os fungos

A classificação dos fungos como integrantes de um reino distinto surgiu a partir de 1969 como resultante da expansão taxonômica proposta por R. H. Wittaker. A divisão dos seres vivos em dois reinos, animal e vegetal, há muito já não era capaz de explicar a complexa diversidade biológica, tanto que em 1866 o zoólogo E. H. Haeckel propôs a criação de um terceiro reino, Protista, que englobaria algas, fungos, bactérias e protozoários (TRABULSI *et al*., 2005).

Entre 1866 e 1969, avanços na biologia celular, apoiados principalmente por uma microscopia de melhor resolução, permitiram que diferenças, outrora ignoradas, fossem evidenciadas, como por exemplo, a identificação de um grupo de células que eram possuidoras de uma estrutura interna (núcleo) delimitada por uma membrana (carioteca) que encerra grande parte do DNA celular, enquanto um outro grupo carecia de tal membrana, tendo assim o seu material genético disperso diretamente no citoplasma celular.

Contudo, Wittaker não considerou apenas aspectos morfológicos para propor uma nova classificação, mas também, como os organismos se organizavam em busca de alimento e energia. Assim, segundo tal classificação os seres vivos poderiam ser divididos em cinco reinos: Plantae, Animalia, Fungi, Protista e Monera (TRABULSI *et al*., 2005).

Em 1979, Carl Woese, baseando-se nas semelhanças e/ou diferenças do RNA ribossômico, propôs uma outra classificação para os seres vivos na qual existem três supra-reinos que ele denominou *Domínios*: Archae, Eubactéria e Eucaria (TRABULSI *et al*., 2005). Além do avanço taxonômico proposto por Woese, é importante assinalar o início de uma nova vertente na sistemática, o uso da biologia molecular, uma tendência que nos anos seguintes

tornou-se de fundamental importância para tal ciência, por expandir imensamente as possibilidades de identificação e diferenciação de novos microorganismos.

1.2 Classificação

Apesar de bem estabelecido, o sistema de classificação de cinco reinos não é o único utilizado, como mostra a Tabela 1, alguns autores utilizam os sistemas de classificação de quatro e três reinos (STORER *et al*., 2000). Mais especificamente em relação aos fungos, alguns autores ainda os classificam com integrantes do reino vegetal (KONEMAN *et al.,* 2004 p. 999), principalmente nas literaturas mais voltadas para a micologia clínica onde a identificação específica de um agente etiológico não é tão relevante quando comparada com a área acadêmica de ciência básica.

Tabela 1: Classificação dos seres vivos em 5, 4 e 3 reinos.

Cinco Reinos	Quatro Reinos	Três Reinos
MONERA PROTISTA	MONERA PROTISTA	PROTISTA
FUNGI PLANTAE	PLANTAE	PLANTAE
ANIMALIA	ANIMALIA	ANIMALIA

(adaptado de STORER *et al*., 2000)

Embora os fungos tenham sido considerados como sendo uma ramificação do reino vegetal, evidências baseadas em seqüências de aminoácidos de várias enzimas sugerem que o reino Fungi está mais relacionado com o reino animal do que com o vegetal (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

Atualmente, a taxonomia fúngica está em um constante e dinâmico processo "evolutivo", principalmente por influência da filogenética e da biologia molecular, sendo a

análise da seqüência de nucleotídeos do DNA, uma importante ferramenta para estabelecer relações entre os organismos. Estas duas ciências têm provocado modificações substanciais nos conceitos tradicionais da sistemática (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

Uma proposta recente baseada na ultraestrutura, bioquímica e principalmente na biologia molecular, sugere a distribuição dos fungos em três reinos diferentes - Chromista, Fungi e Protozoa (Tabela 2), o que de certa forma pode ser entendido como uma ruptura em relação à classificação clássica de um único reino no sistema de cinco reinos. A razão para a divergência é a grande diversidade de bioformas que abrange desde fungos filamentosos absortivos, até formas unicelulares assimilativas; organismos capazes de se reproduzir assexuada ou sexuadamente e não raramente possuírem as duas formas reprodutivas no seu ciclo de vida (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

Tabela 2: Distribuição dos fungos em três reinos eucariotos.

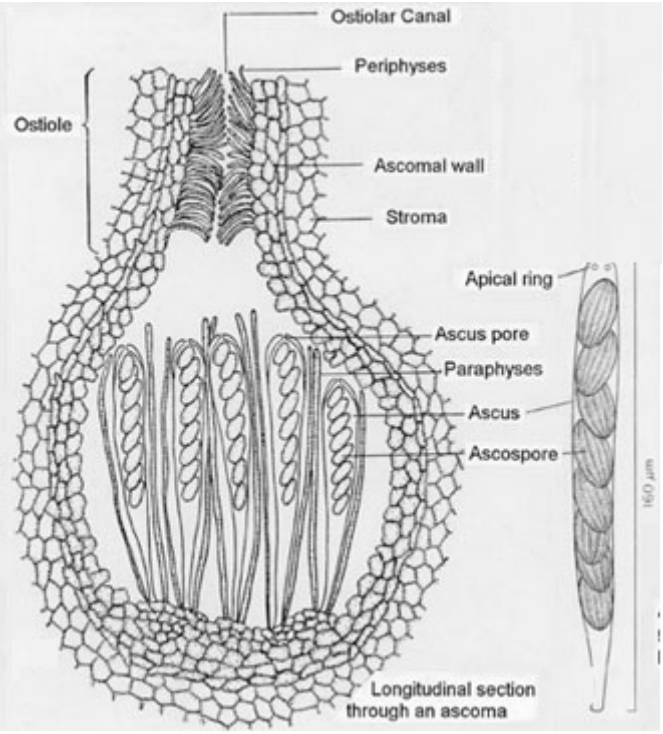
Reino	Filo
CHROMISTA	Hyphochytriomycota Labyrinthulomycota Oomycota
FUNGI	Ascomycota Basidiomycota Chytridiomycota Zygomycota
PROTOZOA	Acrasiomycota Dictyosteliomycota Myxomycota Plasmodiophoromycota

(adaptado de GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

1.3 O filo Ascomycota

O filo Ascomycota é o maior do reino Fungi, estima-se que ele provavelmente compreenda 50% de todas as espécies fúngicas conhecidas e aproximadamente 80% das espécies patogênicas e/ou oportunistas (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

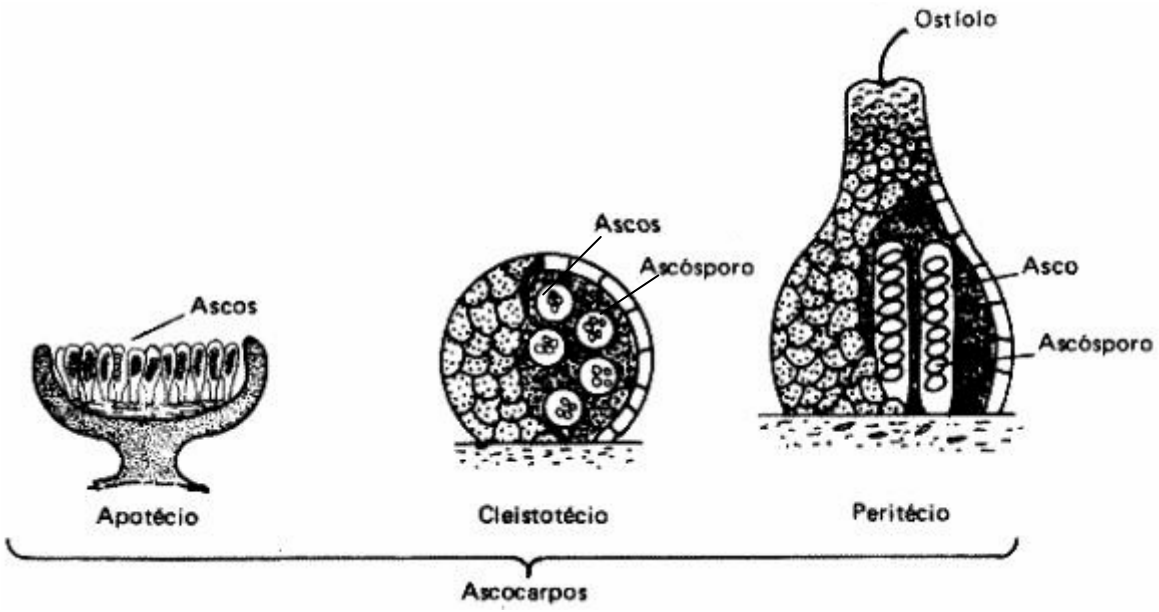
A principal característica dos ascomicetos é a presença de uma estrutura em forma de saco ou bolsa, o asco (Figura 1); os ascos estão reunidos em corpos de frutificação denominados ascocarpos (Figura 2). O arranjo dos ascos exerceu um importante papel sobre o agrupamento dos ascomicetos em seis classes distintas – Hemiascomycetes, Plectomycetes, Pyrenomycetes, Discomycetes, Laboulbeniomycetes e Loculoascomycetes - classificação esta que ainda se mantém nos dias de hoje (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).



Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/Ascomycota

Figura 1: Estrutura do ascocarpo de um Ascomyceto hipotético.

A formação do asco está relacionada com a reprodução sexuada que caracteriza a forma perfeita ou telemórfica do fungo, contudo representantes desse grupo também se reproduzem assexuadamente, fase anamórfica ou imperfeita, e nesse caso, não há formação do asco e na ausência desse importante estrutura para o diagnóstico, são utilizadas as características da parede celular (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).



Fonte: http://www.geocities.com/fungopat/Caracteristicas_Gerais.html

Figura 2: Diferentes tipos de ascocarpos.

1.4 Classe Plectomycetes

O filo Ascomycota possui espécies que são patogênicas ao homem estas espécies estão classificadas em três classes distintas: Hemiascomycetes, Loculoascomycetes e Plectomycetes, contudo neste trabalho será abordado brevemente apenas os Plectomycetes quanto às características relativas ao táxon classe.

Os plectomicetos são caracterizados pela produção do ascocarpo cleistotécico, um tipo de corpo de frutificação pequeno, globoso e completamente fechado. Os ascos são unitunicados, com paredes delicadas, deliqüescentes. Os ascósporos são liberados quando essa parede se degrada, contudo como não há mecanismos que lancem esses ascósporos ao meio, eles permanecem dentro do cleistotécio até que a parede desse se degenere ou se rompa. (GUERRERO; SILVEIRA, 2003).

Pertencem a esse grupo patógenos importantes como fungos dos gêneros*, Penicillium* e *Aspergillus* (ordem **Eurotiales**); *Coccidioides e Histoplasma,* (ordem **Onygenales**), entre outros (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

1.5 Ordem Saccharomycetales

Segundo dados do "Taxonomy - NCBI", a ordem Saccharomycetales inclui 11 famílias e 65 gêneros e um grande número de espécies, contudo, esses números não são estáticos, mudam constantemente. Com o advento da biologia molecular, um grande número de dados vem sendo gerado, pois além dos organismos cultiváveis em laboratório tornou-se possível também a identificação daqueles não cultiváveis. Este fato se reflete na existência, no banco de dados do NCBI, de 75 gêneros agrupados como não classificados.

Contudo, o levantamento do " Taxonomy – NCBI" foca apenas as espécies para as quais existe algum dado molecular (gene, RNA ou proteína) publicado o que pode subestimar substancialmente a situação real.

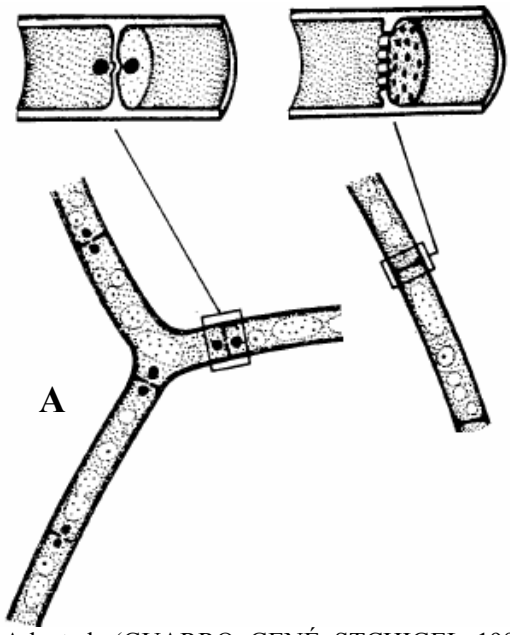
Os integrantes desse gênero são representados por células vegetativas que proliferam por brotamento ou fissão, genericamente definidas como leveduriformes. Contudo, podem também formar um talo relativamente simples pelo desenvolvimento de um micélio septado; o septo pode conter um ou mais microporos (Figura 3) (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

1.6 O gênero *Candida*

O interesse em estudar os fungos do gênero *Candida* não é recente, segundo Skinner e Fletcher (1958), dados sobre esse gênero começaram a ser publicados a partir da década de 40 sempre relacionados com os aspectos médicos, algo que se perpetua até os dias atuais.

Anteriormente ao epíteto *Candida,* outros nomes eram usados, como *Syringospora* e, incorretamente *Monilia*. *Syringospora* caiu em desuso e o gênero *Monilia,* hoje, já está

devidamente classificado, também pertence ao filo Ascomycota, contudo difere do gênero *Candida* a partir do táxon subfilo (SKINNER; FLETCHER, 1958).



Fonte: Adaptado (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

Figura 3: Hifas septadas evidenciando os microporos, em A único e em B múltiplos.

O gênero *Candida* conta hoje com 340 espécies anamórficas descritas ("Taxonomy – NCBI"), esse número tende a aumentar: com base na seqüência de nucleotídeos do rDNA, outros 443 fungos estão classificados até o táxon gênero, não estando enquadrados em nenhuma das espécies já descritas.

Atualmente, pelo menos, 13 telemorfos já são conhecidos, o que torna a classificação desses fungos ainda mais complexa, pois os estados anamórficos e telemórficos são classificados em gêneros distintos (Tabela 3) (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

Segundo GUARRO; GENÉ e STCHIGEL (1999), nos meios de cultura de rotina usados em laboratório, os anamorfos são mais comumente isolados e se reproduzem assexuadamente por brotamento. Os fungos que apresentam a fase telemórfica normalmente tendem a ser ascosporogeneos.

Tabela 3: Diferenças taxonômicas entre anamorfo e telemorfos.

Fase telemórfica: Gênero	Fase anamórfica: Gênero
Clavispora	*Candida*
Debaryomyces	*Candida*
Hansenula	*Candida*
Issatchenkia	*Candida*
Kluyveromyces	*Candida*
Pichia	*Candida*
Torulaspora	*Candida*
Torulopsis	*Candida*
Stephanoascus	*Candida*
Yarrowia	*Candida*

(adaptado de GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

Apresentam capacidades assimilatórias oxidativas e fermentativas, tornando possível a utilização de diversas fontes orgânicas de energia. São encontrados em uma ampla variedade de nichos ecológicos, geralmente como saprófovoros. No homem algumas espécies do gênero fazem parte da microbiota normal de cavidades que se comunicam com o exterior, mais comumente retal, oral e vaginal (SKINNER; FLETCHER, 1958), bem como em dobras cutâneas, como a virilha (SOLL, 2002).

Candida spp desenvolvem um estado comensal em indivíduos saudáveis, e nesse estado não causam doenças; podendo inclusive alcançar uma grande densidade populacional sem desenvolver, contudo, qualquer sintomatologia (SOLL, 2002).

Estima-se que *Candida spp* colonizem a cavidade oral e anal de 26% da população de indivíduos saudáveis, essa freqüência é inferior na cavidade vaginal de mulheres saudáveis, cuja estimativa é de 10%. Independente da parte do corpo, *C. albicans* é a espécie mais comumente encontrada, aproximadamente 70%, seguida de *C. glabrata* e *C. tropicalis,* aproximadamente 7% (SOLL, 2002).

Entretanto, não há consenso na literatura quanto a estas estimativas e a freqüência das espécies nas diferentes partes do corpo pode variar consideravelmente de um estudo para

outro, provavelmente por diferenças na coleta, diversidade entre populações, principalmente com usos e costumes diferentes e em função da idade (SOLL, 2002).

C. parapsilosis, por exemplo, é mais freqüente em crianças com idades entre 6 meses e 1 ano e meio, aproximadamente 38%, essa freqüência decai para 13% em crianças com idades entre 5 e 7 anos e menos de 5% em indivíduos acima de 15 anos (SOLL, 2002). *C. glabrata* é outro exemplo dessa variação, vive como comensal em aproximadamente 72% dos indivíduos com mais de 80 anos, esse número é bastante inferior em indivíduos com faixa etária entre 70 e 80 anos, e nulo em indivíduos com idades entre 60 e 69 anos (SOLL, 2002).

Outro fator e talvez o mais relevante, diz respeito à identificação, Lockhart *et al.*, (1999) mostraram que *C. glabrata* foi incapaz de crescer no meio definido usado por Soll *et al.,* em 1991. Estes dados sugerem que tanto o número quanto a variedade de espécies podem estar subestimados quando se utiliza apenas a metodologia fenotípica de identificação.

1.6.1 Virulência e Patogenicidade

Alguns fungos do gênero *Candida*, mais prevalentemente *C. albicans*, são capazes de desenvolver infecções subcutâneas e disseminadas, sendo classificadas como micoses oportunistas (KONEMAN *et al.,* 2001). Essa característica sugere um sistema eficiente de adaptação a mudanças ambientais como local de corpo a ser colonizado, fisiologia do hospedeiro, resposta imune e terapia medicamentosa (SOLL, 2002).

Segundo Koneman *et al*, (2001) pacientes imunocomprometidos ou com alguma alteração que comprometa a função dos leucócitos polimorfunucleares tornam-se suscetíveis às infecções por *Candida spp*, assim, segundo o autor, incluem-se nesse grupo os receptores de transplantes de órgãos, devido ao tratamento imunossupressor a que são submetidos para reduzir as chances de rejeição do órgão a ser transplantado; portadores da Síndrome da

Imunodeficiência Adquirida (AIDS); portadores de neoplasias malignas principalmente aqueles com leucemia e linfoma; pacientes com alterações imunológicas e metabólicas debilitantes como o lúpus eritematoso sistêmico e diabetes melito, bem como os etilistas e drogatitos que utilizam drogas endovenosas (KONEMAN *et al.,* 2001).

Os mecanismos envolvidos nessa "adaptação" começam a ser esclarecidos, havendo um consenso na literatura, baseado em dados experimentais, *in vi*tro e *in vivo*, de que dentre algumas das características envolvidas, estão, adesão ao epitélio do hospedeiro, produção e secreção de enzimas hidrolíticas, formação de hifas, capacidade de crescer em 37º C e a secreção de toxinas (YANG, 2003; BISWAS; DIJCK; DATTAI, 2007; NIWERTH; KORTING, 2000).

Além de tentar entender os mecanismos que "despertam" a virulência de *Candida spp*, existem dois aspectos que estão recebendo importante atenção nos últimos anos que são a identificação de variantes resistentes a antifúngicos e variantes mais virulentas. Estudos com *C. albicans* baseados em "DNA fingerprinting" mostraram que variações entre linhagens dessas espécies ocorrem naturalmente. Estas linhagens podem ser agrupadas em quatro grandes clades de *C. albicans*: I, II, III e SA ("South African-specific"), entretanto, a relação entre comensalismo e patogenicidade é a mesma para as diferentes linhagens, não ocorrendo uma mais virulenta e a distribuição é aleatória (SOLL, 2002).

1.6.1.1 Aderência ao epitélio do hospedeiro

A capacidade de aderência às células do hospedeiro é entendida como um passo inicial e essencial no processo de infecção. Além da capacidade de aderência ao epitélio do hospedeiro, *Candida spp.* têm a capacidade de se aderir à superfície de artefatos como catéteres, próteses e sondas e formando biofilmes o que aumenta a possibilidade de

candidemia resistente a antifúngicos; conquanto, há uma relação diretamente proporcional entre a diminuição da capacidade de aderência e virulência (YANG, 2003).

1.6.1.2 Secreção de aspartil proteinases

A secreção de aspartil proteinases (SAPs) contribui para a invasão tissular, pois são capazes de degradar proteínas do hospedeiro como albumina, hemoglobina, queratina, entre outras (YANG, 2003).

Em *C. albicans,* já foram identificados 9 diferentes SAPs, reguladas ao nível da transcrição, cuja expressão é modulada em resposta à variação no ambiente. Assim sendo, estudos, *in vitro,* mostraram que SAP 1, 2 e 3 são expressas apenas em culturas leveduriformes e a expressão de SAP 4, 5 e 6, está restrita a forma de hifa; a expressão de SAP 7, ainda não foi observada. SAP 8 é expressa quando em cultivo à 25º C e SAP 9 aparece em fase tardia de crescimento (SOLL, 2002; YANG, 2003).

A transcrição das SAPs 2, 4, 5 e 6, pode ser detectada tanto em indivíduos assintomáticos quanto em pacientes com candidose oral, entretanto, transcritos de SAP 1 e 3 foram detectados apenas nos portadores de candidose oral. Considerando o sítio da infecção, observa-se o mesmo padrão de transcrição diferencial, SAPs, 1, 3, 6 e 8, são detectadas em candidoses orais e infecções de pele, contudo, não são detectadas em vulvovaginites (YANG, 2003).

Outro dado interessante é a expressão das SAPs no decurso da infecção, em um modelo epidérmico humano, observou-se que as SAPs 1 e 2 foram as primeiras a serem expressas, no início da invasão, seguida da SAP 8 já no processo mais intenso da invasão tissular e por fim, SAP 6 quando em crescimento micelial (YANG, 2003).

Estudos mostraram que em modelos murinos, mutantes para SAPs 1, 2 e 3 são menos virulentos que os selvagens enquanto a tripla deleção dos genes SAP 4, 5 e 6 os tornam avirulentos (YANG, 2003).

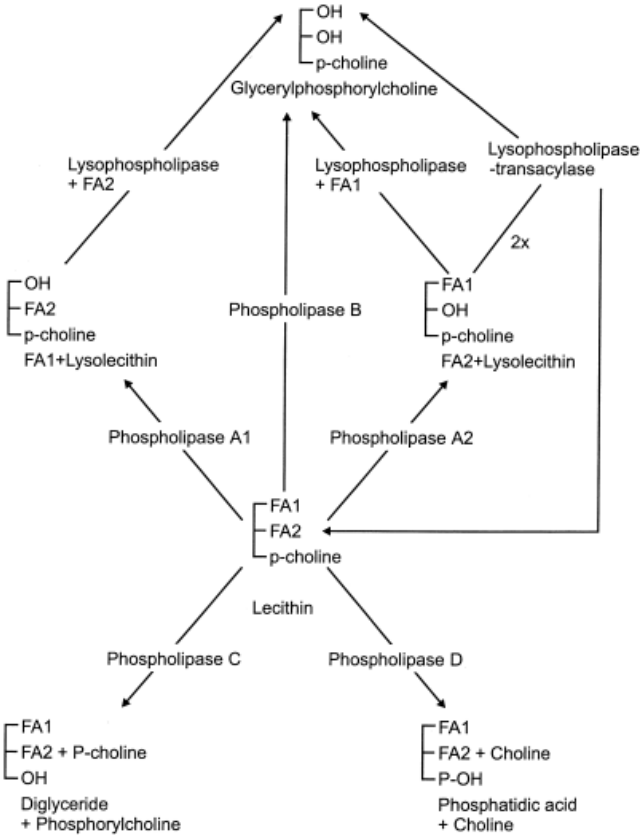
1.6.1.3 Secreção de fosfolipases

Outra classe de enzimas hidrolíticas secretadas é a das fosfolipases. Os estudos concentram-se principalmente em *C. albicans,* e já identificaram uma família que compreende as fosfolipases A, B, C, D, lisofosfolipase e lisofosfolipase-transacilase (NIWERTH; KORTING, 2000); (YANG, 2003).

Essas enzimas metabolizam fosfolipídios, os principais componentes das membranas celulares. Assim, além de estarem relacionadas à invasão do tecido do hospedeiro, essas enzimas participam do controle de crescimento e remodelamento da membrana celular do fungo, bem como na transdução de sinais (NIWERTH; KORTING, 2000).

A fosfolipase A catalisa a hidrólise do primeiro ou do segundo ácido graxo esterificado com o glicerol, produzindo a lisolecitina, uma toxina encontrada também em veneno de cobra e de abelha. Essa toxina é capaz de provocar hemólise porque lisa a membrana dos eritrócitos. A fosfolipase B hidrolisa os dois ácidos graxos, não produzindo assim o intermediário tóxico lisolecitina, sendo os produtos da reação glicerolfosforilcolina e dois ácidos graxos livres. A fosfolipase C quebra a ligação existente entre o carbono e o fosfato da fosfatidilcolina, produzindo, fosforilcolina e diacilglicerol, exercendo assim, um importante papel na sinalização celular. A fosfolipase D cliva a colina da fosfatidilcolina produzindo ácido fosfatídico. A lisofosfolipase metaboliza a toxina lisolecitina produzida pela fosfolipase A, produzindo, assim como a fosfolipase B, glicerolfosforilcolina. A lisofosfolipase-transacilase catalisa a transacilação entre duas moléculas de lisolecitina

formando glicerolfosforil colina ou fosfatidilcolina (Figura 4) (NIWERTH; KORTING, 2000).



Fonte: (NIWERTH; KORTING, 2000).

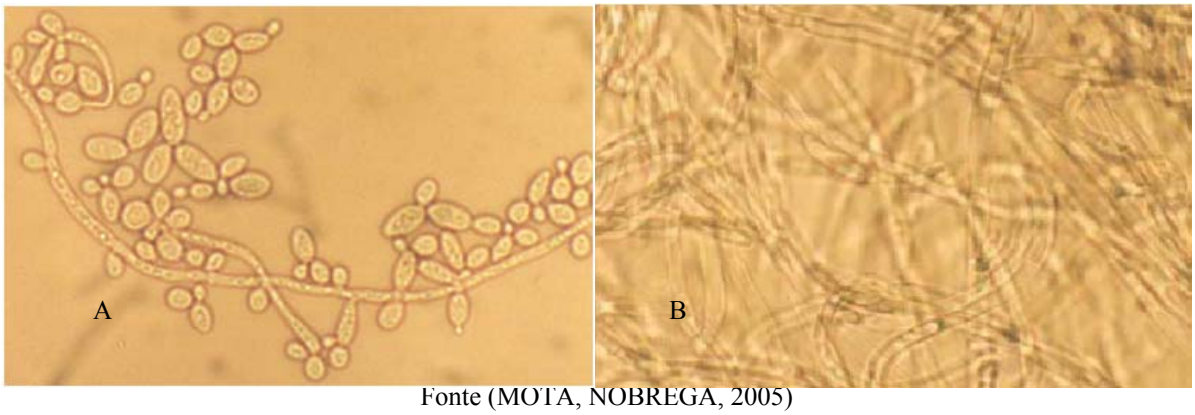
Figura 4: Metabolismo da lecintina por fosfolipases encontradas em *C. albicans*. FA1 e 2, ácidos graxos.

Diferentes metodologias empregadas para tentar esclarecer o papel da fosfolipase extracelular na patogenicidade de *C. albicans* têm demonstrado que isolados obtidos a partir de sangue apresentam uma atividade extracelular de fosfolipase significativamente maior do que isolados da cavidade oral de indivíduos saudáveis e essa relação é igualmente observada entre linhagens invasivas e não invasivas. Infecção em modelo murino com linhagens que produzem mais ou menos fosfolipase mostrou que as que produziam mais fosfolipase eram mais virulentas, sugerindo assim, que a produção de fosfolipase pode ser um fator de virulência (NIWERTH; KORTING, 2000; YANG, 2003).

1.6.1.4 Formação de hifas

A capacidade mudar da forma de levedura para a forma filamentosa, é descrita como sendo um importante fator de virulência em *C. albicans* (Figura 5), envolvida na invasão do tecido (SOLL, 2002).

A forma filamentosa, ou micelial, é resultante da formação de tubos germinativos, provavelmente em resposta a mudanças na condição de crescimento a partir do hospedeiro que sinalizaria ao fungo uma necessidade de adaptação às condições do novo ambiente ou até mesmo uma dispersão em busca de um novo nicho, ideal ao crescimento (BISWAS, 2007).



Fonte (MOTA, NOBREGA, 2005)

Figura 5: (A) Forma de levedura, crescendo em YPD; (B) forma filamentosa crescendo em SFB

Em *S. cerevisiae* a mudança na forma de crescimento é regulada por duas proteínas, Ste12p e Phd1p. Mutantes para essas duas proteínas são incapazes de mudar da forma de levedura para a forma filamentosa e não são invasivos. Proteínas homólogas em *C. albicans* Cph 1 (Ste12p) e Efg1p (Phd1p) parecem desempenhar a mesma função, sendo os mutantes incapazes de formar filamentos e avirulentos para modelos murinos (YANG, 2003).

1.6.2 Métodos moleculares de identificação e filogenia

A introdução de métodos da biologia molecular em estudos taxonômicos tem provocado mudanças relevantes na filogenia das leveduras. A idéia básica dessa metodologia é encontrar cronômetros moleculares capazes de evidenciar diferenças que possam ser quantificadas em forma de tempo promovendo assim, a separação de diferentes linhas ancestrais a partir de um progenitor comum (PETERSEN, 2000).

Uma metodologia que vem sendo utilizada em grande escala para estabelecer relações filogenéticas é o estudo do RNA ribossomal (rRNA) ou do DNA ribossomal (rDNA). Os ribossomos estão presentes em todos os organismos vivos e desempenham a mesma função, o que sustenta a teoria de uma origem evolucionária comum. As seqüências do rDNA são extremamente conservadas o que lhe confere a possibilidade de ser um ponto de referência para estabelecer relações filogenéticas entre os mais variados tipos e organismos. (PETERSEN, 2000).

C. albicans é um fungo diplóide contendo 8 pares de cromossomos em seu genoma (Tabela 4), que pode variar em relação ao tamanho. Essa variação se dá pelo polimorfismo do cromossomo R o qual abriga muitas cópias do rDNA (JONES *et al*., 2004).

Tabela 4: Genoma de *C. albicans.*

Cromossomo	Tamanho em Kb
R	2,530
1	3,165
2	2,300
3	1,820
4	1,700
5	1,230
6	1,090
7	1,020

O arranjo dos genes do rDNA na linhagem SC5314 de *C. albicans* (Tabela 5) é similar ao arranjo encontrado em *S. cerevisiae*, contudo, o tamanho pode variar entre linhagens *de C. albicans*, característica essa que vem sendo usada para identificar e diferenciar espécies e linhagens (JONES *et al*., 2004).

Tabela 5: Organização da unidade de repetição do rDNA em *C. albicans.*

Início	Fim	rDNA
1	1787	18S
1788	1926	ITS 1
1927	2083	5.8S
2084	2234	ITS 2
2235	5595	28S
10575	10455	5S

As estratégias para proceder a comparação do rDNA entre as espécies e/ou linhagens de gênero *Candida*, concentram-se principalmente nos estudo das regiões ITS, sabidamente polimórficas, utilizando-se como ferramentas para essa comparação a amplificação por PCR, sequenciamento e/ou RFLP (CHEN *et al*., 2001; WU., *et al* 2003; COLEMAN, 2003; PINTO *et al.* 2004).

1.6.2.1 Reação em cadeia da Polimerase - PCR

> "Beginning with a single molecule of the genetic material DNA, the PCR can generate 100 billion similar molecules in an afternoon. The reaction is easy to execute. It requires no more than a test tube, a few simple reagents, and a source of heat." (MULLIS, 1990).

A reação de amplificação em cadeia da DNA polimerase (PCR) é um método que envolve técnicas bioquímicas e da biologia molecular que visa amplificar o DNA exponencialmente, através de uma reação enzimática *in vitro,* ou seja, sem o uso de um

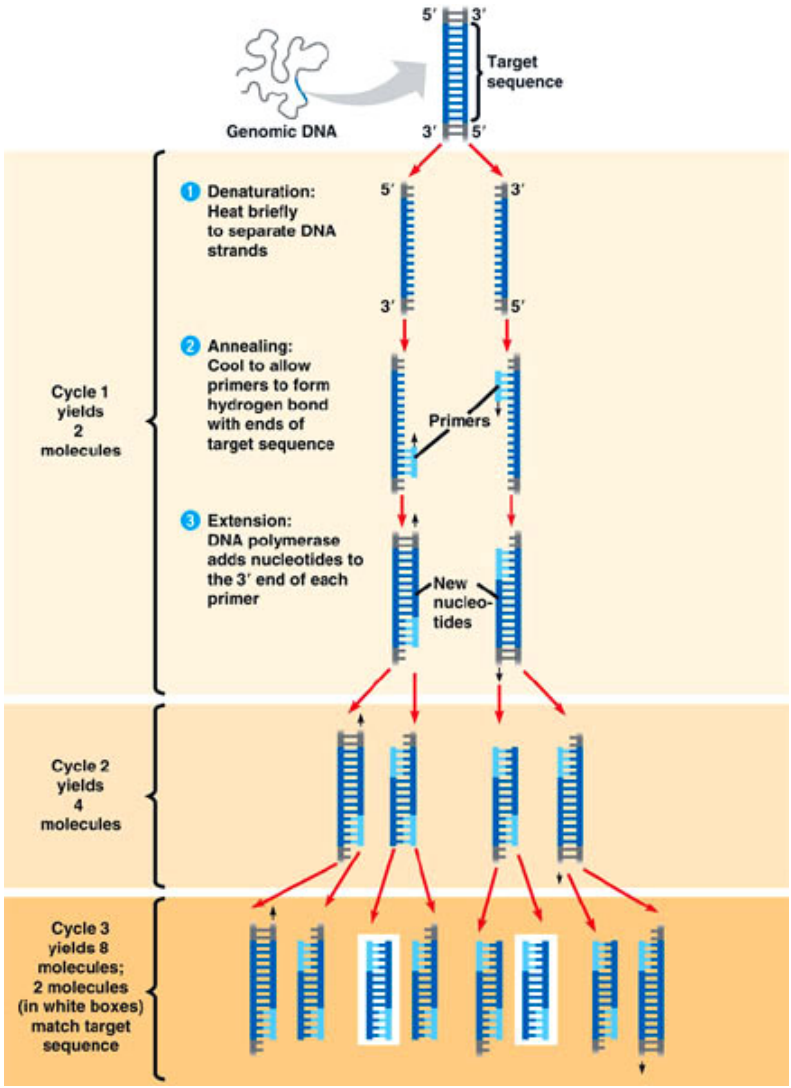
organismo vivo, extrato celular ou célula intacta. (HAUSMANN, 2002; ALBERTS *et al,* 1998).

O processo descrito por Kary Mullis na década de 80, o que lhe valeu o Prêmio Nobel da Química em 1993, atingiu um enorme espectro de aplicações que inclui laboratórios de investigação médica, onde pode ser usado na detecção de doenças hereditárias através da identificação de "impressões digitais" ("DNA fingerprint") genéticas; medicina forense, onde pequenas amostras de DNA retiradas da cena de um crime (fragmentos de cabelo ou pêlo, gotas de sangue ou saliva, etc.) são amplificadas para serem analisadas pelo método de "fingerprinting", bem como, oportunamente empregado em testes de paternidade (HAUSMANN, 2002; DUARTE *et al.,* 2001, ALBERTS *et al.,* 1998). As aplicações se multiplicam: na engenharia genética e biologia molecular como parte de inúmeros protocolos, no estudo da evolução e diversidade genética, na ecologia moderna, na antropologia, na conservação, etc. A técnica da PCR em certo sentido, popularizou a genética molecular, permitindo com esta tecnologia simples e barata, levar os estudos moleculares baseados no genoma, aos recantos mais diversos da biologia, antes imunes à abordagem molecular.

Na Biologia Molecular, a PCR vem sendo amplamente utilizado: amplificação para gerar mutagênese, detecção de mutações ou preparação de fragmentos de DNA para clonagem, a construção de árvores filogenéticas, bem como, a possibilidade de identificação de microorganismos em biomonitoramento ou patógenos como *Cândida spp.* (ALBERTS, *et al.,* 1998; LODISH, *et al.,* 1999; WU; WANG; BLOMQUIST, 2002; DONNELLY, *et al.*, 1999).

O método em si é simples, porém, muito sensível, por isso, deve ser realizado com muito cuidado para evitar contaminações que possam inviabilizar ou tornar errôneo o resultado. Inicialmente extrai-se o material genético do organismo de interesse. Ao DNA extraído é adicionada uma mistura que deve conter dNTPs (desoxirribonucleotídeos

trifosfatados), oligonucleotídeos (ou iniciadores) que delimitarão uma região específica a ser amplificada do DNA molde, a enzima Taq DNA polimerase, uma solução tampão e um cátion divalente, geralmente Mg^{2+}. A reação é submetida a um tratamento físico cíclico pré-estabelecido de variação de temperaturas em um termociclador (Figura 6) (HAUSMANN, 2002; ALBERTS *et al,* 1998; LODISH *et al,* 1999).



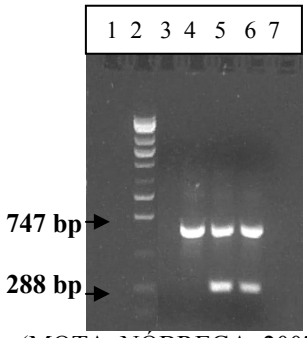
Fonte: http://www.copernicusproject.ucr.edu/ssi/HSBiologyResources.htm

Figura 6: Representação esquemática de uma reação de PCR.

Na primeira etapa do ciclo a temperatura é elevada de 94 a 96ºC por pouco tempo para que haja a desnaturação do DNA molde. Na segunda etapa a temperatura é reduzida para que ocorra o anelamento dos iniciadores. Esta pode variar dependendo da quantidade de bases

citosina e guanina existentes no iniciador, normalmente compreendida entre 50 a 60ºC. Na última etapa do ciclo a temperatura é elevada a 72ºC para que a enzima termoestável possa sintetizar a nova molécula, em seguida um novo ciclo é iniciado. Normalmente são realizados de 25 a 40 ciclos para cada reação. Como a cada ciclo a quantidade de produto dobra, a taxa de amplificação da região compreendida entre os iniciadores é exponencial (HAUSMANN, 2002; ALBERTS *et al,* 1998; LODISH *et al,* 1999).

Através da técnica de PCR, foi possível diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*, por simples amplificação de um intron de 288 bp existente no gene da actina 1 de *C. dubliniensis* e posterior análise em gel de agarose (Figura 7) (DONNELY, *et al*., 1999). Kanbe *et al.* (2002), utilizaram uma mistura de iniciadores específicos para cada espécie e um par degenerado, baseados na seqüência genômica do DNA da topoisomerase II o que resultou em um padrão de bandeamento específico para 12 espécies do gênero *Candida*. Contudo a metodologia é laboriosa porque utiliza 36 iniciadores específicos, 3 por espécie, e um par degenerado, porém, o padrão gerado é muito similar entre algumas espécies, sendo praticamente idêntico entre *C. albicans* e *C. krusei.*



Fonte (MOTA, NÓBREGA, 2007)

Figura 7: gel de agarose a 1% da PCR multiplex com um par de primer genérico para *Candida spp* e um par específico para *C. dubliniensis*. 1 e 7 – STOP MIX A, 2 - padrão de peso molecular, 3 – controle negativo (sem DNA), 4 – *C. albicans* ATCC 10231, 5 e 6 – *C. dubliniensis*, CD 33 e CD 36, respectivamente.

1.6.2.2 Sequenciamento do DNA

O sequenciamento do DNA é um método capaz de indicar com precisão as bases de uma determinada seqüência de DNA. As seqüências, assim obtidas, podem ser usadas em diversas áreas do conhecimento, pesquisas básicas em centros acadêmicos, medicina forense, métodos diagnósticos e, incontestavelmente vem aumentando a capacidade de identificação de novas espécies, principalmente as microbiológicas, fortalecendo assim, os estudos de filogenia e dirimindo vieses da sistemática tradicional (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

O processo em uso corrente ainda está baseado no método de interrupção de cadeia de Sanger, Nicklen e Coulson (1977). Por esse método, aos dNTPs normais, adiciona-se uma pequena concentração (1/100) de trifosfo-2´-3´-didesoxinucleosídios (ddNTPs), que são bases modificadas, destituídas do grupo hidroxila livre no carbono 3, o que inibe a continuação da síntese da cadeia a partir de sua incorporação. Para detectar o DNA sintetizado ou marcava-se o iniciador com radioatividade na extremidade 5' (fosfato ^{32}P) ou se adicionava entre os dNTPs fornecidos um marcado com ^{32}P. As cadeias marcadas radioativamente eram submetidas a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida seguida de auto-radiografia (Figura 8) (HAUSMANN, 2002).

O método foi aperfeiçoado na década de 80 culminando na técnica atual que usa ddNTPs quimicamente marcados que fluorescem em diferentes comprimentos de onda após excitação. A leitura da fluorescência foi automatizada, um laser excita as moléculas de DNA que estão saindo do gel, a fluorescência é captada por uma fibra óptica que leva a emissão para um espectrofotômetro que identifica o nucleotídeo. As curvas de absorção são enviadas para um computador que apresenta o resultado sob a forma de um cromatograma de quatro cores distintas, uma para cada base (Figura 9) (HAUSMANN, 2002).

Fonte: (HAUSMANN, 2002)

Figura 8: Auto-radiografia de um gel de seqüenciamento, tirado do trabalho original de sequenciamento por interrupção de cadeia de Sanger, Nicklen e Coulson de (1977).

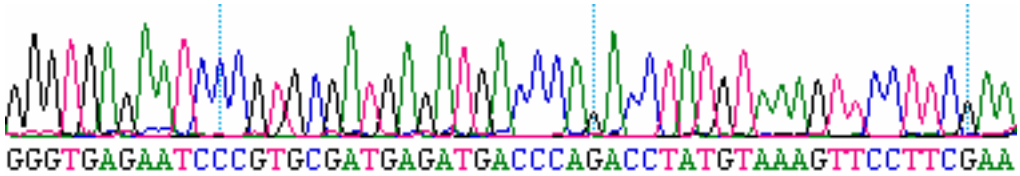


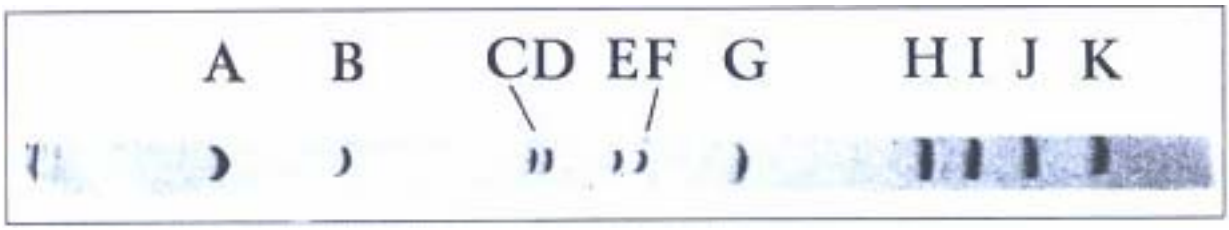
Figura 9: Cromatograma obtido do seqüenciamento de *C. albicans* ATCC 10231, evidenciando a representação das quatro bases por picos de cores diferentes.

Para estabelecer as relações filogenéticas entre os organismos um dos padrões adotados é o sequenciamento de aproximadamente 600 bp do rDNA 18S ou 28S, quando o propósito é diferenciar as espécies, as regiões ITS são preferencialmente utilizadas (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999; WU *et al,* 2003; COLEMAN, 2003;CHEN, 2001).

1.6.3.2.3 Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição –RFLP

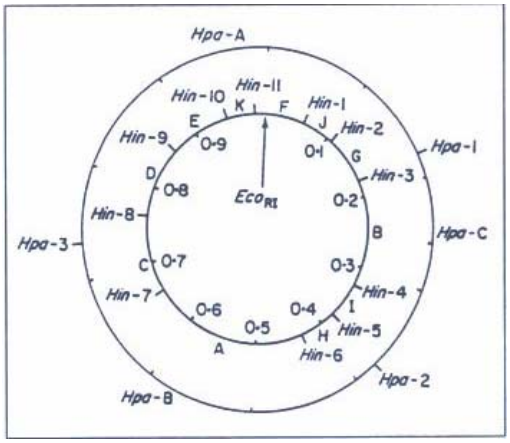
A descoberta das enzimas de restrição protagonizou um importante avanço na biologia molecular. Estas endonucleases agem em seqüências palindrômicas específicas, os sítios de restrição, podendo gerar extremidades pareadas ou coesivas. A identificação dos padrões de restrição e a ordenação desses padrões (Figura 10) podem ser usadas para se construir mapas

de restrição o que possibilita uma espécie de mapeamento físico do DNA, denominado mapa de restrição (Figura 11) (HAUSMANN, 2002; ALBERTS *et al.,* 1998; LODISH *et al.,* 1999).



Fonte: (HAUSMANN, 2002)

Figura 10: Primeira identificação de fragmentos de restrição a partir da digestão do DNA do símio-vírus SV40 com a enzima *Hind*II.



Fonte: (HAUSMANN, 2002)

Figura 11: Os onze fragmentos do DNA do símio-vírus SV40 gerados pela digestão com a enzima *Hind*II foram dispostos num mapa genético com uma forma física circular, gerando o primeiro mapa de restrição.

O significado biológico da enzima de restrição consiste em uma forma de defesa da bactéria contra DNAs estrangeiros, principalmente os de fagos. Cada bactéria tem um sistema de restrição particular, que inclui a nuclease e uma enzima modificadora que protege o DNA endógeno do ataque da nuclease. Atualmente muitas centenas de enzimas distintas, foram identificadas, purificadas e estão disponíveis comercialmente, algo que é de grande utilidade em biologia molecular (HAUSMANN, 2002).

Variações nas seqüências de nucleotídeos ocorrem naturalmente no genoma dos mais diversos organismos, essa variação é denominada polimorfismo do DNA. Como conseqüência

do polimorfismo determinadas regiões do genoma podem perder ou ganhar sítios de restrição, como é aleatório, pode diferir entre dois organismos (LODISH *et al,* 1999). Uma das primeiras metodologias para se determinar o polimorfismo do DNA foi a RFLP ("restriction fragment length polymorphism") que identifica a variação, entre indivíduos, do tamanho dos fragmentos de restrição produzidos por uma mesma enzima a partir de regiões idêntica do genoma (LODISH *et al,* 1999).

As primeiras técnicas de RFLP empregadas na taxonomia comparavam os padrões de restrição do mtDNA (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999; PETERSEN, 2000). Contudo, a extração e purificação do mtDNA, não são tarefas fáceis e práticas, assim, após implementação do PCR, vem ocorrendo a associação dessas duas técnicas sendo referida como análise de PCR-RFLP (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999; PINTO, 2004; McULLOUGH; CLEMONS; STEVENS, 1999) .

Outras técnicas que visam igualmente a genotipagem ocorrem, inclusive, com uma farta documentação na literatura, como determinação de polimorfismo de microsatélites, amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD), determinação da quantidade de guanina e citosina do DNA nuclear ou hibridização DNA-DNA com marcadores fluorescentes. Contudo, algumas dessas técnicas estão caindo em desuso, como RAPD por ser pobremente reproduzível, ou de difícil execução e caras, como a hibridização com marcadores fluorescentes (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999; PETERSEN, 2000; SELVARANGAN; LIMAYE; COOKSON, 2002; METZGZAR *et al.,*1998; VALÉRIO; OLIVEIRA; RESENDE*,* 2006).

Indiscutivelmente dentre as diversas metodologias expostas, a estratégia de se usar a amplificação ou amplificação seguida de restrição do rDNA é uma alternativa que deve ser analisada, por ser prática, de baixo custo e facilmente reproduzível (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar genotipicamente através do seqüenciamento de aproximadamente 600 pares de bases da região 5' do rDNA 28S, vinte e oito linhagens fúngicas distribuídas em sete espécies diferentes do gênero *Candida,* e implementar uma metodologia capaz de diferenciá-las de forma rápida e eficaz, bem como analisar entre esses fungos algumas características associadas a patogenicidade.

2.2 Objetivos específicos

1- Identificar por seqüenciamento sete espécies do gênero *Candida* utilizando pelo menos quatro exemplares por espécie: *C. albicans, C. dubliniensis, C. Parapsilosis, C. glabrata, C. tropicalis, C. krusei e C. guilliermondii;*

2- Analisar alguns padrões gerados por endonucleases de restrição (*in silico* e *in vitro*) de uma região de 2800 bp contendo os genes 18S e 5,8S completos, os espaçadores internos transcritos (ITS) 1 e 2 completos e o gene 28S incompleto.

3- Fazer uma busca no "GenBank do NCBI" para verificar quais genomas mitocondriais dos fungos de interesse já estão disponíveis. Analisá-los a fim de identificar regiões possivelmente polimórficas. Construir iniciadores específicos capazes de amplificar por PCR tais regiões.

4- Verificar algumas metodologias que visam identificar possíveis fatores de virulência.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura para bactéria.

LB (meio completo): 1% Triptona (BD); 0,5% Extrato de Levedura (DIFCO); 5% NaCl (J. T. BAKER); 0,1% Dextrose (INLAB), pH 7,0.

LA (meio completo com adição do antibiótico Ampicilina): 1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 5% NaCl; 0,1% dextrose; 50 $mg.L^{-1}$ de ampicilina (CALBIOCHEM), pH 7,0.

3.2 Meios de cultura para levedura

WO (meio mínimo): 0,17% YNB (DIFCO), sem aminoácidos e sem sulfato de amônio; 0,50% sulfato de amônio; 2% dextrose, pH 4,5.

YPD (meio completo com dextrose): 1% extrato de levedura; 2% peptona (BD); 2% dextrose, pH 7,0.

YPD com Glicerol (estoque da levedura em –80º C): 1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% dextrose, 15% glicerol (USB), pH 7,0.

Para meios sólidos, foram adicionados 2% de agar (BD). Todos os meios de cultura foram submetidos à esterilização por autoclavagem durante 20 minutos a 121°C.

3.3 Ensaio da fosfolipase

A pesquisa de fosfolipase foi procedida conforme descrito inicialmente por Price, Wilkinson e Gentry (1982).

Inicialmente preparou-se uma emulsão a 10% de gema de ovo estéril com SF 0,9%. Separadamente, preparou-se um meio base contendo 1% peptona; 2% dextrose; 5% NaCL; 2% agar; 0,05 M de $CaCl_2$ e AD q.s.p 100 mL.

Depois da esterilização o meio base foi resfriado a 50 ºC para que a emulsão de ovo pudesse ser adicionada ao mesmo. A mistura foi homogeneizada e distribuída em placas de Petri estéreis. Depois da solidificação, as linhagens de interesse foram semeadas com uma alça calibrada de 1 μL (INLAB). As placas foram incubadas a 37º por 72h. Os ensaios foram realizados em triplicata tendo a linhagem ATCC 10231 de C. *albicans* como controle positivo e a linhagem CD 33 *de C. dubliniensis* como controle negativo.

Inicialmente o meio é translúcido, havendo a secreção da enzima, aparece uma região densa em torno da colônia como uma zona de precipitação. Para medir atividade enzimática calcula-se a razão Pz entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da zona de precipitação. Linhagens não produtoras de fosfolipase C têm Pz igual a 1.00, enquanto nas produtoras Pz é menor que 1.00.

3.4 Ensaio da proteinase

A pesquisa de proteinase foi realizada com base na metodologia empregada por Ruchel, Tegeler e Trost (1982). O meio base empregado, YCB, foi substituído por YNB acrescido de sulfato de amônio.

O meio modificado contém 0,17% YNB, sem aminoácidos e sem sulfato de amônio; 0,50% sulfato de amônio; 2% dextrose, 2% agar; e AD q.s.p 90 mL. Foi preparado separadamente o meio contendo 0,2% BSA fração V (Sigma) e 0,25 mL do polivitamínico Protovit (BAYER). Esse meio foi esterilizado por filtração em membrana Millipore de 0,22 μm.

O meio base foi resfriado a 50 ºC e foi adicionado a este o meio contendo BSA fração V e o polivitamínico. A mistura foi homogeneizada e distribuída em placas de Petri estéreis. Após a solidificação linhagens foram semeadas com uma alça calibradas de 1 μL. As placas foram incubadas a 37ºC por 5 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata e tendo a

linhagem ATCC 10231 de *C. albicans* como controle positivo e a linhagem FCF 14,1 também de *C. albicans* como controle negativo.

Ao redor das colônias que secretam a proteinase, deve aparecer uma região translúcida que indica a degradação da BSA, a medida da atividade enzimática também é indireta seguindo-se os padrões já descritos para a fosfolipase.

3.5 Ensaio de filamentação e invasão do agar

Para avaliar a capacidade das linhagens em invadir o agar, foram utilizados dois meios de cultura que induzem a filamentação (DIAS, 2006).

3.5.1 Meio SDC

O meio SDC é composto por 10% SFB v/v (CRIPION); 1,5% agar. A solução com agar foi inicialmente esterilizada e depois de resfriada a 50 ºC, foi adicionado o SFB. A mistura foi distribuída em placas de Petri estéreis e depois da solidificação, as linhagens foram semeadas com uma alça calibradas de 1 μL, na superfície do agar. As placas foram incubadas a 37ºC por 5 dias.

3.5.2 Meio SPIDER

O meio Spider contém 1% YNB; 1% manitol; 0,2% K_2PO_4 e 1,35% agar. Depois de ter sido esterilizado e resfriado, o meio foi distribuído em placas de Petri estéreis. As linhagens foram semeadas na superfície do agar depois da solidificado com uma alça calibrada de 1 μL.

3.5.3 Meio SDC modificado

Com o intuito de observar se *Candida spp* eram capazes de filamentar mesmo quando não estavam na presença direta de SFB, foi implementada uma adaptação ao meio SDC originalmente descrito. Dois meios foram preparados separadamente, o SDC e o WO. Ambos foram esterilizados como já descrito, contudo foi colocado na placa de Petri inicialmente, apenas uma pequena quantidade do meio SDC suficiente para cobrir o fundo da placa: um volume aproximado de 10 mL. Depois de solidificado, foi adicionado 30 mL do meio WO, gerando assim um meio estratificado onde o meio WO se interpunha entre as linhagens semeadas em sua superfície e o SFB no fundo da placa.

A idéia do meio estratificado também foi empregada para cultura em tubo de ensaio (usamos tubos de 1,5 mm de diâmetro interno e 150 mm de altura com 5 ml de SDC acrescido de 10 ml de WO após a solidificação do SDC) e tanto para placa quanto para os tubos foi utilizado o meio WO puro como controle negativo e o meio SDC puro como controle positivo.

3.6 Gêneros, espécies e linhagens utilizadas nesse trabalho

As espécies dos gêneros *Candida* e *Pichia* e suas respectivas linhagens utilizadas neste trabalho estão descritas na Tabela 6.

3.7 Extração do DNA genômico

Inicialmente foram testados três protocolos de extração com o intuito de verificar a eficiência de cada um e escolher entre eles o mais opropriado.

Tabela 6: As espécies e respectivas linhagens utilizadas no trabalho.

Espécies	Linhagnes	Referências
C. albicans	ATCC 10123	DONNELLY, *et al.*, 1999
	FCF 14	SHIMIZU, *et al., 1996*
	FCF 14.1	SHIMIZU, *et al., 1996*
	ICB 58	SHIMIZU, *et al., 1995*
	LGMG 1D	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	LGMG 1H	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	LGMG 1J	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	LGMG 1K	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	15D	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
C. dubliniensis	ATCC 777	Fornecida pela Drª Claudete de Paula/USP
	ATCC 778157	Fornecida pela Drª Claudete de Paula/USP
	CD 33	Fornecido pelo Dr. Coleman/Irlanda
	CD 36	DONNELLY, *et al.*, 1999
C. glabrata	LGMG 2A	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	LGMG 2B	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	LGMG 2C	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	LGMG 2D	Fornecida pela Profª Sônia Khouri/UNIVAP
	LGMG 2E	Fornecida pela Profª Sônia Khouri/UNIVAP
C. guilliermondii	ICB 06	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	LGMG 4B	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	H585	Fornecida pela Drª Claudete de Paula/USP
	H1020	Fornecida pela Drª Claudete de Paula/USP
C. krusei	ATCC 34135	Fornecida pela Profª Sônia Khouri/UNIVAP
	ATCC 6258	Fornecida por Graziela Back/UNESP
	LGMG 3A	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
C. lusitaniae	LGMG 6A	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
C. parapsilosis	ICB 15	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	LGMG 5A	Fornecida por Graziela Back/UNESP
	LGMG 5C	Fornecida por Graziela Back/UNESP
	LGMG 5D	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	LGMG 5E	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	LGMG 5F	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	LGMG 5G	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	LGMG 5H	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	LGMG 5I	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	LGMG 5J	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	LGMG 5K	Fornecida pela Drª Claudete de Paula/USP
	LGMG 5L	Fornecida pela Drª Claudete de Paula/USP
P. anomala	LGMG 8A	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	LGMG 8B	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
C. tropicalis	FCF 426	SHIMIZU, *et al., 1995*
	LGMG 7A	Fornecido pelo Dr. SHIMIZU
	LGMG 7B	Fornecida pela Profª Sônia Khouri/UNIVAP
	LGMG 7D	Fornecida por Graziela Back/UNESP
	LGMG 7E	Fornecida pela Profª Sônia Khouri/UNIVAP

3.7.1 Extração do DNA genômico em água.

Com auxílio de uma alça de platina previamente flambada, foi coletada uma pequena quantidade de células diretamente do meio de cultura sólido. As células foram ressuspendidas

em 75µL de água ultrapura estéril. A solução foi fervida por 10 minutos à 95ºC para promover a lise celular. O lisado foi posteriormente centrifugado por 10 minutos a 14 mil rpm em microcentrífuga de bancada marca Eppendorf modelo 5415 C e sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentífuga de 600µL (MÄHNB *et al.,* 2005).

3.7.2 Extração do DNA genômico em TE zimoliase.

Solução de extração: 150 µL de TE 10mM, pH 8 (10 mM Tris-HCl (USB), 1 mM EDTA (MERK)), e 50 µL de zimoliase (ICN) (0,5 mg diluída em 1M sorbitol (GETEC)). As células foram coletadas como já descrito e ressuspendidas em 200 µL da solução de extração. Incubou-se a solução por 15 minutos à 37ºC. O lisado foi posteriormente centrifugado por 10 minutos a 14 mil rpm, e o sobrenadante foi transferido para um eppendorf de 600µL (adaptado de ALISON *et al*, 1997).

3.7.3 Extração do DNA genômico com SDS, Proteinase K e lisozima

O terceiro protocolo é o mais elaborado dos três. A coleta das células foi idêntica à já descrita para os outros dois protocolos. As células foram ressuspendidas em 100 µL do tampão A (0,3M sacarose (MERK); 50 mM Tris-HCL pH 8,5; 5 mM EDTA. Foram adicionados 5µL da solução de lisozima (2mg/50mL, feita no momento do uso). Incubou-se à 37ºC por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 5 µL da solução de proteinase K (PK,Sigma) (1mg/50 µL) e 12 µL de SDS a 10% (Sigma). A mistura foi homogeneizada e incubada à 55ºC em banho maria (Marconi) por duas horas, agitando-se os tubos a cada 30 minutos. Findado o período de incubação, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 14 mil rpm e o sobrenadante foi transferindo para tubos de microcentífuga de 1,5 mL. Foi

adicionado 1/20 do volume de Tris-HCl, 1M pH 8,5 e v/v de FCI (25:24:1). Aplicou-se um vortex forte seguido de centrifugação a 14 mil rpm por 10 minutos. A fase superior foi coletadacom cautela para que não houvesse contaminação com o FCI e transferido para um eppendorf novo. Foi adicionado 2 vol. de éter etílico, novo vortex seguido de uma centrifugação por 5 minutos a 14 mil rpm. O éter foi aspirado em um sistema a vácuo. Foi adicionado RNAse (USB) para uma contração final de 10 $\mu g.mL^{-1}$ e incubado a 37 ºC por 1h. Repetiu-se a extração com FCI e éter. Após a última extração com éter, os tubos foram mantidos abertos em um banho seco (Thermolyne Type 16500) à 42ºC por 10 minutos para retirar o restante de éter da solução.

3.8 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose é o método utilizado para separar, identificar e purificar fragmentos de DNA. O DNA pode ser visualizado diretamente no gel após a adição brometo de etídio, um corante fluorescente que se intercala às bases do DNA, e observação sob luz ultravioleta no transluminador. A concentração do gel definirá a malha pela qual o DNA terá que migrar, sendo 1% a concentração mais utilizada, contudo esta concentração pode variar, conforme o tamanho da molécula que será observada (SAMBROOK; FRITSCH; MINIATIS, 1989).

O tampão usado para a eletroforese foi TBE 1X pH 8,0 (80mM Tris-HCl; 113mM ácido bórico (MERK) e 2,5mM EDTA).

3.8.1 Preparo do gel e aplicação das amostras para a eletroforese

Foi pesado em um erlenmayer 0,30g de agarose ultra-pura (Gibco BRL), diluída em seguida em 30mL de TBE 1X. A mistura foi aquecida em microondas para fundir a agarose.

Depois da fusão e resfriamento parcial, foi adicionado 1µL de brometo de etídio (CALBIOCHEM) (10mg/mL dissolvido em 100mM Tris pH 8,0). A solução foi transferida para o sistema de eletroforese (Bio Rad), adaptando-se conforme a necessidade pentes 8 ou 15 dentes. Depois da polimerização do gel, o pente foi retirado e o gel foi colocado na cuba de eletroforese (Mini-Sub-cell GT System by Bio Rad) com TBE 1X suficiente para cobrir todo o gel.

Com o auxílio de uma pipeta automática o gel foi carregado com as amostras previamente preparadas com adição de "STOP MIX" A (5,25g de Ficoll 400 (PHARMACIA), 75mg de SDS em 10mL de 5mM Tris-HCl pH 7,5. Acrescenta-se 3mL de 0,25M EDTA pH 7,5, 15 mg azul de bromofenol (MERK), 15mg xylene cyanol e completa-se com 5mM Tris-Cl pH 7,5 para um volume final de 15mL). A cuba de eletroforese foi ligada à uma fonte Power Pac 300, a 100V. Após o término da corrida o gel foi exposto ao transluminador Fotodyne FOTO/UV-26, usando máscara de proteção Fotodyne acoplada à máquina Kodak DC290 Digital. A análise foi feita através do software Kodak 1D 3.5.3 (Scientific Image Systems – Kodak).

3.9 Iniciadores utilizados

Os iniciadores utilizados neste trabalho estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7: iniciadores utilizados nesse trabalho.

Número	"Primer"	Seqüência	Referência
377	18S Fw	5' AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT	MEDLIN *et al.,* 1998
571	Uni-f	5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG	DONNELLY *et al.*, 1999
572	Uni-r	5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG	DONNELLY *et al.*, 1999
78SS	M13 Fw	5' GTA AAA CGA CGG CCA GT	TOPO TA cloning kit
79SR	M13 R	5' CAG GAA ACA GCT ATG AC	TOPO TA cloning kit

3.10 Amplificação por PCR

A reação de PCR foi usada para amplificar uma região do rDNA contendo em média 2800 bp na qual estão inclusos os genes 18S e 5.8S completos, as regiões ITS 1 e 2 completas, e a ponta 5´ do gene 28S; e um intron de 288 bp do gene de ACT1 de *C. dubliniensis*. A Figura 12 mostra a região do rDNA amplificada pelos iniciadores 377 e 572 e sumariza a estratégia completa empregada da amplificação à obtenção das seqüências que será discutida a seguir.

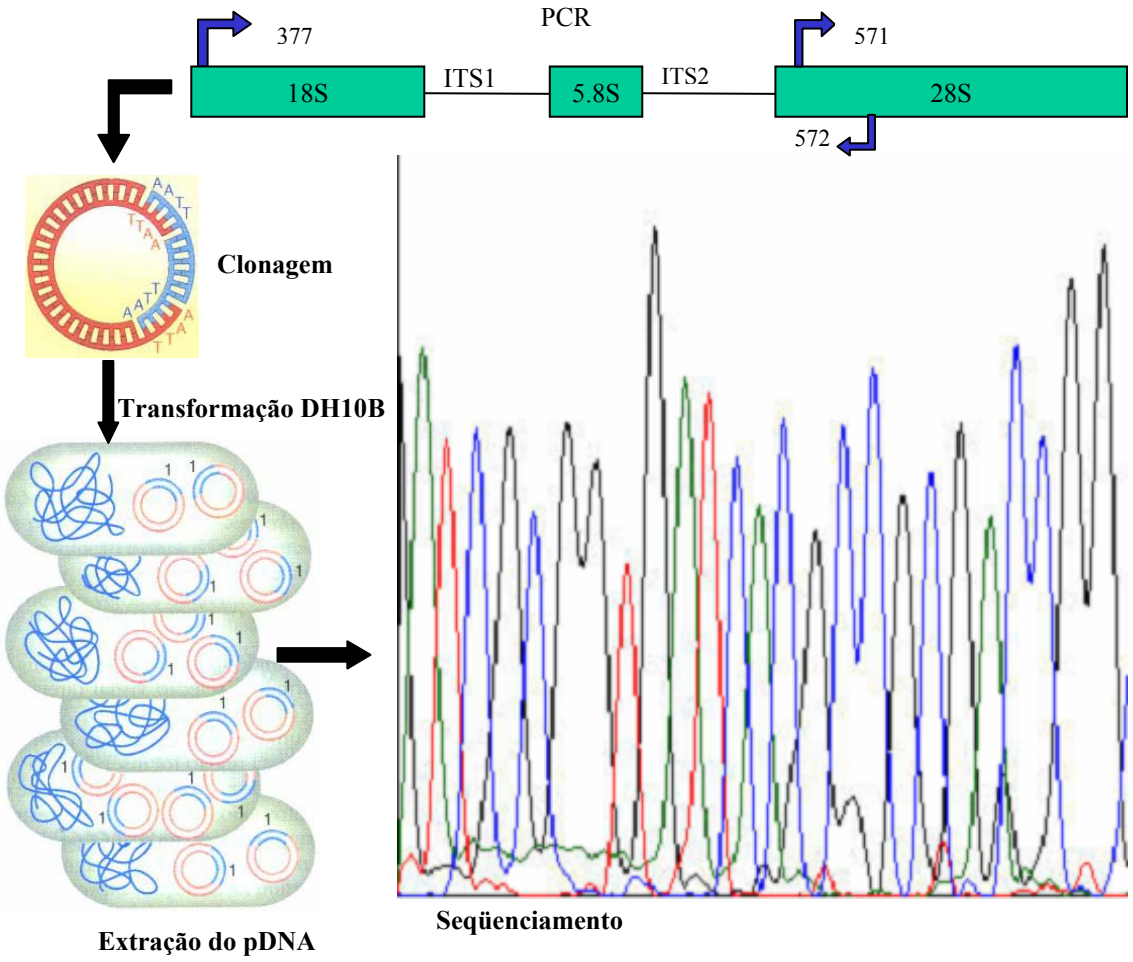


Figura 12: Esquema geral de amplificação do rDNA com os iniciadores 377 e 572, ligação do inserto no vetor de clonagem, transformação bacteriana, extração do pDNA e sequenciamento automático.

A reação de PCR foi feita com o "kit" da Promega. Para uma reação de 25 μL, foi utilizado 1X do tampão para PCR, 3 mM $MgCl_2$, 0,2mM de dNTPs, 0,4 μM dos iniciadores 377, 572, 573 e 574 (Tabela 2), 50 ng de DNA, 0,2μL de Taq DNA polimerase (5U/μL) e água Milli Q q.s.p.

A amplificação foi realizada no termociclador Express Thermal Cycler (Hybaid Limited), segundo o programa que consta de uma desnaturação inicial à 95ºC por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de: 45 segundos à 95ºC (desnaturação da cadeia recém sintetizada), 40 segundos à 58ºC (anelamento dos iniciadores) e 3 minutos à 72ºC (elongação da cadeia). Ao término dos 35 ciclos, para que a atividade terminal transferase da Taq DNA polimerase adicionasse uma base adenina às extremidades das cadeias criando pontas coesivas nos produtos da amplificação, foi procedido um único ciclo de elongação final à 72º por 10 minutos.

3.11 Purificação de DNA através do método de eletroeluição

Foi preparado TBE 10% (50 mL de TBE, 450 mL de água Milli Q), em seguida, as bandas desejadas foram cortadas diretamente do gel de agarose. Os fragmentos do gel contendo o DNA de interesse foram colocados dentro de sacos de diálise juntamente com o TBE 10%, As extremidades foram fechadas com um prendedor plástico especial, colocadas na cuba de eletroeluição e aplicado um potencial de 500V por 5 minutos.

Os géis foram descartados depois do procedimento, o líquido com o DNA eletroeluído foi aspirado e acondicionado em um tubo de microcentífuga. A solução foi tamponada com 50mM Tris-Cl pH 8,5. Foi adicionado à solução tamponada 1 vol. de FCI, dado um vortex forte e a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 14 mil rpm. O sobrenadante foi coletado e lavado por 2 vezes com 2 volumes de éter etílico.

Para precipitar o DNA foi adicionado 1\20 de vol. NaCl 5M e 1µL de glicogênio (10mg/ml), a solução foi homogeneizada e em seguida, foi acrescentado 3 vol. de etanol 100%. Os tubos ficaram a –80ºC por 20 min. Depois do resfriamento, os tubos foram centrifugados por 15 min. a 14 mil rpm na ultracentrifuga para garantir boa recuperação do DNA. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado 2 vezes com etanol 70%. O precipitado final foi ressuspendido em 15µL de TE 10 µM.

3.12 Quantificação em espectrofotômetro

A quantificação do produto de amplificação eletroeluído teve como objetivo melhores resultados na clonagem e RFLP. Um microlitro do DNA eletroeluído foi ressuspendido em 49 µ L de AD (diluição de 50 vezes) e quantificado por espectrofotometria no Spectrophotometer U 2001 HITACHI. O programa mede a absorbância nos comprimentos de onda de 260, 280 e 320 nm. Para converter o valor obtido com a leitura em 260 nm para a concentração de DNA em $ng.\mu L^{-1}$ foi usada a seguinte equação: WL260 x K x Dil = $ng.\mu L^{-1}$. Onde WL260 é o valor da leitura no comprimento de onda de 260 nm, K é a constante para o DNA (50) e Dil., a diluição usada para a amostra quantificada.

3.13 Preparo de células competentes

A linhagem DH10B de *E. coli* foi semeada em uma placa de LB fresca e incubada a 37ºC por 24 horas. No dia seguinte uma pequena quantidade células foi inoculada em 40mL de LB líquido num erlemayer especial com tubo lateral para leitura no colorímetro Klett. A cultura foi incubada no agitador rotatório (New Brunswick Scientific, Classic Series) a 37ºC. e 220 rpm. O crescimento bacteriano foi acompanhado até ter alcançada a leitura de 90 unidades no Klett, aproximadamente 2h.

A cultura foi transferida para um tubo Corning estéril de 50mL e centrifugada a 4 Krpm, a 4ºC por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspendido em 15mL de 10mM $CaCl_2$, 10mM Tris-HCl pH 8,0 gelado. A solução foi novamente centrifugada e o sobrenadante descartado.

As células foram ressuspendidas em 15mL de 50mM $CaCl_2$, 10mM Tric-HCl pH 8,0 gelado e deixadas no gelo por 30 min. Em seguida, a solução foi centrifugada a 4 mil rpm, a 4ºC por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido em 3mL do 50mM $CaCl_2$, 10mM Tric-HCl pH 8,0, permanecendo no gelo até o momento do uso.

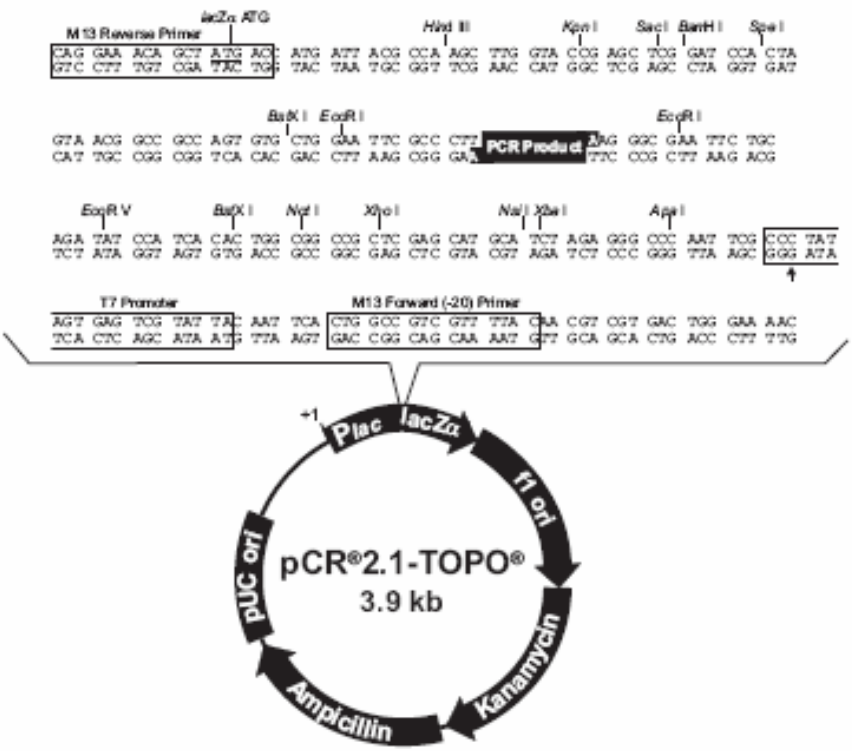
3.14 Clonagem

A clonagem dos produtos de PCR foi realizada com o Kit TOPO TA cloning da Invitrogen com o vetor pCR 2.1-TOPO (Figura 13). Foi feita uma reação de ligação otimizada, 25% da prevista pelo manual. Para um volume final de 1,5 µL, foi usado 30 ng de DNA eletroeluído, 0,25µL de "Salt Solution", 0,25 µL do vetor e água Milli Q estéril q.s.p. A mistura foi incubada a 23 ºC por 30 min.

3.15 Transformação bacteriana

O volume total da ligação foi adicionado em 200µL de suspensão de células competentes, a mistura bem homogeneizada foi colocada no gelo por 20 min. Foi aplicado um choque térmico a 42ºC por 2 min., seguido de gelo por 30 segundos. As células foram transferidas para um tudo Corning de 15mL contendo 3mL de LB. A cultura ficou no incubador rotatório a 220 rpm por 1 hora a 37ºC. Em seguida, a suspensão de células transformadas foi centrifugada por 3 min. a 4 mil rpm. Parte do sobrenadante foi desprezado,

e o precipitado foi ressuspenso no meio restante que permaneceu no tubo e plaqueado em meio LA. As placas foram incubadas a 37ºC por no máximo 24 horas.



Fonte: Manual do TOPO TA cloning Kit, Invitrogen

Figura 13: Mapa do vetor de clonagem utilizado no trabalho.

3.16 Coleta dos clones em meio seletivo

Os clones obtidos foram coletados com auxílio de palitos esterilizados e transferidos de maneira ordenada para outra placa LA grande preparada com 40 µL de X-GAL (USB) (40mg X-GAL dissolvidos em 1 mL de N,N-dimetilformamida). A nova placa foi incubada a 37°C por 24 horas.

3.17 Mini-preparação de DNA plasmidial

(adaptado de SAMBROOK , RUSSELL, 2001)

Os clones selecionados foram inoculados em 3 mL de LA em erlemayer de 10mL e permaneceram no incubador rotatório a 220 rpm a 37 ºC por 16 horas. Depois da incubação, 1,5 mL da cultura foram transferidos para um eppendorf de 1,5 mL. Os tubos foram centrifugados a 14 mil rpm por 30 segundos. O sobrenadante foi desprezado e o procedimento foi repetido com o volume final da cultura. O precipitado foi ressuspendido em 200µL de "Get" com RNAase (dextrose; 1M Tris-Cl pH 8,0; EDTA 0,2M e RNAase para um volume final de 10µg.mL^{-1}). A seguir foram adicionados 400µL de solução de lise (20% SDS e NaOH 10N) a cada tubo e a mistura foi bem homogeneizada.

Após 5 min. em presença da solução de lise, foram adicionados 400µL da solução de neutralização (acetato de potássio, ajustado o pH para 4,8 com ácido acético glacial) a cada tubo. Os tubos foram fechados e as soluções foram homogeneizadas por inversão, permanecendo, em seguida, no gelo por 20 minutos. Os tubos foram centrifuga-se por 15 minutos a 14 mil rpm.

Para precipitar o pDNA foram coletados 800 µL do sobrenadante e transferidos para um novo eppendorf acrescentando-se a este 700 µL de isopropanol. Os tubos foram tampados e homogeneizados por inversão permanecendo no freezer a –80 ºC por 10 min. Depois desse período, foram centrifugados por 10 min. a 14 mil rpm.

O sobrenadante foi desprezado e o excesso drenado com os tubos invertidos sobre papel absorvente. O precipitado foi lavado com 500 ul de etanol 70% e centrifugados por 5 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o excesso drenado com os tubos invertidos sobre papel absorvente. Para secar o pDNA os tubos abertos foram colocados por 3 min. no DNA Speed Vac (SAVANT). O precipitado final foi ressuspendido em Tris-Cl 10mM pH 7,5.

3.18 Seqüenciamento de DNA

As reações de seqüenciamento foram preparadas em microtubos estéreis de 0,2mL. Para uma reação de 10 µL foram utilizados 2,0 µL de mix Amersham (Applied Biosystems), 0,4 µM dos iniciadores 571, 572, 78SS e 79SR (um para cada reação) aproximadamente 800ng de pDNA e água Milli Q q.s.p.

A amplificação foi realizada no termociclador Express Thermal Cycler da Hybaid Limited, segundo o programa que consta de 40 ciclos de: 30 segundos à 95ºC; 30 segundos à 50ºC e 2 min. à 60ºC.

3.19 Precipitação das reações de sequenciamento

Foi adicionado às amostras 6µL de solução NG (Glicogênio dissolvido em 5M NH_4Oac), seguido de um pulso de centrifugação a mil rpm em centrífuga Jouan CR3i e agitação em um vortex de tubos 251 (Fanem - SP). Foram adicionados 50µL de etanol 95% homogeneizando-se por inversão 3x seguido de um pulso de mil rpm. As amostras foram levadas ao freezer -80°C permanecendo a esta temperatura por 20 min.

As amostras foram centrifugadas de 4 mil rpm por 40 min. à 4°C. O sobrenadante foi desprezado seguido de um pulso a 300 rpm com os tubos invertidos sobre papel absorvente. Foram adicionados 110µL de etanol 80% a cada amostra e centrifugou-se estas por 15 min. à 4°C a 4 mil rpm. Novamente desprezou-se o sobrenadante seguido de um pulso a 600 rpm com os tubos invertidos sobre papel absorvente. Lavou-se o precipitado mais uma vez com 110µL de etanol 80%, centrifugando-se por 5 min. O sobrenadante foi então desprezado seguido de um pulso de mil rpm com os tubos invertidos. Finalmente, as amostras foram submetidas à secagem a vácuo por exatamente 1 min.

3.20 Seqüenciamento automático

As amostras foram ressuspendidas em 10µL de formamida e em seguida submetidas à desnaturação por 5 min. a 95°C antes de aplicar as amostras no seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). As configurações do aparelho foram realizadas segundo recomendações do fabricante.

3.21 Análise das seqüências completas

As seqüências de proteínas correspondentes, no formato FASTA, foram processadas com programa BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool"), usando a ferramenta BLASTN ("nucleotide sequence against nucleotide database sequences") disponível no NCBI. Como critério para identificação foram examinados todos os "hits" com E-value 0.0 e com identidade acima de 98%.

3.22 Análise de PCR-RFLP

As seqüências de interesse para proceder a análise, *in silico,* dos padrões gerados por endonucleases de restrição estão disponíveis na base de dados de nucleotídeos do NCBI (Tabela 8). As seqüências foram analisadas *in silico* com o auxílio da ferramenta "Restriction Analysis" do software "GENE RUNNER" versão 3.05 (Copyright © 1994 Hastings Software, Inc) que gera uma tabela para cada espécie indicando a posição dos sítios de restrição que cada enzima reconhece. As tabelas foram comparadas entre si para a escolha da enzima com o melhor padrão de restrição.

3.23 Digestão com a enzima *Dde*I

A enzima *Dde* I (NEB) reconhece o sítio de restrição contendo a seqüência 5´ CTNAG 3´, conforme esquema mostrado na Figura 14. A digestão com a enzima *Dde*I seguiu as normas do fabricante, 1X tampão (NEB) 3, 500 ng de DNA e 5U da enzima. A digestão foi incubada inicialmente por 2h e em virtude dos resultados obtidos, adotou-se a incubação por 16h.

Tabela 8: Seqüências do rDNA usadas para análise de padrões de restrição *in silico.*

Espécie	Seqüência	Nº de acesso	Referência
C. albicans	18S ITS1/5.8/ITS2/28S	AF114470 AF217609	MORRIS *et al.*, 1999 IWEN; HENRY; HINRICHS, 2000
C. dubliniensis	18S ITS1/5.8/ITS2/28S	X99399 DQ105856	GILFILLAN *et al.,* 1998 LEINBERGER *et al.,* 2005
C. glabrata	18S ITS1/5.8/ITS2/28S	AB094140 AY939793	TSUYOSHI *e. a.l.,* 2005 LEINBERGER *e.t al.,* 2005
C. guilliermondii	18S ITS1/5.8/ITS2/28S	AJ508270 DQ249192	DANIEL; MEYER, 2003 PLAYFORD *et. Al.,* 2006
C. krusei	18S ITS1/5.8/ITS2/28S	DQ173672 EF203941	SUH; NGUYEN; BLACKWEL, 2006 YANG; LIU, 2007
C. parapsilosis	18S ITS1/5.8/ITS2/28S	AY055857 AY391843	PADOVAN; MELO; BRIONES, 2001 RYCOVSKA *e. A.l,* 2004
C. tropicalis	18S ITS1/5.8/ITS2/28S	AY497767 DQ680841	DIEZMANN *et al.*, 2004 SHENG; WANG; WANG, 2006

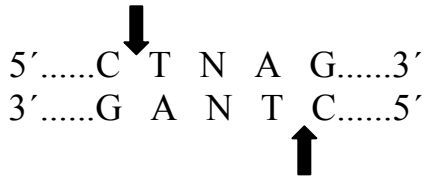


Figura 14: Sítio de restrição reconhecido pela enzima *Dde*I.

3.24 Análise dos genomas mitocondriais

Foi realizada uma análise, *in silico,* dos genomas mitocondriais que estavam disponíveis na base de dados do GenBank NCBI (Tabela 9). Com base nesses dados, foi criado, em CorelDRAW®10, um mapa para cada fungo, contendo todos os genes, excetuando-se os que codificam para tRNAs.

Tabela 9: Genomas mitocondriais completos disponíveis no NCBI.

Espécie	Número de acesso	Referência
C. albicans	AF285261	ANDERSON *et al*, 2001
C. glabrata	CGL511533	KOSZUL, *et al* 2003
K. thermotolerans	AJ634268	TALLA, *et al* 2005

Esta análise buscava identificar inicialmente quais genes eram comuns entre os genomas mitocondriais. Os genes foram alinhados pelo programa CLUSTAL X versão 1.83 e para analisar as seqüências consenso, foram utilizadas as ferramentas "*analysis oligo"* do programa GENE RUNNER versão 5.03, e PrimerSelect™ 5.00 do DNASTAR.

Os principais critérios usados para selecionar os alinhamentos que apresentavam as melhores características para serem usadas como "primer" foram o tamanho (entre 17 e 21 bases), a temperatura da anelamento, quantidades de bases guanina e timina (próximo a 50%), se formavam dímeros, e se a extremidade 3' estava livre e com pelo menos cinco bases consenso entre os três fungos.

3.25 Identificação fenotípica

Em colaboração com os laboratórios de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UNESP de São José dos Campos, foi realizada a identificação fenotípica clássica de 28

fungos estudados nesse trabalho. Empregou-se a técnica de microcultivo, produção de tubo germinativo, padrões de fermentação e assimilação, e os resultados foram gentilmente cedidos para o enriquecimento desse trabalho.

Em colaboração com o laboratório de Microbiologia da UNIVAP de São José dos campos foi realizada a identificação presuntiva em meio cromatogênico CHROMagar dos mesmos 28 fungos identificados fenotipicamente. As placas foram cedidas pela Profª Sônia Khouri que auxiliou na leitura dos resultados.

O CHROMagar (BD), um meio diferencial cromogênico, desenvolvido por Odds e Bernartes (1992), permite a identificação presuntiva através da coloração assumida pela colônia após metabolizar uma mistura de cromógenos existente no meio. Entretanto, segundo Odds e Bernartes (1994), para o gênero *Candida,* somente é possível distinguir *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

Hoje, é sabido que a diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* também não é possível, pois as duas assumem uma coloração esverdeada, diferindo pouco entre as tonalidades.

4 RESULTADOS

4.1 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada por três metodologias diferentes que variam quanto à complexidade, tempo de execução e custo do processo. A Figura 15 demonstra o resultado obtido pelas três técnicas empregadas.

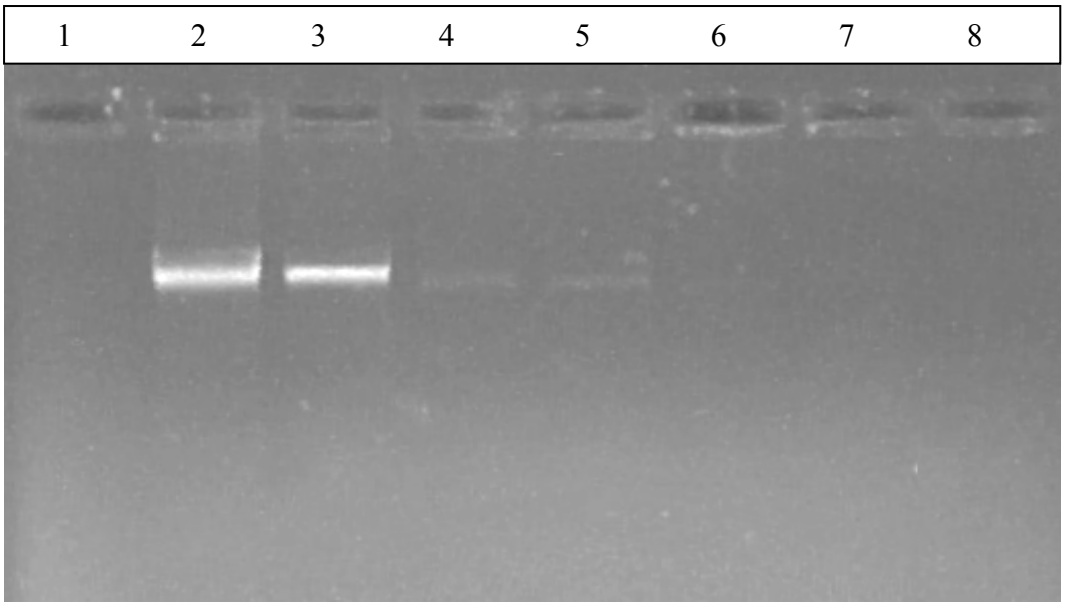


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose a 0,8% do DNA genômico extraído dos fungos *C. albicans* FCF 14 (números pares) e *C. dubliniensis* ATCC 777 (números ímpares). 1 e 8 controle negativo (AD e STOP MIX A); 2 e 3, extração pelo método com proteinase K; 4 e 5, extração pelo método com TE e zimoliase; 6 e 7, extração pelo método da fervura em água.

4.2 Amplificação do DNA por PCR

Foi possível amplificar por PCR os 2800 bp da região pretendida do rDNA, utilizando o produto de extração das três metodologias testadas (Figura. 16), contudo para o desenvolvimento do trabalho foi utilizada a extração pelo método com proteinase (Figura 17).

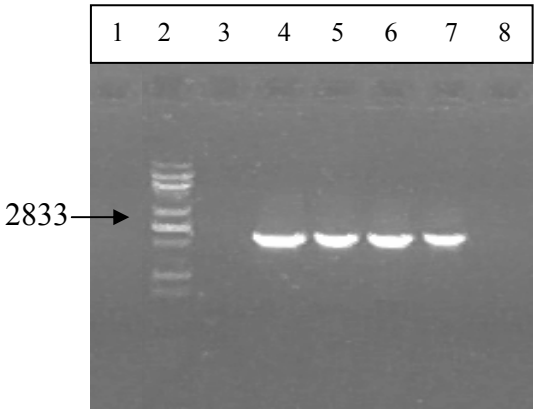


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose a 1% da amplificação do rDNA de *C. albicans* FCF 14. 1 e 8, AD e STOP MIX A; 2, padrão de peso molecular; 3, controle negativo da reação (AD); 4, controle positivo (DNA de *C. dubliniensis*, produto de extração anterior que sabidamente amplificava). 5, 6 e 7 amplificação a partir do produto de extração das três metodologias: com proteinase K, com TE e zimoliase e da fervura em água, respectivamente.

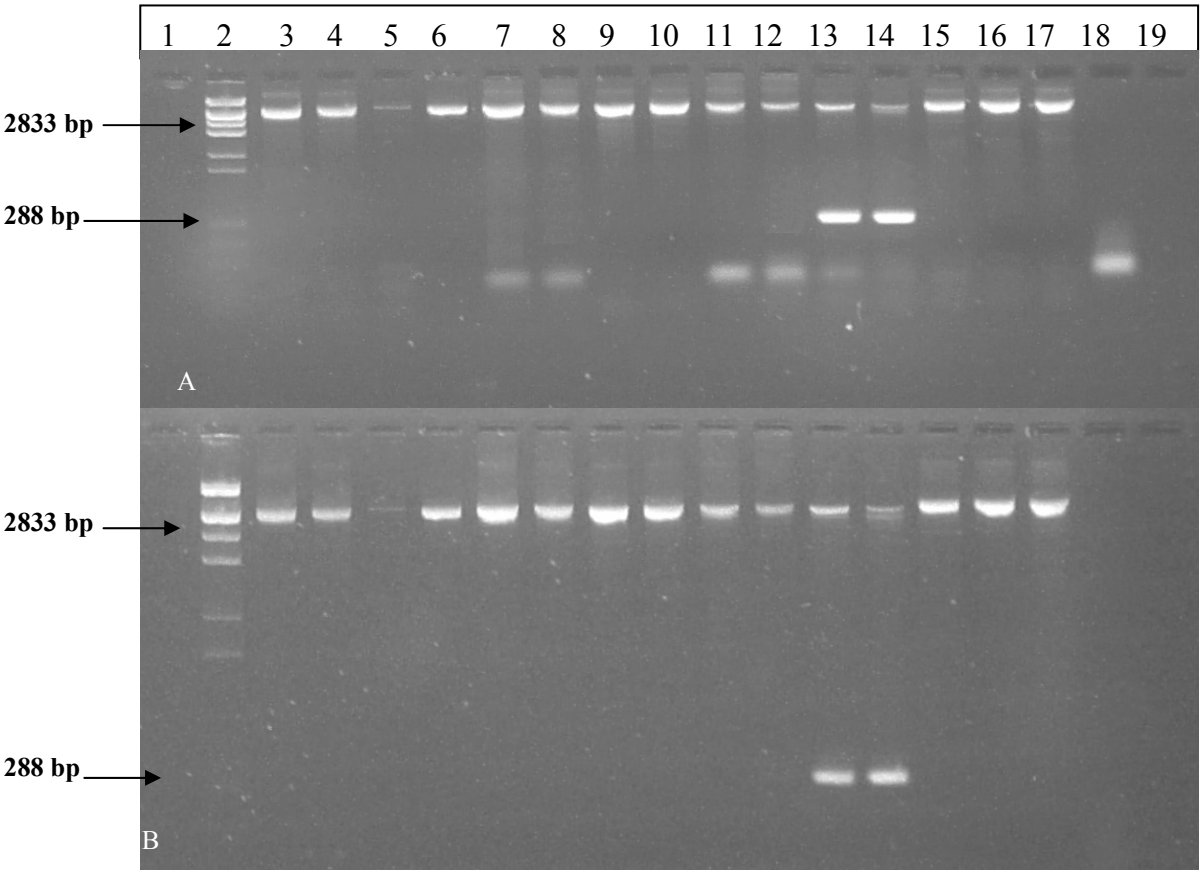


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose a 1% do produto da amplificação por PCR do rDNA e do intron ACT1. 1 e 19, AD e STOP MIX A; 2, padrão de peso molecular; 3 e 4, *C. albicans*;. 5 e 6, *C. krusei*; 7 e 8, *C. guilliermondii*; 9 e 10, *C. tropicalis*; 11 e 12 *C. parapsilosis*; 13 e 14, *C. dubliniensis* 15, 16 e 17; *C. glabrata.* (A) e (B), 20 e 60 min de eletroforese, respectivamente à 100V.

4.3 Purificação de DNA através do método de eletroeluição

Uma alíquota de 1 μL do DNA eletroeluído foi analisada em gel de agarose (Figura 18), para verificação da integridade e para se ter uma noção presuntiva da quantidade em massa por comparação com padrões de massa em gel de agarose

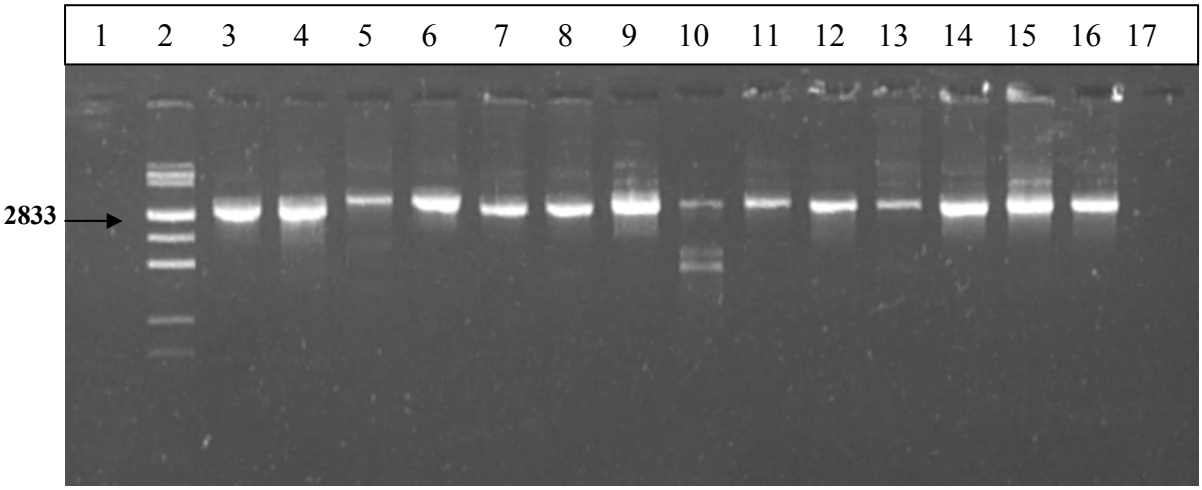


Figura 18: Eletroforese em gel de agarose a 1% do rDNA amplificado e eletroeluído. 1 e 17, AD e STOP MIX A; 2, padrão de tamanho e massa molecular; 3 e 4, *C. albicans*; 5 e 6, *C. glabrata*; 7 e 8, *C. krusei*; 9 e 10, *C. guilliermondii*; 11 e 12 *C. parapsilosis*; 13 e 14, *C. tropicalis*; 15 e16 *C. dubliniensis.*

A análise em gel de agarose evidencia dois dados interessantes, o primeiro diz respeito ao DNA degradado e portanto impróprio, tanto para a clonagem, quanto para a análise posterior PCR-RFLP, o segundo, reforça uma nuance percebida já no produto de amplificação (Figura 17), as bandas de *C. glabrata* são ligeiramente maiores que as das demais espécies.

4.4 Clonagem molecular

A metodologia empregada para a clonagem molecular foi bastante eficaz, mesmo fazendo uma reação utilizando apenas uma fração (¼) do protocolo do fabricante, o rendimento de transformantes por placa esteve sempre superior a 100 clones. Foi realizada a extração do pDNA para a confirmação da clonagem e posterior seqüenciamento (Figura 19).

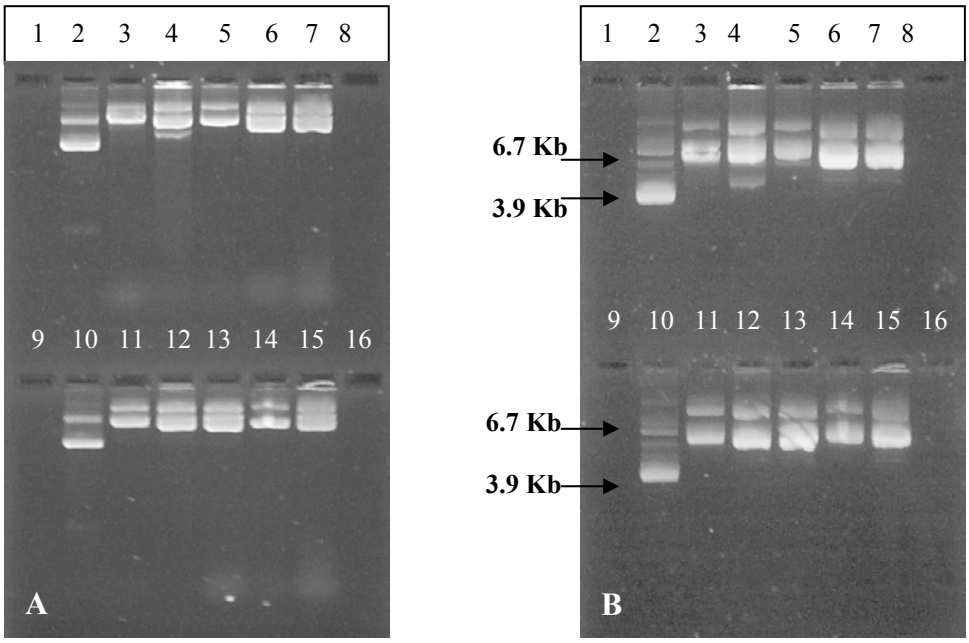


Figura 19: Eletroforese em gel de agarose a 1% do pDNA extraído de alguns clones. 1, 8, 9 e 16 AD e STOP MIX A; 2 e 10, controle negativo (vetor p21, recircularizado); 7 e 15 controle positivo (vetor com inserto confirmado por seqüenciamento); 3 a 6 e 11 a 14, confirmação da clonagem com o inserto de 2800, (a) e (b), 20 e 40 min de eletroforese respectivamente, à 100V.

4.5 Análise das seqüências através do GenBank

Os alinhamentos dos melhores "hits" obtidos a partir das comparações entre a seqüências obtidas e os dados disponíveis no "GenBank do NCBI" são mostrados nas Figuras de 20 a 64.

Em virtude da grande divergência encontrada entre a identificação fenotípica e por seqüenciamente foi necessário seqüenciar mais de um clone para cada espécie, inicialmente 4 sendo reduzido para 2, pois os dados gerados estavam sendo redundantes.

Trinta e oito seqüências geradas nesse trabalho foram depositadas no "GenBank - NCBI" e já estão disponíveis para consulta nessa base de dados (ver Anexo).

gb|AF156537.1|AF156537 *C. albicans*, strain TA62. 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1125 bits, Expect = 0.0, Identities = 612/613 (99%), Gaps = 1/613 (0%).

```
Query  3    CCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGG-TAAAAACCGCA  61
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
Sbjct  613  CCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTTAAAAACCGCA  554

Query  62   GTCCTCGGTCTAGGCTGGCAGTATCGTCAGAGGCTATAACACACAGCAGAAGCCGTGCCA  121
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  553  GTCCTCGGTCTAGGCTGGCAGTATCGTCAGAGGCTATAACACACAGCAGAAGCCGTGCCA  494

Query  122  CATTCCTCCGCCATTATCCTGCCGCTCCAAACCGATGCTGGCCCGGTAAACCGCAGCGGC  181
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  493  CATTCCTCCGCCATTATCCTGCCGCTCCAAACCGATGCTGGCCCGGTAAACCGCAGCGGC  434

Query  182  CGCCCCCGAGAGAGCAGCATGCAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAAC  241
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  433  CGCCCCCGAGAGAGCAGCATGCAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAAC  374

Query  242  AATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACT  301
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  373  AATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACT  314

Query  302  TGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGA  361
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  313  TGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGA  254

Query  362  GCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCGTCGAAGGAACTTTACACAGACCCGGGTCATCTCA  421
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  253  GCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCGTCGAAGGAACTTTACACAGACCCGGGTCATCTCA  194

Query  422  TCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCCGGG  481
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  193  TCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCCGGG  134

Query  482  CCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACGCCAAAGACGCCAGATTTCAAATTTG  541
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  133  CCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACGCCAAAGACGCCAGATTTCAAATTTG  74

Query  542  AGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTGAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCGC  601
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  73   AGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTGAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCGC  14

Query  602  TTATTGATATGCA  614
            |||||||||||||
Sbjct  13   TTATTGATATGCA  1
```

Figura 20: BLAST N com o “Query” da linhagem ATCC 10231. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|L28817.1|YSARRB *C. albicans* internal transcribed spacer 1 (ITS1); 5.8S ribosomal RNA; internal transcribed spacer 2 (ITS2) Length=4025. Score = 1026 bits, Expect = 0.0, Identities = 555/555 (100%), Gaps = 0/555 (0%).

```
Query  1     GCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  770   GCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAA  829

Query  61    GGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAG  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  830   GGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAG  889

Query  121   AATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGTAAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTT  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  890   AATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGTAAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTT  949

Query  181   TGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGAC  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  950   TGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGAC  1009

Query  241   CGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAA  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1010  CGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAA  1069

Query  301   GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGCTGCT  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1070  GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGCTGCT  1129

Query  361   CTCTCGGGGGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAAT  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1130  CTCTCGGGGGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAAT  1189

Query  421   GGCGGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATGCTGCCAGCC  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1190  GGCGGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATGCTGCCAGCC  1249

Query  481   TAGACCGAGGACTGCGGTTTTTAACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGT  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1250  TAGACCGAGGACTGCGGTTTTTAACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGT  1309

Query  541   CTTGAAACACGGACC  555
             |||||||||||||||
Sbjct  1310  CTTGAAACACGGACC  1324
```

Figura 21: BLAST N com o “Query” da linhagem FCF 14. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|DQ318805.1| *C. albicans* strain 245FC. 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1014 bits, Expect = 0.0
Identities = 552/553 (99%), Gaps = 1/553 (0%).

```
Query  4    GGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGG  63
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    GGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGG  60

Query  64   TATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAA  123
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   TATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAA  120

Query  124  TCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGTAAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTG  183
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  TCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGTAAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTG  180

Query  184  GGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCG  243
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  GGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCG  240

Query  244  ATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGT  303
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  ATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGT  300

Query  304  ACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGCTGCTCT  363
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  ACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGCTGCTCT  360

Query  364  CTCGGGGGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATGG  423
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  CTCGGGGGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATGG  420

Query  424  CGGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAGCCTA  483
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421  CGGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAGCCTA  480

Query  484  GACCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAA-TGATCTTAAGTCGCCCGTCT  542
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  481  GACCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAAATGATCTTAAGTCGCCCGTCT  540

Query  543  TGAAACACGGACC  555
            |||||||||||||
Sbjct  541  TGAAACACGGACC  553
```

Figura 22: BLAST N com o “Query” da linhagem FCF 14,1. BLAST em 21 de abril de 2007.

```
gb|AF156537.1|AF156537  C. albicans strain TA62 26S ribosomal
RNA gene, partial  sequence. Score = 1016 bits,  Expect = 0.0,
Identities = 552/553 (99%), Gaps = 0/553 (0%).

Query  1    AGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   AGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGA  120

Query  61   AGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  AGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGA  180

Query  121  GAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGTAAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  GAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGTAAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGT  240

Query  181  TTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  TTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGA  300

Query  241  CCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  CCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAA  360

Query  301  AGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGCTGC  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  AGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGCTGC  420

Query  361  TCTCTCGGGGGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAA  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421  TCTCTCGGGGGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAA  480

Query  421  TGGCGGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTGTAGCCTCTGACGATACTGCCAGC  480
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||
Sbjct  481  TGGCGGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAGC  540

Query  481  CTAGACCGAGGACTGCGGTTTTTAACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCG  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541  CTAGACCGAGGACTGCGGTTTTTAACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCG  600

Query  541  TCTTGAAACACGG  553
            |||||||||||||
Sbjct  601  TCTTGAAACACGG  613
```

Figura 23: BLAST N com o “Query” da linhagem ICB 58. BLAST em 21 de abril de 2007.

emb|X70659.1|CA25S *C. albicans* 25S rRNA Score = 1133 bits, Expect = 0.0 Identities = 615/616 (99%), Gaps = 0/616 (0%).

```
Query  1    GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  80   GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAA  139

Query  61   GCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  140  GCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAA  199

Query  121  GGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  200  GGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAG  259

Query  181  AATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGTAAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTT  240
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  260  AATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGTAAAGTTCCTTTGACGAGTCGAGTTGTT  319

Query  241  TGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGAC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  320  TGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGAC  379

Query  301  CGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  380  CGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAA  439

Query  361  GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGCTGCT  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  440  GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGCTGCT  499

Query  421  CTCTCGGGGGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAAT  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  500  CTCTCGGGGGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAAT  559

Query  481  GGCGGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAGCC  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  560  GGCGGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAGCC  619

Query  541  TAGACCGAGGACTGCGGtttttttACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCG  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  620  TAGACCGAGGACTGCGGTTTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCG  679

Query  601  TCTTGAAACACGGACC  616
            ||||||||||||||||
Sbjct  680  TCTTGAAACACGGACC  695
```

Figura 24: BLAST N com o “Query” da linhagem 15 D. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|DQ318806.1| *C. albicans* strain 245V 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 994 bits, Expect = 0.0
Identities = 538/538 (100%), Gaps = 0/538 (0%).

```
Query  13   TTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCG  72
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  13   TTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCG  72

Query  73   GCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAG  132
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  73   GCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAG  132

Query  133  ATGACCCGGGTCTGTGTAAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTA  192
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  133  ATGACCCGGGTCTGTGTAAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTA  192

Query  193  AGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTA  252
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  193  AGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTA  252

Query  253  CAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTG  312
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  253  CAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTG  312

Query  313  AAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGCTGCTCTCTCGGGGGCGGCCG  372
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  313  AAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGCTGCTCTCTCGGGGGCGGCCG  372

Query  373  CTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATGGCGGAGGAATGTGGC  432
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  373  CTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATGGCGGAGGAATGTGGC  432

Query  433  ACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAGCCTAGACCGAGGACTGCG  492
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  433  ACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAGCCTAGACCGAGGACTGCG  492

Query  493  GTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCTTGAAACACGGACC  550
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  493  GTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCTTGAAACACGGACC  550
```

Figura 25: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 1D. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|L28817.1|YSARRB *C. albicans* internal transcribed spacer 1 (ITS1); 5.8S ribosomal RNA; internal transcribed spacer 2 (ITS2).Score = 1027 bits, Expect = 0.0, Identities = 556/556 (100%), Gaps = 0/556 (0%).

```
Query  1     GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTTAAAAACC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1324  GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTTAAAAACC  1265

Query  61    GCAGTCCTCGGTCTAGGCTGGCAGCATCGTCAGAGGCTATAACACACAGCAGAAGCCGTG  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1264  GCAGTCCTCGGTCTAGGCTGGCAGCATCGTCAGAGGCTATAACACACAGCAGAAGCCGTG  1205

Query  121   CCACATTCCTCCGCCATTATCCTGCCGCTCCAAACCGATGCTGGCCCGGTAAACCGCAGC  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1204  CCACATTCCTCCGCCATTATCCTGCCGCTCCAAACCGATGCTGGCCCGGTAAACCGCAGC  1145

Query  181   GGCCGCCCCCGAGAGAGCAGCATGCAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTC  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1144  GGCCGCCCCCGAGAGAGCAGCATGCAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTC  1085

Query  241   AACAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGT  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1084  AACAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGT  1025

Query  301   ACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTT  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1024  ACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTT  965

Query  361   AGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCGTCGAAGGAACTTTACACAGACCCGGGTCATC  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  964   AGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCGTCGAAGGAACTTTACACAGACCCGGGTCATC  905

Query  421   TCATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCC  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  904   TCATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCC  845

Query  481   GGGCCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACGCCAAAGACGCCAGATTTCAAAT  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  844   GGGCCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACGCCAAAGACGCCAGATTTCAAAT  785

Query  541   TTGAGCTTTTGCCGCT  556
             ||||||||||||||||
Sbjct  784   TTGAGCTTTTGCCGCT  769
```

Figura 26: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 1H. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|DQ358867.2| *C. albicans*. YS44 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1014 bits, Expect=0.0 Identities = 551/552 (99%), Gaps = 0/552 (0%).

```
Query  4    CCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTAAAAACCGCAG  63
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  609  CCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTAAAAACCGCAG  550

Query  64   TCCTCGGTCTAGGCTGGCAGTATCGTCAGAGGCTATAACACACAGCAGAAGCCGTGCCAC  123
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  549  TCCTCGGTCTAGGCTGGCAGTATCGTCAGAGGCTATAACACACAGCAGAAGCCGTGCCAC  490

Query  124  ATTCCTCCGCCATTATCCTGCCGCTCCAAACCGATGCTGGCCCGGTAAACCGCAGCGGCC  183
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  489  ATTCCTCCGCCATTATCCTGCCGCTCCAAACCGATGCTGGCCCGGTAAACCGCAGCGGCC  430

Query  184  GCCCCCGAGAGAGCAGCATGCAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAACA  243
            ||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  429  GCCCCCGAGAGAGCAACATGCAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAACA  370

Query  244  ATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTT  303
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  369  ATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTT  310

Query  304  GTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAG  363
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  309  GTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAG  250

Query  364  CTGCATTCCCAAACAACTCGACTCGTCGAAGGAACTTTACACAGACCCGGGTCATCTCAT  423
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  249  CTGCATTCCCAAACAACTCGACTCGTCGAAGGAACTTTACACAGACCCGGGTCATCTCAT  190

Query  424  CGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCCGGGC  483
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  189  CGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCCGGGC  130

Query  484  CCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACGCCAAAGACGCCAGATTTCAAATTTGA  543
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  129  CCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACGCCAAAGACGCCAGATTTCAAATTTGA  70

Query  544  GCTTTTGCCGCT  555
            ||||||||||||
Sbjct  69   GCTTTTGCCGCT  58
```

Figura 27: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG J. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|DQ318806.1| *C. albicans* strain 245V 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 929, Expect = 0.0 Identities = 503/503 (100%), Gaps = 0/503 (0%).

```
Query  1    GTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTAAAAACCGC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  549  GTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTAAAAACCGC  490

Query  61   AGTCCTCGGTCTAGGCTGGCAGTATCGTCAGAGGCTATAACACACAGCAGAAGCCGTGCC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  489  AGTCCTCGGTCTAGGCTGGCAGTATCGTCAGAGGCTATAACACACAGCAGAAGCCGTGCC  430

Query  121  ACATTCCTCCGCCATTATCCTGCCGCTCCAAACCGATGCTGGCCCGGTAAACCGCAGCGG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  429  ACATTCCTCCGCCATTATCCTGCCGCTCCAAACCGATGCTGGCCCGGTAAACCGCAGCGG  370

Query  181  CCGCCCCCGAGAGAGCAGCATGCAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  369  CCGCCCCCGAGAGAGCAGCATGCAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAA  310

Query  241  CAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTAC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  309  CAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTAC  250

Query  301  TTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  249  TTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAG  190

Query  361  AGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCGTCGAAGGAACTTTACACAGACCCGGGTCATCTC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  189  AGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCGTCGAAGGAACTTTACACAGACCCGGGTCATCTC  130

Query  421  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCCGG  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  129  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCCGG  70

Query  481  GCCCAAAGATACCTTCTTCAAAT  503
            |||||||||||||||||||||||
Sbjct  69   GCCCAAAGATACCTTCTTCAAAT  47
```

Figura 28: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 1K. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|U57685.1|CDU57685 *C. dubliniensis* 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 977 bits, Expect = 0.0 Identities = 534/536 (99%), Gaps = 1/536 (0%).

```
Query  72   GCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTAAAAACCGCAGTCCTCGGTCTAGGCTG  131
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  571  GCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTAAAAACCGCAGTCCTCGGTCTAGGCTG  512

Query  132  GCAGTATCGTCAGAGGCTATAACACACAACCAAAGTCGTGCCACATTCCCCCGCCATTAT  191
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  511  GCAGTATCGTCAGAGGCTATAACACACAACCAAAGTCGTGCCACATTCCCCCGCCATTAT  452

Query  192  CCTACCGCTCCAAACCGATGCTGGCCCGGTAAACCGCAGAGGCCACCCCCGAAAGAGTAA  251
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  451  CCTACCGCTCCAAACCGATGCTGGCCCGGTAAACCGCAGAGGCCACCCCCGAAAGAGTAA  392

Query  252  CTTGCAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAACAATTTCACGTACTTTTT  311
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  391  CTTGCAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAACAATTTCACGTACTTTTT  332

Query  312  CACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTC  371
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  331  CACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTC  272

Query  372  TCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAA  431
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  271  TCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAA  212

Query  432  CTCGACTCGTCGAAGAAACTTTACATAGACCCGGGCCATCTCATCGCACGGGATTCTCAC  491
            |||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  211  CTCGACTCGTCGAAGGAACTTTACATAGACCCGGGCCATCTCATCGCACGGGATTCTCAC  152

Query  492  CCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCCGGGCCCAAAGATACCTTCTT  551
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  151  CCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCCGGGCCCAAAGATACCTTCTT  92

Query  552  CAAATTACAACTCGGACGCCAAAGACGCCAGATTTCAAATTTGAGC-TTTGCCGCT  606
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||
Sbjct  91   CAAATTACAACTCGGACGCCAAAGACGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCT  36
```

Figura 29: BLAST N com o “Query” da linhagem CD 33. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|AF405231.2|AF405231 *C. dubliniensis* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1003 bits, Expect = 0.0 Identities = 553/557 (99%), Gaps = 3/557 (0%).

```
Query  1     AGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  757   AGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGA  816

Query  61    AGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  817   AGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGA  876

Query  121   GAATCCCGTGCGATGAGATGGCCCGGGTCTATGTAAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGT  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  877   GAATCCCGTGCGATGAGATGGCCCGGGTCTATGTAAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGT  936

Query  181   TTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  937   TTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGA  996

Query  241   CCGATAGCGAACAAGTA-CAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAA  299
             |||||||||||||  | |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  997   CCGATAGCGAACAAC-AGCAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAA  1055

Query  300   AAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCAAGTTA  359
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1056  AAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCAAGTTA  1115

Query  360   CTCTTTCGGGGGTGGCCTCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGTAGGATA  419
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1116  CTCTTTCGGGGGTGGCCTCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGTAGGATA  1175

Query  420   ATGGCGGGGGAATGTGGCACGACTTTGGTTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAG  479
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1176  ATGGCGGGGGAATGTGGCACGACTTTGGTTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAG  1235

Query  480   CCTAGAGCCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCC  539
             |||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1236  CCTAGA-CCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCC  1294

Query  540   GTCTTGAAACACGGACC  556
             |||||||||||||||||
Sbjct  1295  GTCTTGAAACACGGACC  1311
```

Figura 30: BLAST N com o “Query” da linhagem CD 36. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|AF405231.2|AF405231 *C. dubliniensis* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 863 bits, Expect = 0.0 Identities = 481/487 (98%), Gaps = 3/487 (0%).

```
Query  1     GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGATTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTAAAAACCG  60
             ||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1311  GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTAAAAACCG  1252

Query  61    CAGTCCTCGGTCTAGGCTGGCAGTATCGTCAGAGGCTATAACACACAACCGAAGTCGTGC  120
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||
Sbjct  1251  CAGTCCTCGGTCTAGGCTGGCAGTATCGTCAGAGGCTATAACACACAACCAAAGTCGTGC  1192

Query  121   CACATTCCCCCGCCATTATCCTACCGCTCCAAACCGATGCTGGCCCGGTAAACCGCAGAG  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1191  CACATTCCCCCGCCATTATCCTACCGCTCCAAACCGATGCTGGCCCGGTAAACCGCAGAG  1132

Query  181   GCCACCCCCGAAAGAGTAACTTGCAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1131  GCCACCCCCGAAAGAGTAACTTGCAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCA  1072

Query  241   ACAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTG-T  299
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct  1071  ACAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGCT  1012

Query  300   ACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTT  359
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1011  -GTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTT  953

Query  360   AGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCGTCGAAGGAACTTTACATAGACCCGGGCCATC  419
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  952   AGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCGTCGAAGGAACTTTACATAGACCCGGGCCATC  893

Query  420   TCATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGATCAAGAGC  479
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct  892   TCATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGA-CAAGAGC  834

Query  480   CGGGCCC  486
             |||||||
Sbjct  833   CGGGCCC  827
```

Figura 31: BLAST N com o “Query” da linhagem ATCC 777. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|U57685.1|CDU57685 *C. dubliniensis* 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 894 bits, Expect = 0.0, Identities = 484/484 (100%), Gaps = 0/484 (0%)

```
Query  1    TTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCACA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  88   TTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCACA  147

Query  61   GAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGGCCCGGGTCTATGTAAAGTTCCTTCGACGAGT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  148  GAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGGCCCGGGTCTATGTAAAGTTCCTTCGACGAGT  207

Query  121  CGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  208  CGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTG  267

Query  181  GCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  268  GCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAG  327

Query  241  AGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTG  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  328  AGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTG  387

Query  301  CAAGTTACTCTTTCGGGGGTGGCCTCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  388  CAAGTTACTCTTTCGGGGGTGGCCTCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGG  447

Query  361  TAGGATAATGGCGGGGGAATGTGGCACGACTTTGGTTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATA  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  448  TAGGATAATGGCGGGGGAATGTGGCACGACTTTGGTTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATA  507

Query  421  CTGCCAGCCTAGACCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAG  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  508  CTGCCAGCCTAGACCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAG  567

Query  481  TCGC  484
            ||||
Sbjct  568  TCGC  571
```

Figura 32: BLAST N com o “Query” da linhagem ATCC 778157. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|AY198398.1| *C. glabrata* strain CBS 138 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 25S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1024 bits, Expect = 0.0, Identities = 565/570 (99%), Gaps = 2/570 (0%)

```
Query  4     GCGACAAAAGCGTCAAAATTAGAAATCTGGTACCTTTGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAG  63
             ||| ||||||| || ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4049  GCGGCAAAAGC-TC-AAATTTGAAATCTGGTACCTTTGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAG  4106

Query  64    AGTACCACTTTGGGACTGTACTTTGCCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATGGAGGGTG  123
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4107  AGTACCACTTTGGGACTGTACTTTGCCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATGGAGGGTG  4166

Query  124   AGAATCCCGTGTGGCGAGGGTGTCAGTTCTTTGTAAAGGGTGCTCGAAGAGTCGAGTTGT  183
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4167  AGAATCCCGTGTGGCGAGGGTGTCAGTTCTTTGTAAAGGGTGCTCGAAGAGTCGAGTTGT  4226

Query  184   TTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGA  243
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4227  TTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGA  4286

Query  244   CCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAA  303
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4287  CCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAA  4346

Query  304   AGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGCGCCCCTT  363
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4347  AGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGCGCCCCTT  4406

Query  364   GCCTCTCGTGGGCTTGGGACTCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCGGTTTTGGCGGCCGG  423
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4407  GCCTCTCGTGGGCTTGGGACTCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCGGTTTTGGCGGCCGG  4466

Query  424   AAAAAACCTAGGGAATGTGGCTCTGCGCCTCGGTGTAGAGTGTTATAGCCCTGGGGAATA  483
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4467  AAAAAACCTAGGGAATGTGGCTCTGCGCCTCGGTGTAGAGTGTTATAGCCCTGGGGAATA  4526

Query  484   CGGCCAGCCGGGACCGAGGACTGCGATACTTGTTATCTAGGATGCTGGCATAATGGTTAT  543
             ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4527  CGGCCAGTCGGGACCGAGGACTGCGATACTTGTTATCTAGGATGCTGGCATAATGGTTAT  4586

Query  544   ATGCCGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGG  573
             ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4587  ATGCCGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGG  4616
```

Figura 33: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 2A. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|AY198398.1| *C. glabrata* strain CBS 138 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 25S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1024 bits, Expect = 0.0 Identities = 561/564 (99%), Gaps = 1/564 (0%)

```
Query  1     GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGGCATATAACCATTATGCCAGCATCCTAGATAACAAGTA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4612  GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGGCATATAACCATTATGCCAGCATCCTAGATAACAAGTA  4553

Query  61    TCGCAGTCCTCGGTCCCGGCTGGCCGTATTCCCCAGGGCTATAACACTCTACACCGAGGC  120
             |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4552  TCGCAGTCCTCGGTCCCGACTGGCCGTATTCCCCAGGGCTATAACACTCTACACCGAGGC  4493

Query  121   GCAGAGCCACATTCCCTAGGTTTTTCCGGCCGCCAAAACCGATGCTGGCCCAGTGAGCT  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4492  GCAGAGCCACATTCCCTAGGTTTTTCCGGCCGCCAAAACCGATGCTGGCCCAGTGAGCT  4433

Query  181   GCGAGAGTCCCAAGCCCACGAGAGGCAAGGGGCGCAAAACACCATGTCTGATCAAATGCC  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4432  GCGAGAGTCCCAAGCCCACGAGAGGCAAGGGGCGCAAAACACCATGTCTGATCAAATGCC  4373

Query  241   CTTCCCTTTCAACAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTT  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4372  CTTCCCTTTCAACAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTT  4313

Query  301   CCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCTGTATTTAGCTTTAGATGGAATTTA  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4312  CCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCTGTATTTAGCTTTAGATGGAATTTA  4253

Query  361   CCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAGCACCCTTTACAAAGAA  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4252  CCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAGCACCCTTTACAAAGAA  4193

Query  421   CTGACACCCTCGCCACACGGGATTCTCACCCTCCATGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAG  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4192  CTGACACCCTCGCCACACGGGATTCTCACCCTCCATGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAG  4133

Query  481   GCAAAGTACAGTCCCAAAGTGGTACTCTCCAAATTACAAGTCGGGCACCAAAGGTACCAG  540
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  4132  GCAAAGTACAGTCCCAAAGTGGTACTCTCCAAATTACAACTCGGGCACCAAAGGTACCAG  4073

Query  541   ATTTCAAATTTGAGC-TTTGCCGC  563
             ||||||||||||||| ||||||||
Sbjct  4072  ATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGC  4049
```

Figura 34: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 2B. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|AY198398.1| *C. glabrata* strain CBS 138 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 25S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1026 bits, Expect = 0.0, Identities = 557/558 (99%), Gaps = 0/558 (0%)

```
Query  1     AAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTTGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGTACCAC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4055  AAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTTGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGTACCAC  4114

Query  61    TTTGGGACTGTACTTTGCCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATGGAGGGTGAGAATCCC  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4115  TTTGGGACTGTACTTTGCCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATGGAGGGTGAGAATCCC  4174

Query  121   GTGTGGCGAGGGTGTCAGTTCTTTGTAAAGGGTGCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAAT  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4175  GTGTGGCGAGGGTGTCAGTTCTTTGTAAAGGGTGCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAAT  4234

Query  181   GCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGACCGATAGC  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4235  GCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGACCGATAGC  4294

Query  241   GAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4295  GAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTG  4354

Query  301   AAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGCGCCCCTTGCCTCTCG  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4355  AAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGCGCCCCTTGCCTCTCG  4414

Query  361   TGGGCTTGGGACTCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCGGTTTTGGCGGCCGGAAAAAACC  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4415  TGGGCTTGGGACTCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCGGTTTTGGCGGCCGGAAAAAACC  4474

Query  421   TAGGGAATGTGGCTCTGCGCCTCGGTGTAGAGTGTTATAGCCCTGGGGAATACGGCCAGC  480
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4475  TAGGGAATGTGGCTCTGCGCCTCGGTGTAGAGTGTTATAGCCCTGGGGAATACGGCCAGT  4534

Query  481   CGGGACCGAGGACTGCGATACTTGTTATCTAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCC  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4535  CGGGACCGAGGACTGCGATACTTGTTATCTAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCC  4594

Query  541   CGTCTTGAAACACGGACC  558
             ||||||||||||||||||
Sbjct  4595  CGTCTTGAAACACGGACC  4612
```

Figura 35: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 2C. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|AY198398.1| *C. glabrata* strain CBS 138 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 25S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1074 bits, Expect = 0.0 Identities = 595/601 (99%), Gaps = 4/601 (0%)

```
Query  1     AAACCAACTGGGATTGCCTCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAA  60
             |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4013  AAACCAACTGGGATTGCCT-TAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAA  4071

Query  61    TCTGGTACCTTTGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGTACCACTTTGGGACTGTACTTTG  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4072  TCTGGTACCTTTGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGTACCACTTTGGGACTGTACTTTG  4131

Query  121   CCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATGGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGGTGTCA  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4132  CCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATGGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGGTGTCA  4191

Query  181   GTTCTTTGTAAAGGGTGCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTG  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4192  GTTCTTTGTAAAGGGTGCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTG  4251

Query  241   GTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4252  GTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATG  4311

Query  301   GAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAA  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4312  GAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAA  4371

Query  361   GGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGCGCCCCTTGCCTCTCGTGGGCTTGGGACTCTCG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4372  GGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGCGCCCCTTGCCTCTCGTGGGCTTGGGACTCTCG  4431

Query  421   CAGCTCACTGGGCCAGCATCGGTTTTGGCGGCCGGAAAAAACCTAGGGAATGTGGCTCTG  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4432  CAGCTCACTGGGCCAGCATCGGTTTTGGCGGCCGGAAAAAACCTAGGGAATGTGGCTCTG  4491

Query  481   CGCCTCGGTGTAGAGTGTTATAGCCCTGGGGA-TACGGCCAC-CGGGCCCGAGGACTGCG  538
             ||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||  |||| ||||||||||||
Sbjct  4492  CGCCTCGGTGTAGAGTGTTATAGCCCTGGGGAATACGGCCAGTCGGGACCGAGGACTGCG  4551

Query  539   ATACTTGTTATCTAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTGAAAGCACGGA  598
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct  4552  ATACTTGTTATCTAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTGAAA-CACGGA  4610

Query  599   C  599
             |
Sbjct  4611  C  4611
```

Figura 36: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 2D. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|AY198398.1| *C. glabrata* strain CBS 138, 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 25S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1033 bits, Expect = 0.0, Identities = 564/566 (99%), Gaps = 1/566(0%)

```
Query  1     AAGCGGCAAA-GCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTTGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAG  59
             |||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4047  AAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTTGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAG  4106

Query  60    AGTACCACTTTGGGACTGTACTTTGCCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATGGAGGGTG  119
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4107  AGTACCACTTTGGGACTGTACTTTGCCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATGGAGGGTG  4166

Query  120   AGAATCCCGTGTGGCGAGGGTGTCAGTTCTTTGTAAAGGGTGCTCGAAGAGTCGAGTTGT  179
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4167  AGAATCCCGTGTGGCGAGGGTGTCAGTTCTTTGTAAAGGGTGCTCGAAGAGTCGAGTTGT  4226

Query  180   TTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGA  239
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4227  TTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGA  4286

Query  240   CCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAA  299
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4287  CCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAA  4346

Query  300   AGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGCGCCCCTT  359
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4347  AGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGCGCCCCTT  4406

Query  360   GCCTCTCGTGGGCTTGGGACTCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCGGTTTTGGCGGCCGG  419
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4407  GCCTCTCGTGGGCTTGGGACTCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCGGTTTTGGCGGCCGG  4466

Query  420   AAAAAACCTAGGGAATGTGGCTCTGCGCCTCGGTGTAGAGTGTTATAGCCCTGGGGAATA  479
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4467  AAAAAACCTAGGGAATGTGGCTCTGCGCCTCGGTGTAGAGTGTTATAGCCCTGGGGAATA  4526

Query  480   CGGCCAGCCGGGACCGAGGACTGCGATACTTGTTATCTAGGATGCTGGCATAATGGTTAT  539
             ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4527  CGGCCAGTCGGGACCGAGGACTGCGATACTTGTTATCTAGGATGCTGGCATAATGGTTAT  4586

Query  540   ATGCCGCCCGTCTTGAAACACGGACC  565
             ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4587  ATGCCGCCCGTCTTGAAACACGGACC  4612
```

Figura 37: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 2E. BLAST em 21 de abril de 2007.

dbj|AB281300.1| *C. krusei* strain EM 72, 26S rRNA gene, partial sequence. Score = 1002 bits, Expect = 0.0, Identities = 547/549 (99%), Gaps = 1/549 (0%).

```
Query  1    AGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36   AGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTG  95

Query  61   GAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCAAGTCCCTTGGAACAGGGCGCCCAGGAGGGTGAGAG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  96   GAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCAAGTCCCTTGGAACAGGGCGCCCAGGAGGGTGAGAG  155

Query  121  CCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAGTGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAAT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  156  CCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAGTGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAAT  215

Query  181  GCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  216  GCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGC  275

Query  241  GAACAAGTGCTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTG  300
            |||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  276  GAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTG  335

Query  301  AAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGCGCCCGACATGGGGATTGCGCACCGCTGCCTCTCG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  336  AAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGCGCCCGACATGGGGATTGCGCACCGCTGCCTCTCG  395

Query  361  TGGGCGGCGCTCTGGGCTTTCCCTGGGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGGTT  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  396  TGGGCGGCGCTCTGGGCTTTCCCTGGGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGGTT  455

Query  421  CTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCGGGGAACCGA  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||
Sbjct  456  CTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCGGGGA-CCGA  514

Query  481  GGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGATGCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCCGTCTTGAA  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  515  GGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGATGCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCCGTCTTGAA  574

Query  541  ACACGGACC  549
            |||||||||
Sbjct  575  ACACGGACC  583
```

Figura 38: BLAST N com o “Query” da linhagem ATCC 34135. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|AY707865.1|*C. Krusei* strain WL2002, 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1072 bits, Expect = 0.0,Identities = 582/583 (99%), Gaps = 0/583 (0%).

```
Query  1    GAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  25   GAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAA  84

Query  61   TCGCGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCC  120
            ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  85   TCGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCC  144

Query  121  AAGTCCCTTGGAACAGGGCGCCCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCA  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  145  AAGTCCCTTGGAACAGGGCGCCCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCA  204

Query  181  GTGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  205  GTGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATT  264

Query  241  CCATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGAT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  265  CCATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGAT  324

Query  301  GAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATT  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  325  GAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATT  384

Query  361  GCGCCCGACATGGGGATTGCGCACCGCTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTGGGCTTTCCCT  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  385  GCGCCCGACATGGGGATTGCGCACCGCTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTGGGCTTTCCCT  444

Query  421  GGGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGGTTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGT  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  445  GGGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGGTTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGT  504

Query  481  TATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCGGGGACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGA  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  505  TATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCGGGGACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGA  564

Query  541  TGCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCCGTCTTGAAACACGGAC  583
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  565  TGCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCCGTCTTGAAACACGGAC  607
```

Figura 39: BLAST N com o “Query” da linhagem ATCC 6258. BLAST em 15 de maio de 2007.

gb|AY707865.1| *C. krusei* WL2002, 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1081 bits, Expect = 0.0 Identities = 585/585 (100%), Gaps = 0/585 (0%)

```
Query  1    GGTGTTGCGCCGTTCTGCCAGCATCCGTGACCTACACGGCCGCAGTCCTCGGTCCCCGCA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  587  GGTGTTGCGCCGTTCTGCCAGCATCCGTGACCTACACGGCCGCAGTCCTCGGTCCCCGCA  528

Query  61   CGCAGCATCTGGCCCTGGCTATAACACTCCGAAGAGCCACGTTCCAGAACCCCTTCTCCT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  527  CGCAGCATCTGGCCCTGGCTATAACACTCCGAAGAGCCACGTTCCAGAACCCCTTCTCCT  468

Query  121  GCAGCAAGAACCGATGCTGGCCCAGGGAAAGCCCAGAGCGCCGCCCACGAGAGGCAGCGG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  467  GCAGCAAGAACCGATGCTGGCCCAGGGAAAGCCCAGAGCGCCGCCCACGAGAGGCAGCGG  408

Query  181  TGCGCAATCCCCATGTCGGGCGCAATACCCTTCCCTTTCAACAATTTCACGTGCTGTTTC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  407  TGCGCAATCCCCATGTCGGGCGCAATACCCTTCCCTTTCAACAATTTCACGTGCTGTTTC  348

Query  241  ACTCTCTTTTCAAAGTGCTTTTCATCTTTCCTTCACAGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  347  ACTCTCTTTTCAAAGTGCTTTTCATCTTTCCTTCACAGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCT  288

Query  301  CGCCAGTATTTAGCCTTAGATGGAATTTACCACCCGCTTGGAGCTGCATTCCCAAACAAC  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  287  CGCCAGTATTTAGCCTTAGATGGAATTTACCACCCGCTTGGAGCTGCATTCCCAAACAAC  228

Query  361  TCGACTCGTCAGAAGGGCCTCACTGCTTCCGCCGGCATCCCACGGGGCTCTCACCCTCCT  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  227  TCGACTCGTCAGAAGGGCCTCACTGCTTCCGCCGGCATCCCACGGGGCTCTCACCCTCCT  168

Query  421  GGGCGCCCTGTTCCAAGGGACTTGGACACCGCCTTCCACACAGACTCCAACCTGCAATCT  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  167  GGGCGCCCTGTTCCAAGGGACTTGGACACCGCCTTCCACACAGACTCCAACCTGCAATCT  108

Query  481  ACAACTCGTGCCGCAAAGCACGATTTCAAATCTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGCTA  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  107  ACAACTCGTGCCGCAAAGCACGATTTCAAATCTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGCTA  48

Query  541  CTGAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATG  585
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  47   CTGAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATG  3
```

Figura 40: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 3A. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|EF191047.1| *C. guilliermondii* strain HJM, 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1016 bits, Expect = 0.0 Identities = 552/553 (99%), Gaps = 0/553 (0%).

```
Query  1    GTCCGTGTTTCAAGACGGGCGGTTTGGGATCATTATGCCAGCATCCTTGATAAAATCGCA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  612  GTCCGTGTTTCAAGACGGGCGGTTTGGGATCATTATGCCAGCATCCTTGATAAAATCGCA  553

Query  61   GTCCTCGGTCTAGGCAGGCAGCATCAACGCAGGCTATAACACTTCACCGAAGTAAGGTCA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||
Sbjct  552  GTCCTCGGTCTAGGCAGGCAGCATCAACGCAGGCTATAACACTTCACCGAAGTAAAGTCA  493

Query  121  CATTCCTACGCCATTATCCTACCGCCCAAACCGATGCTGGCCCGATAAGCTGCGGGTCAC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  492  CATTCCTACGCCATTATCCTACCGCCCAAACCGATGCTGGCCCGATAAGCTGCGGGTCAC  433

Query  181  CCCGCCACGAAGGCAAGGCTCACAAAATATCGAGTCTGATCTCAAACCCTTCCCTTTCAA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  432  CCCGCCACGAAGGCAAGGCTCACAAAATATCGAGTCTGATCTCAAACCCTTCCCTTTCAA  373

Query  241  CAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTAC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  372  CAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTAC  313

Query  301  TTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  312  TTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAG  253

Query  361  AGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAAGCACCTTACATAGAATTGGGCATCTCA  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  252  AGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAAGCACCTTACATAGAATTGGGCATCTCA  193

Query  421  TCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAAC  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  192  TCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAAC  133

Query  481  CCCAAGGTTACAATCTTCAAATTACAACTCGGACACCGAAGGCGCCAGATTTCAAATTTG  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  132  CCCAAGGTTACAATCTTCAAATTACAACTCGGACACCGAAGGCGCCAGATTTCAAATTTG  73

Query  541  AGCTTTTGCCGCT  553
            |||||||||||||
Sbjct  72   AGCTTTTGCCGCT  60
```

Figura 41: BLAST N com o “Query” da linhagem ICB 06. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|EF191047.1| *C. guilliermondii* strain HJM, 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1131 bits, Expect = 0.0, Identities = 612/612 (100%), Gaps = 0/612 (0%).

```
Query  1    GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGGTTTGGGATCATTATGCCAGCATCCTTGATAAAATCGC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  613  GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGGTTTGGGATCATTATGCCAGCATCCTTGATAAAATCGC  554

Query  61   AGTCCTCGGTCTAGGCAGGCAGCATCAACGCAGGCTATAACACTTCACCGAAGTAAAGTC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  553  AGTCCTCGGTCTAGGCAGGCAGCATCAACGCAGGCTATAACACTTCACCGAAGTAAAGTC  494

Query  121  ACATTCCTACGCCATTATCCTACCGCCCAAACCGATGCTGGCCCGATAAGCTGCGGGTCA  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  493  ACATTCCTACGCCATTATCCTACCGCCCAAACCGATGCTGGCCCGATAAGCTGCGGGTCA  434

Query  181  CCCCGCCACGAAGGCAAGGCTCACAAAATATCGAGTCTGATCTCAAACCCTTCCCTTTCA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  433  CCCCGCCACGAAGGCAAGGCTCACAAAATATCGAGTCTGATCTCAAACCCTTCCCTTTCA  374

Query  241  ACAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  373  ACAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTA  314

Query  301  CTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  313  CTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTA  254

Query  361  GAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAAGCACCTTACATAGAATTGGGCATCTC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  253  GAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAAGCACCTTACATAGAATTGGGCATCTC  194

Query  421  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAA  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  193  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAA  134

Query  481  CCCCAAGGTTACAATCTTCAAATTACAACTCGGACACCGAAGGCGCCAGATTTCAAATTT  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  133  CCCCAAGGTTACAATCTTCAAATTACAACTCGGACACCGAAGGCGCCAGATTTCAAATTT  74

Query  541  GAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTAAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCG  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  73   GAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTAAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCG  14

Query  601  CTTATTGATATG  612
            ||||||||||||
Sbjct  13   CTTATTGATATG  2
```

Figura 42: BLAST N com o “Query” da linhagem H585. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|EF191047.1| *C. guilliermondii* strain HJM, 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1131 bits, Expect = 0.0
Identities = 612/612 (100%), Gaps = 0/612 (0%).

```
Query  1    GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGGTTTGGGATCATTATGCCAGCATCCTTGATAAAATCGC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  613  GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGGTTTGGGATCATTATGCCAGCATCCTTGATAAAATCGC  554

Query  61   AGTCCTCGGTCTAGGCAGGCAGCATCAACGCAGGCTATAACACTTCACCGAAGTAAAGTC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  553  AGTCCTCGGTCTAGGCAGGCAGCATCAACGCAGGCTATAACACTTCACCGAAGTAAAGTC  494

Query  121  ACATTCCTACGCCATTATCCTACCGCCCAAACCGATGCTGGCCCGATAAGCTGCGGGTCA  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  493  ACATTCCTACGCCATTATCCTACCGCCCAAACCGATGCTGGCCCGATAAGCTGCGGGTCA  434

Query  181  CCCCGCCACGAAGGCAAGGCTCACAAAATATCGAGTCTGATCTCAAACCCTTCCCTTTCA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  433  CCCCGCCACGAAGGCAAGGCTCACAAAATATCGAGTCTGATCTCAAACCCTTCCCTTTCA  374

Query  241  ACAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  373  ACAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTA  314

Query  301  CTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  313  CTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTA  254

Query  361  GAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAAGCACCTTACATAGAATTGGGCATCTC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  253  GAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAAGCACCTTACATAGAATTGGGCATCTC  194

Query  421  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAA  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  193  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAA  134

Query  481  CCCCAAGGTTACAATCTTCAAATTACAACTCGGACACCGAAGGCGCCAGATTTCAAATTT  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  133  CCCCAAGGTTACAATCTTCAAATTACAACTCGGACACCGAAGGCGCCAGATTTCAAATTT  74

Query  541  GAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTAAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCG  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  73   GAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTAAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCG  14

Query  601  CTTATTGATATG  612
            ||||||||||||
Sbjct  13   CTTATTGATATG  2
```

Figura 43: BLAST N com o “Query” da linhagem H1020. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|EF191047.1| *C. guilliermondii* strain HJM, 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1088 bits, Expect = 0.0 Identities = 592/593 (99%), Gaps = 1/593 (0%).

```
Query  1    GGTTTGGGATCATTATGCCAGCATCCTTGATAAAATCGCAGTCCTCGGTCTAGGCAGGCA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  592  GGTTTGGGATCATTATGCCAGCATCCTTGATAAAATCGCAGTCCTCGGTCTAGGCAGGCA  533

Query  61   GCATCAACGCAGGCTATAACACTTCACCGAAGTAAAGTCACATTCCTACGCCATTATCCT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  532  GCATCAACGCAGGCTATAACACTTCACCGAAGTAAAGTCACATTCCTACGCCATTATCCT  473

Query  121  ACCGCCCAAACCGATGCTGGCCCGATAAGCTGCGGGTCACCCCGCCACGAAGGCAAGGCT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  472  ACCGCCCAAACCGATGCTGGCCCGATAAGCTGCGGGTCACCCCGCCACGAAGGCAAGGCT  413

Query  181  CACAAAATATCGAGTCTGATCTCAAACCCTTCCCTTTCAACAATTTCACGTACTTTTTCA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  412  CACAAAATATCGAGTCTGATCTCAAACCCTTCCCTTTCAACAATTTCACGTACTTTTTCA  353

Query  241  CTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  352  CTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTC  293

Query  301  GCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACT  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  292  GCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACT  233

Query  361  CGACTCTTCGAAAGCACCTTACATAGAATTGGGCATCTCATCGCACGGGATTCTCACCCT  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  232  CGACTCTTCGAAAGCACCTTACATAGAATTGGGCATCTCATCGCACGGGATTCTCACCCT  173

Query  421  CTGTGACGTCCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAACCCCAAGGTTACAATCTTCAA  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  172  CTGTGACGTCCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAACCCCAAGGTTACAATCTTCAA  113

Query  481  ATTACAACTCGGACACCGAAGGCGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCG  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  112  ATTACAACTCGGACACCGAAGGCGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCG  53

Query  541  CCGCTACTAAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCCGCTTATTGATATGC  593
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  52   CCGCTACTAAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCT-CCGCTTATTGATATGC  1
```

Figura 44: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 4B. BLAST em 21 de abril de 2007.

emb|AJ749821.1| *C. parapsilosis* 26S isolate ESAB2, 26S rRNA gene, partial sequence. Score = 1022 bits, Expect = 0.0
Identities = 555/556 (99%), Gaps = 0/556 (0%).

```
Query  1    GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGCCGAAGCCG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  613  GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGCCGAAGCCG  554

Query  61   CAGTCCTCAGTCTAAGCTGGCAGTATCGACAAAGACTATAACACACTACCGAAGCAGTGC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  553  CAGTCCTCAGTCTAAGCTGGCAGTATCGACAAAGACTATAACACACTACCGAAGCAGTGC  494

Query  121  CACATTTCTTTGCACTTATCCTACCGCTCAAACTGATGCTGGCCCGGTAAACTGTAGAGG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  493  CACATTTCTTTGCACTTATCCTACCGCTCAAACTGATGCTGGCCCGGTAAACTGTAGAGG  434

Query  181  CCACCCCCGAGAGAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  433  CCACCCCCGAGAGAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAA  374

Query  241  CAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTAC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  373  CAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTAC  314

Query  301  TTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  313  TTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAG  254

Query  361  AGCTGCATTCCCAAACAGCTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGTCTGGGACATCTC  420
            |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  253  AGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGTCTGGGACATCTC  194

Query  421  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAG  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  193  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAG  134

Query  481  ACCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACACTGAAAGTGCCAGATTTCAAATTT  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  133  ACCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACACTGAAAGTGCCAGATTTCAAATTT  74

Query  541  GAGCTTTTGCCGCTTC  556
            ||||||||||||||||
Sbjct  73   GAGCTTTTGCCGCTTC  58
```

Figura 45: BLAST N com o “Query” da linhagem ICB 15. BLAST em 21 de abril de 2007.

emb|AJ749821.1| *C. parapsilosis* 26S isolate ESAB2, 26S rRNA gene, partial sequence. Score = 1031 bits, Expect = 0.0
Identities = 561/563 (99%), Gaps = 1/563 (0%).

```
Query  1    GCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCAGTGTCCGACGTTGTA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct  52   GCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCAGTGTCCGA-GTTGTA  110

Query  61   ATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCAC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  111  ATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCAC  170

Query  121  AGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGTCCCAGACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  171  AGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGTCCCAGACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAG  230

Query  181  TCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  231  TCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATT  290

Query  241  GGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  291  GGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA  350

Query  301  GAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTT  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  351  GAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTT  410

Query  361  GTATGTTACTCTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGAGCGG  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  411  GTATGTTACTCTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGAGCGG  470

Query  421  TAGGATAAGTGCAAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTCGATA  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  471  TAGGATAAGTGCAAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTCGATA  530

Query  481  CTGCCAGCTTAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAG  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  531  CTGCCAGCTTAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAG  590

Query  541  TCGCCCGTCKTGAAACACGGACC  563
            ||||||||| |||||||||||||
Sbjct  591  TCGCCCGTCTTGAAACACGGACC  613
```

Figura 46: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5A. BLAST em 21 de abril de 2007.

emb|AJ749821.1| *C. parapsilosis* isolate ESAB2, 26S rRNA gene, partial sequence. Score = 1050 bits, Expect = 0.0 Identities = 576/579 (99%), Gaps = 3/579 (0%).

```
Query  1    GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGCCGAAGCCG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  613  GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGCCGAAGCCG  554

Query  61   CAGTCCTCAGTCTAAGCTGGCAGTATCGACAAAGACTATAACACACTACCGAAGCAGTGC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  553  CAGTCCTCAGTCTAAGCTGGCAGTATCGACAAAGACTATAACACACTACCGAAGCAGTGC  494

Query  121  CACATTTCTTTGCACTTATCCTACCGCTCAAACTGATGCTGGCCCGGTAAACTGTAGAGG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  493  CACATTTCTTTGCACTTATCCTACCGCTCAAACTGATGCTGGCCCGGTAAACTGTAGAGG  434

Query  181  CCACCCCCGAGAGAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  433  CCACCCCCGAGAGAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAA  374

Query  241  CAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTAC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  373  CAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTAC  314

Query  301  TTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  313  TTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAG  254

Query  361  AGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGTCTGGGACATCTC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  253  AGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGTCTGGGACATCTC  194

Query  421  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAG  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  193  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAG  134

Query  481  ACCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACGTCGGACACTGAAAGTGCCAGATTTCAAATT  540
            ||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  133  ACCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAAC-TCGGACACTGAAAGTGCCAGATTTCAAATT  75

Query  541  TGAGCTTTTGCCGCTTCACTCG-CGCTA-TAAGGCAATC  577
            ||||||||||||||||||||||| ||||| ||||||||||
Sbjct  74   TGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTAAGGCAATC  36
```

Figura 47: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5C. BLAST em 21 de abril de 2007.

emb|AJ749821.1| *C. parapsilosis* 26S isolate ESAB2, 26S rRNA gene, partial sequence, Score = 1020 bits, Expect = 0.0
Identities = 552/552 (100%), Gaps = 0/552 (0%).

```
Query  1    GCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   GCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAA  120

Query  61   GGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGAG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  GGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGAG  180

Query  121  AATCCCGTGCGATGAGATGTCCCAGACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  AATCCCGTGCGATGAGATGTCCCAGACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTT  240

Query  181  TGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGAC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  TGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGAC  300

Query  241  CGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  CGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAA  360

Query  301  GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACT  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACT  420

Query  361  CTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGAGCGGTAGGATAAGT  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421  CTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGAGCGGTAGGATAAGT  480

Query  421  GCAAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTCGATACTGCCAGCTT  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481  GCAAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTCGATACTGCCAGCTT  540

Query  481  AGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCT  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541  AGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCT  600

Query  541  TGAAACACGGAC  552
            ||||||||||||
Sbjct  601  TGAAACACGGAC  612
```

Figura 48: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5D. BLAST em 21 de abril de 2007.

emb|AJ749821.1| *C. parapsilosis* 26S isolate ESAB2, 26S rRNA gene, partial sequence. Score = 1066 bits, Expect = 0.0
Identities = 577/577 (100%), Gaps = 0/577 (0%).

```
Query  1    ATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37   ATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCA  96

Query  61   GTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  97   GTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTG  156

Query  121  GAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGTCCCAGACCTATGTAAA  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  157  GAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGTCCCAGACCTATGTAAA  216

Query  181  GTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  217  GTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATC  276

Query  241  TAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  277  TAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAA  336

Query  301  GAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATC  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  337  GAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATC  396

Query  361  AGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  397  AGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGC  456

Query  421  ATCAGTTTGAGCGGTAGGATAAGTGCAAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTAT  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  457  ATCAGTTTGAGCGGTAGGATAAGTGCAAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTAT  516

Query  481  AGTCTTTGTCGATACTGCCAGCTTAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGC  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  517  AGTCTTTGTCGATACTGCCAGCTTAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGC  576

Query  541  ATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCTTGAAACACGGACC  577
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  577  ATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCTTGAAACACGGACC  613
```

Figura 49: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5E. BLAST em 27 de abril de 2007.

gb|EF362748.1|*C. parapsilosis* strain 3eA2 26S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=597 Score = 904 bits (489), Expect = 0.0 Identities = 491/492 (99%), Gaps = 0/492 (0%) Strand=Plus/Plus

```
Query  1    TTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  104  TTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAG  163

Query  61   AGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCAGACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  164  AGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCAGACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTC  223

Query  121  GAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  224  GAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGG  283

Query  181  CGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  284  CGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGA  343

Query  241  GTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  344  GTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGT  403

Query  301  ATGTTACTCTTTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  404  ATGTTACTCTTTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTA  463

Query  361  GGAGAATTGCAAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTCATAGTCTTTGTCGATACT  420
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||
Sbjct  464  GGAGAATTGCAAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTCGATACT  523

Query  421  GCCAGCCTAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTC  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  524  GCCAGCCTAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTC  583

Query  481  GCCCGTCTTGAA  492
            ||||||||||||
Sbjct  584  GCCCGTCTTGAA  595
```

Figura 50: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5F. BLAST em 27 de abril de 2007.

gb|DQ318799.1| *C. parapsilosis* strain 157FC, 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 981 bits, Expect = 0.0 Identities = 536/538 (99%), Gaps = 1/538 (0%).

```
Query  49   CCTTGGTCC-TGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGCCGAA  107
            ||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  555  CCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGCCGAA  496

Query  108  GCCGCAGTCCTCAGTCTAAGCTGGCAGTATCGACAAAGACTATAACACACTACCGAAGCA  167
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  495  GCCGCAGTCCTCAGTCTAAGCTGGCAGTATCGACAAAGACTATAACACACTACCGAAGCA  436

Query  168  GTGCCACATTTCTTTGCACTTATCCTACCGCTCAAACTGATGCTGGCCCGGTAAACTGTA  227
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  435  GTGCCACATTTCTTTGCACTTATCCTACCGCTCAAACTGATGCTGGCCCGGTAAACTGTA  376

Query  228  GAGACCACCCCCGAGAGAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTT  287
            ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  375  GAGGCCACCCCCGAGAGAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTT  316

Query  288  TCAACAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACT  347
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  315  TCAACAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACT  256

Query  348  GTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCAC  407
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  255  GTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCAC  196

Query  408  TTAGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGTCTGGGACA  467
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  195  TTAGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGTCTGGGACA  136

Query  468  TCTCATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAG  527
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  135  TCTCATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAG  76

Query  528  CCAGACCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACACTGAAAGTGCCAGATTTC  585
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  75   CCAGACCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACACTGAAAGTGCCAGATTTC  18
```

Figura 51: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5G. BLAST em 21 de abril de 2007.

emb|AJ749821.1| *C. parapsilosis* 26S isolate ESAB2, 26S rRNA gene, partial sequence. Score = 1014 bits, Expect = 0.0 Identities = 552/553 (99%), Gaps = 1/553 (0%).

```
Query  1    GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGCCGAAGCCG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  613  GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGCCGAAGCCG  554

Query  61   CAGTCCTCAGTCTAAGCTGGCAGTATCGACAAAGACTATAACACACTACCGAAGCAGTGC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  553  CAGTCCTCAGTCTAAGCTGGCAGTATCGACAAAGACTATAACACACTACCGAAGCAGTGC  494

Query  121  CACATTTCTTTGCACTTATCCTACCGCTCAAACTGATGCTGGCCCGGTAAACTGTAGAGG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  493  CACATTTCTTTGCACTTATCCTACCGCTCAAACTGATGCTGGCCCGGTAAACTGTAGAGG  434

Query  181  CCACCCCCGAGAGAGTAACA-ACAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAA  239
            |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  433  CCACCCCCGAGAGAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAA  374

Query  240  CAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTAC  299
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  373  CAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTAC  314

Query  300  TTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAG  359
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  313  TTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAG  254

Query  360  AGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGTCTGGGACATCTC  419
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  253  AGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGTCTGGGACATCTC  194

Query  420  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAG  479
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  193  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAG  134

Query  480  ACCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACACTGAAAGTGCCAGATTTCAAATTT  539
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  133  ACCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACACTGAAAGTGCCAGATTTCAAATTT  74

Query  540  GAGCTTTTGCCGC  552
            |||||||||||||
Sbjct  73   GAGCTTTTGCCGC  61
```

Figura 52: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5H. BLAST em 27 de abril de 2007.

emb|AJ749821.1| *C. parapsilosis* 26S isolate ESAB2, 26S rRNA gene, partial sequence.Score = 1122 bits, Expect = 0.0 Identities = 609/610 (99%), Gaps =0/610 (0%).

```
Query  32   GTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGCCGAAGCCGC  91
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  612  GTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGCCGAAGCCGC  553

Query  92   AGTCCTCAGTCTAAGCTGGCAGTATCGACAAAGACTATAACACACTACCGAAGCAGTGCC  151
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  552  AGTCCTCAGTCTAAGCTGGCAGTATCGACAAAGACTATAACACACTACCGAAGCAGTGCC  493

Query  152  ACATTTCTTTGCACTTATCCTACCGCTCAAACTGATGCTGGCCCGGTAAACTGTAGAGGC  211
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  492  ACATTTCTTTGCACTTATCCTACCGCTCAAACTGATGCTGGCCCGGTAAACTGTAGAGGC  433

Query  212  CACCCCCGAGAGAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAAC  271
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  432  CACCCCCGAGAGAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAAC  373

Query  272  AATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACT  331
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  372  AATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACT  313

Query  332  TGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGA  391
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  312  TGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGA  253

Query  392  GCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGTCTGGGACATCTCA  451
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  252  GCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGTCTGGGACATCTCA  193

Query  452  TCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAGA  511
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  192  TCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAGA  133

Query  512  CCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACACTGAAAGTGCCAGATTTCAAATTTG  571
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  132  CCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACACTGAAAGTGCCAGATTTCAAATTTG  73

Query  572  AGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTAAGGCAATCCCTGTTGGTTTATTTTCCTCCGC  631
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
Sbjct  72   AGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTAAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCGC  13

Query  632  TTATTGATAT  641
            ||||||||||
Sbjct  12   TTATTGATAT  3
```

Figura 53: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5I. BLAST em 30 de abril de 2007.

emb|AJ749821.1| *C. parapsilosis* 26S isolate ESAB2, 26S rRNA gene, partial sequence. Score = 1112 bits, Expect = 0.0
Identities = 609/612 (99%), Gaps = 1/612 (0%).

```
Query  32   GCATATCAATAAGCGGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGA  91
            |||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    GCATATCAATAAGCGG-AGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGA  59

Query  92   AGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGA  151
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  60   AGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGA  119

Query  152  AGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGA  211
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  120  AGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGA  179

Query  212  GAATCCCGTGCGATGAGATGTCCCAGACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGT  271
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  180  GAATCCCGTGCGATGAGATGTCCCAGACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGT  239

Query  272  TTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGA  331
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  240  TTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGA  299

Query  332  CCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAA  391
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  300  CCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAA  359

Query  392  AGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATATTGTATGTTAC  451
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||
Sbjct  360  AGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTAC  419

Query  452  TCTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGAGCGGTAGGATAAG  511
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  420  TCTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGAGCGGTAGGATAAG  479

Query  512  TGCAAAGAAATGTGGCACTGCATCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTCGATACTGCCAGCT  571
            |||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  480  TGCAAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTCGATACTGCCAGCT  539

Query  572  TAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTC  631
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  540  TAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTC  599

Query  632  TTGAAACACGGA  643
            ||||||||||||
Sbjct  600  TTGAAACACGGA  611
```

Figura 54: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5J. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|AY894827.1| *C. parapsilosis* strain EXOC16. 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1110 bits, Expect = 0.0
Identities = 610/614 (99%), Gaps = 1/614 (0%).

```
Query  1    GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAA  60

Query  61   GCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   GCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAA  120

Query  121  GGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGAG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  GGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGAG  180

Query  181  AATCCCGTGCGATGAGATGACCCAGACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  AATCCCGTGCGATGAGATGACCCAGACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTT  240

Query  241  TGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGAC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  TGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGAC  300

Query  301  CGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  CGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAA  360

Query  361  GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACT  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACT  420

Query  421  CTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGAGAATT  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||
Sbjct  421  CTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGACAATT  480

Query  481  GCAAAGAAATGTGGCACTGCCTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTCGATACTACCAGCCT  540
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct  481  GCAAAGAAATGTGGCACTGCCTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTCGATACTGCCAGCCT  540

Query  541  AGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCT  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541  AGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCT  600

Query  601  TGAA-ACACGGACC  613
            |||| || ||||||
Sbjct  601  TGAACACCCGGACC  614
```

Figura 55: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5K. BLAST em 02 de juho de 2007.

gb|EF151422.1| C. parapsilosis strain FI005, 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1007 bits, Expect = 0.0
Identities = 552/555 (99%), Gaps = 1/555 (0%).

```
Query  1    GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGCCGAAGCCG  60
            |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  578  GGTCCGTG-TTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGCCGAAGCCG  520

Query  61   CAGTCCTCAGTCTAGGCTGGTAGTATCGACAAAGACTATAACACACTACCGAGGCAGTGC  120
            |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  519  CAGTCCTCAGTCTAGGCTGGCAGTATCGACAAAGACTATAACACACTACCGAGGCAGTGC  460

Query  121  CACATTTCTTTGCAATTCTCCTACCGCCCAAACTGATGCTGGCCCGGTAAACTGTAGAGG  180
            |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  459  CACATTTCTTTGCAATTGTCCTACCGCCCAAACTGATGCTGGCCCGGTAAACTGTAGAGG  400

Query  181  CCACCCCCGAGAGAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  399  CCACCCCCGAGAGAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAA  340

Query  241  CAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTAC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  339  CAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTAC  280

Query  301  TTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  279  TTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAG  220

Query  361  AGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGTCTGGGTCATCTC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  219  AGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGTCTGGGTCATCTC  160

Query  421  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAG  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  159  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAG  100

Query  481  ACCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACACTGAAAGTGCCAGATTTCAAATTT  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  99   ACCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACACTGAAAGTGCCAGATTTCAAATTT  40

Query  541  GAGCTTTTGCCGCTT  555
            |||||||||||||||
Sbjct  39   GAGCTTTTGCCGCTT  25
```

Figura 56: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 5L. BLAST em 21 de abril de 2007.

gb|EF063126.1|*C. lusitaniae* strain EXOC7, 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 959 bits (519), Expect = 0.0
Identities = 526/529 (99%), Gaps = 1/529 (0%).

```
Query  1    GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGGCTTGCAACCATTACGCCAGCGTCCTAGAATCGCAGGC  60
            |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  560  GGTCCGTGGTTCAAGACGGGCGGCTTGCAACCATTACGCCAGCGTCCTAGAATCGCAGGC  501

Query  61   CTCGAAAAGGGATGGAGGCGTCAACACGAGCTATAACACGCGCGCCCGAAGGTGCGCGCC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  500  CTCGAAAAGGGATGGAGGCGTCAACACGAGCTATAACACGCGCGCCCGAAGGTGCGCGCC  441

Query  121  ACATTCTCGAGTTCTTGTTCCTCCCCCCTTTTCGACGCTGGCCCGGTAAAACCGTGTCTG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  440  ACATTCTCGAGTTCTTGTTCCTCCCCCCTTTTCGACGCTGGCCCGGTAAAACCGTGTCTG  381

Query  181  CTTGCAAGCCCTTCCCTTTCAACAATTTCACGTGCTGTTTCACTCTCTTTTCAAAGTGCT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  380  CTTGCAAGCCCTTCCCTTTCAACAATTTCACGTGCTGTTTCACTCTCTTTTCAAAGTGCT  321

Query  241  TTCCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAG  300
            || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  320  TTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAG  261

Query  301  ATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCGTCGGAGCCGCG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  260  ATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCGTCGGAGCCGCG  201

Query  361  GTGCAAAGAGTCGGCGTGCGCCATACGGGGCTCTCACCCTCCCAGGCGCCATGTTCCAAT  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  200  GTGCAAAGAGTCGGCGTGCGCCATACGGGGCTCTCACCCTCCCAGGCGCCATGTTCCAAT  141

Query  421  GGACTTGGGCGCGGCCGACTCAGACCACGAAACCTTCAAATTACAATTCCCGCAGGATTT  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  140  GGACTTGGGCGCGGCCGACTCAGACCACGAAACCTTCAAATTACAATTCCCGCAGGATTT  81

Query  481  CAAATTTGAGC-TTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGGGGCAATCCCTG  528
            ||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  80   CAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGGGGCAATCCCTG  32
```

Figura 57: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 6A. BLAST em 21 de abril de 2007.

dbj|AB281286.1| *C. tropicalis* strain: EM 14, gene for 26S rRNA, partial sequence. Score = 1026 bits, Expect = 0.0
Identities = 555/555 (100%), Gaps = 0/555 (0%).

```
Query  1    GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTATAAACCG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  589  GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTATAAACCG  530

Query  61   CAGTCCTCAGTCTAGGCTGGCAGTATCGACGAAGGCTATAACACACAACCGAAGCCGTGC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  529  CAGTCCTCAGTCTAGGCTGGCAGTATCGACGAAGGCTATAACACACAACCGAAGCCGTGC  470

Query  121  CACATTCCAACGCAATTCTCCTACCGCCCAAACTGATGCTGGCCCGATAAACTGTAGAGG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  469  CACATTCCAACGCAATTCTCCTACCGCCCAAACTGATGCTGGCCCGATAAACTGTAGAGG  410

Query  181  CCACCCCCGAAGAAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  409  CCACCCCCGAAGAAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAA  350

Query  241  CAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTAC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  349  CAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTAC  290

Query  301  TTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  289  TTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAG  230

Query  361  AGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGCCTGGATCATCTC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  229  AGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGCCTGGATCATCTC  170

Query  421  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAG  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  169  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAG  110

Query  481  ACCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACTCTGAAAGAGCCAGATTTCAAATTT  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  109  ACCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACTCTGAAAGAGCCAGATTTCAAATTT  50

Query  541  GAGCTTTTGCCGCTT  555
            |||||||||||||||
Sbjct  49   GAGCTTTTGCCGCTT  35
```

Figura 58: BLAST N com o “Query” da linhagem FCF 426. BLAST em 21 de abril de 2007.

dbj|AB281286.1| *C. tropicalis* strain: EM 14, gene for 26S rRNA, partial sequence. Score = 1055 bits, Expect = 0.0 Identities = 579/583 (99%), Gaps = 1/583 (0%).

```
Query  1    ACA-GGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCT  59
            ||| ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  7    ACAGGGATTNCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCT  66

Query  60   CTTTCAGAGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGT  119
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  67   CTTTCAGAGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGT  126

Query  120  TTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGATCCAGGCCTA  179
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  127  TTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGATCCAGGCCTA  186

Query  180  TGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAACGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAAT  239
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  187  TGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAAT  246

Query  240  TCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGA  299
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  247  TCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGA  306

Query  300  TGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTT  359
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  307  TGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTT  366

Query  360  GGGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTTCTTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTATCGG  419
            | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  367  GAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTTCTTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTATCGG  426

Query  420  GCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGAGAATTGCGTTGGAATGTGGCACGGCTTCGGTTGTG  479
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  427  GCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGAGAATTGCGTTGGAATGTGGCACGGCTTCGGTTGTG  486

Query  480  TGTTATAGCCTTCGTCGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACTGCGGTTTATACCTAGGAT  539
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  487  TGTTATAGCCTTCGTCGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACTGCGGTTTATACCTAGGAT  546

Query  540  GTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCTTGAAACACGGACC  582
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  547  GTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCTTGAAACACGGACC  589
```

Figura 59: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 7A. BLAST em 30 de abril de 2007.

dbj|AB281286.1| *C. tropicalis* strain: EM 14, gene for 26S rRNA, partial sequence. Score = 1040 bits, Expect = 0.0 Identities = 568/570 (99%), Gaps = 1/570 (0%).

```
Query  1    GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCACTATGCCAACATCCTAGGTATAAACCG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  589  GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTATAAACCG  530

Query  61   CAGTCCTCAGTCTAGGCTGGCAGTATCGACGAAGGCTATAACACACAACCGAAGCCGTGC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  529  CAGTCCTCAGTCTAGGCTGGCAGTATCGACGAAGGCTATAACACACAACCGAAGCCGTGC  470

Query  121  CACATTCCAACGCAATTCTCCTACCGCCCAAACTGATGCTGGCCCGATAAACTGTAGAGG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  469  CACATTCCAACGCAATTCTCCTACCGCCCAAACTGATGCTGGCCCGATAAACTGTAGAGG  410

Query  181  CCACCCCCGAAGAAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  409  CCACCCCCGAAGAAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAA  350

Query  241  CAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTAC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  349  CAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTAC  290

Query  301  TTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  289  TTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAG  230

Query  361  AGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGCCTGGATCATCTC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  229  AGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGCCTGGATCATCTC  170

Query  421  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAG  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  169  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAG  110

Query  481  ACCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACTCTGAAAGAGCCAGATTTCAAATTT  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  109  ACCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACTCTGAAAGAGCCAGATTTCAAATTT  50

Query  541  GAGC-TTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTA  569
            |||| |||||||||||||||||||||||||
Sbjct  49   GAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTA  20
```

Figura 60: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 7B. BLAST em 21 de abril de 2007.

dbj|AB281286.1| *C. tropicalis* strain: EM 14, gene for 26S rRNA, partial sequence. Score = 1013 bits, Expect = 0.0
Identities = 553/555 (99%), Gaps = 1/555 (0%).

```
Query  1    GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTATAAACCG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  589  GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTATAAACCG  530

Query  61   CAGTCCTCAGTCTAGGCTGGCAGTATCGACGAAGGCTATAACACACAACCGAAGCCGTGC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  529  CAGTCCTCAGTCTAGGCTGGCAGTATCGACGAAGGCTATAACACACAACCGAAGCCGTGC  470

Query  121  CACATTCCAACGCAATTCTCCTACCGCCCAAACTGATGCTGGCCCGATAAACTGTAGAGG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  469  CACATTCCAACGCAATTCTCCTACCGCCCAAACTGATGCTGGCCCGATAAACTGTAGAGG  410

Query  181  CCACCCCCGAAGAAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  409  CCACCCCCGAAGAAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAA  350

Query  241  CAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTAC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  349  CAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTAC  290

Query  301  TTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  289  TTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAG  230

Query  361  AGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGCCTGGATCATCTC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  229  AGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGCCTGGATCATCTC  170

Query  421  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAG  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  169  ATCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAG  110

Query  481  ACCCAAAGATACCTTCTTCAAATAACAACTCGGACTCTGAAAGAGCCAGATTTCAAATTT  540
            |||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  109  ACCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACTCGGACTCTGAAAGAGCCAGATTTCAAATTT  50

Query  541  GAGC-TTTGCCGCTT  554
            |||| |||||||||||
Sbjct  49   GAGCTTTTGCCGCTT  35
```

Figura 61: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 7D. BLAST em 21 de abril de 2007.

emb|AJ749824.1| *C. tropicalis* 26S rRNA gene, isolate ESAB7.
Score = 1125 bits (609), Expect = 0.0, Identities = 611/612 (99%), Gaps = 0/612 (0%).

```
Query  55   CATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAG  114
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2    CATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAG  61

Query  115  CGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTCAGAGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAG  174
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  62   CGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTCAGAGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAG  121

Query  175  GTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGA  234
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  122  GTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGA  181

Query  235  ATCCCGTGCGATGAGATGATCCAGGCCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTT  294
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  182  ATCCCGTGCGATGAGATGATCCAGGCCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTT  241

Query  295  GGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACC  354
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  242  GGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACC  301

Query  355  GATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAG  414
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  302  GATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAG  361

Query  415  TACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTT  474
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  362  TACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTT  421

Query  475  CTTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTATCGGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGAGAATTG  534
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  422  CTTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTATCGGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGAGAATTG  481

Query  535  CGTTGGAATGTGGCACGGCTTCGGTTGTGTGTTATAGCCTTCGTCGATACTGCCAGCCTA  594
            |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  482  CGTTGGAATGTGGCACGGCCTCGGTTGTGTGTTATAGCCTTCGTCGATACTGCCAGCCTA  541

Query  595  GACTGAGGACTGCGGTTTATACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCTT  654
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  542  GACTGAGGACTGCGGTTTATACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCTT  601

Query  655  GAAACACGGACC  666
            ||||||||||||
Sbjct  602  GAAACACGGACC  613
```

Figura 62: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 7E. BLAST em 02 de junho de 2007.

gb|DQ377650.1| *Pichia anomala* strain VTT C-04565, 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1064 bits, Expect = 0.0
Identities = 589/595 (98%), Gaps = 2/595 (0%).

```
Query  1    GCATTAGATCATTACGCCAGCATCCTAGTCAAAAGACGCAGCCCTCGATCCAGACAGGCA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  595  GCATTAGATCATTACGCCAGCATCCTAGTCAAAAGACGCAGCCCTCGATCCAGACAGGCA  536

Query  61   ATATCAACAGAAGCTATAACACTCCACCGAAGTGAAGCCACATTCAACTGCTATTATCTT  120
            |||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||
Sbjct  535  ATATCAGCAGAAGCTATAACACTCCACCGAAGTGAAGCCACATTCAACTGCCATTATCTT  476

Query  121  GCCATCCGAATCGATGCTGGCCCAGTGAAATACGAGTGCACAACTCAAGAAGAGAAGATA  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  475  GCCATCCGAATCGATGCTGGCCCAGTGAAATACGAGTGCACAACTCAAGAAGAGAAGATA  416

Query  181  ATCGTAAAACACCAAGTCTGATCTAATGCCCTTCCCTTTCAACAATTTCACGTACTTTTT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  415  ATCGTAAAACACCAAGTCTGATCTAATGCCCTTCCCTTTCAACAATTTCACGTACTTTTT  356

Query  241  CACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  355  CACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTC  296

Query  301  TCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  295  TCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAA  236

Query  361  CTCGACTCTTCGATAGCACCTTACATAGGAATGGGCATCTCATCAGACGGGATTCTCACC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  235  CTCGACTCTTCGATAGCACCTTACATAGGAATGGGCATCTCATCAGACGGGATTCTCACC  176

Query  421  CTCTATGACGTCCTGTTCCA-GGAACATAGACAAGTGCCAAACCCAAGGTTACCATCTTC  479
            |||||||||||||||||||| ||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Sbjct  175  CTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCCAAACCCAAGGTTACCATCTTC  116

Query  480  AAATTACCACTCGAACACCGAAGGTGCTAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACT  539
            ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  115  AAATTACAACTCGAACACCGAAGGTGCTAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACT  56

Query  540  CGCCGTTACTGAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCGCTTA-TTGATATGC  593
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||
Sbjct  55   CGCCGTTACTGAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCGCTTAATTGATATGC  1
```

Figura 63: BLAST N com o “Query” da linhagem LGMG 8A. BLAST em 02 de maio de 2007.

gb|DQ377650.1| *Pichia anomala* strain VTT C-04565, 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 1035 bits (560), Expect = 0.0 Identities = 567/570 (99%), Gaps = 1/570 (0%).

```
Query  7    GGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTAGCACCTT  66
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36   GGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTAGCACCTT  95

Query  67   CGGTGTTCGAGTTGTAATTTGAAGATGGTAACCTTGGGTTTGGCTCTTGTCTATGTTCCT  126
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  96   CGGTGTTCGAGTTGTAATTTGAAGATGGTAACCTTGGGTTTGGCTCTTGTCTATGTTCCT  155

Query  127  TGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTGATGAGATGCCCATTCCTATGTAA  186
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  156  TGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTGATGAGATGCCCATTCCTATGTAA  215

Query  187  GGTGCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCAT  246
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  216  GGTGCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCAT  275

Query  247  CTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAA  306
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  276  CTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAA  335

Query  307  AGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTAGAT  366
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  336  AGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTAGAT  395

Query  367  CAGACTTGGTGTTTTACGATTATCTTCTCTTCTTGAGTTGTGCACTCGTATTTCACTGGG  426
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  396  CAGACTTGGTGTTTTACGATTATCTTCTCTTCTTGAGTTGTGCACTCGTATTTCACTGGG  455

Query  427  CCAGCATCGATTCGGATGGCAAGATAATAGCAGTTGAATGTGGCTTCACTTCGGTGGAGT  486
            ||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  456  CCAGCATCGATTCGGATGGCAAGATAATGGCAGTTGAATGTGGCTTCACTTCGGTGGAGT  515

Query  487  GTTATAGCTTCTGTTGATATTGCCTGTCTGGATCGAGGGCTGCGTCTTTTGAGCTAGGAT  546
            ||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct  516  GTTATAGCTTCTGCTGATATTGCCTGTCTGGATCGAGGGCTGCGTCTTTTGA-CTAGGAT  574

Query  547  GCTGGCGTAATGATCTAATGCCGCCCGTCT  576
            ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  575  GCTGGCGTAATGATCTAATGCCGCCCGTCT  604
```

Figura 64: BLAST N com o "Query" da linhagem LGMG 5B. BLAST em 27 de abril de 2007.

4.6 Identificação fenotípica

O Quadro 1 resume o resultado obtido na identificação fenotípica, que observou a formação de tubo germinativo, clamidoconídios, filamentação, fermentação e assimilação.

Quadro 1: Resultado da identificação fenotípica.

Amostra	TG	Clamidocônidios	Hifas	Fermentação					Assimilação						Espécies
				GL	S	M	L	GA	GL	S	M	L	GA	R	
				A/G	A/G	A/G	A/G	A/G							
ATCC 34135	+	-	+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	*C. glabrata*
ATCC 10123	+	-	-	+/+	+/-	+/+	-/-	-/-	+	+	+	+	+	-	*C. albicans**
FCF14	+	-	+	+/+	+/-	+/+	-/-	+/-	-	-	-	-	-	-	*C. tropicalis* *
FCF14,1	+	+++	+	+/+	+/-	+/-	-/-	+/-	+	+	+	-	+	-	C. albicans
FCF 426	+	-	+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+	+	+	+	+	-	*C. tropicalis*
ICB 06	-	-	+	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	*C. lusitaniae / C. guilliermondii* *
ICB 15	-	-	+	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+	+	+	+	+	-	*C. lusitaniae*
ICB 58	+	+	+	+/+	+/-	+/-	-/-	+/-	+	+	+	-	+	-	*C. albicans*
15D	+	-	+	+/+	+/-	+/+	-/-	+/-	-	-	-	-	-	-	*C. kefyr* *
LGMG 1D	+	-	+	+/+	+/-	+/-	-/-	+/-	+	+	+	-	+	-	*C. albicans**
LGMG 1H	-	-	+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	+	-	+	+	+	+	*C. famata*
LGMG 1J	-	-	-	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-	-	-	-	-	-	*C. tropicalis* *
LGMG 2A	-	-	+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	*C. glabrata**
LGMG 5A	+	-	+	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+	+	+	-	+	-	*C. albicans*
LGMG 5C	-	-	+	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+	+	-	+	+	-	*C. guilliermondii**
LGMG 5D	+	-	+	+/+	+/-	-/-	-/-	-/-	+	+	+	+	+	+	*C. famata*
LGMG 5E	-	-	+	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+	+	+	-	+	-	*C. parapsilosis / C. lusitaniae* *
LGMG 5F	-	-	-	+/+	+/-	-/-	-/-	-/-	+	+	-	+	+	-	*C. albicans**
LGMG 5G	-	-	+	+/+	+/-	+/-	-/-	+/-	+	+	-	+	+	-	*C. albicans**
LGMG 5K	-	-	+	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+	+	+	+	+	+	*C. famata*
LGMG 5L	-	-	-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+	+	+	-	+	-	*C. lusitaniae / C. parapsilosis* *
LGMG 6A	-	-	+	+/+	+/-	+/-	-/-	+/-	-	-	-	-	-	-	*C. tropicalis* *
LGMG 7A	+	-	+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+	+	+	-	+	-	*C. albicans*
LGMG 7B	+	-	+	+/-	+/+	+/+	-/-	+/-	-	+	-	+	+	+	*C. tropicalis* *
LGMG 7E	+	-	+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/-	+	+	+	-	+	-	*C. tropicalis*
LGMG 8A	-	-	+	+/+	+/+	+/-	-/-	+/-	+	+	+	+	-	-	*C. lusitaniae* *
LGMG 8B	+	-	-	+/+	+/+	+/-	-/-	+/-	+	+	+	+	+	-	*C. tropicalis* *

* Identificação presuntiva, necessário refazer o teste da assimilação. TG –tubo germinativo; GL – glicose; S – sacarose; M – maltose; L – lactose; GA – galactose; R - rafinose

4.7 Identificação presuntiva com CHROMagar

Conforme a coloração assumida pela colônia após metabolizar a mistura de cromógenos existente nesse meio (Figura 65), é possível proceder a identificação presuntiva de algumas espécies, permanecendo, contudo, algumas cuja definição não é possível (Quadro 2).

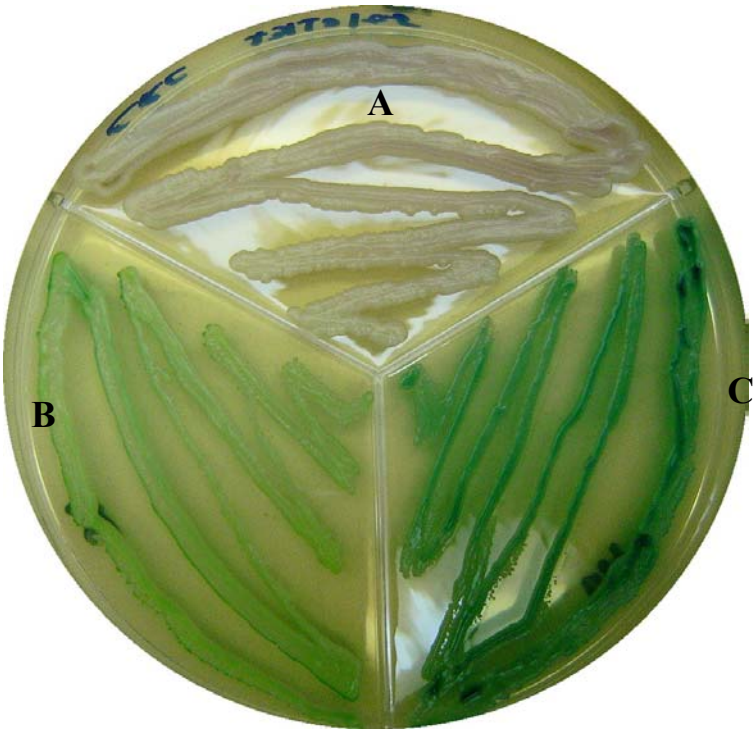


Figura 65: Identificação presuntiva com CHROMagar: (A) *C. parapsilosis* LGMG 5K; (B) *C. dubliniensis* CD 33; (C) *C. albicans* ATCC10123.

Podem ocorrer diferenças na tonalidade mesmo entre isolado de uma mesma espécie, essa variação dificulta a identificação, sendo, às vezes, impossível diferenciar espécies distintas, como *C. albicans* e *C. dubliniensis.*

Quadro 2: Identificação presuntiva das espécies com CHROMagar.

Linhagem	Cor	Identificação presuntiva
ATCC 34135	Roxo	*C. krusei*
ATCC 10123	Verde escuro	*C. albicans/C. dubliniensis*
FCF14	Verde claro	*C. albicans/C. dubliniensis*
FCF14,1	Verde claro	*C. albicans/C. dubliniensis*
FCF 426	Azul escuro	Não definida
ICB 06	Creme/lilás	Não definida
ICB 15	Creme	Não definida
ICB 58	Verde claro	*C. albicans/C. dubliniensis*
15D	Verde claro	*C. albicans/C. dubliniensis*
LGMG 1D	Verde claro	*C. albicans/C. dubliniensis*
LGMG 1H	Verde claro	*C. albicans/C. dubliniensis*
LGMG 1J	Verde escuro	*C. albicans/C. dubliniensis*
LGMG 2A	Roxo	*C. krusei*
LGMG 5A	Creme/lilás	Não definida
LGMG 5C	Creme/lilás	Não definida
LGMG 5D	Creme	Não definida
LGMG 5E	Creme/lilás	Não definida
LGMG 5F	Creme	Não definida
LGMG 5G	Creme	Não definida
LGMG 5K	Creme	Não definida
LGMG 5L	Creme/lilás	Não definida
LGMG 6A	Azul escuro	*C. tropicalis*
LGMG 7A	Azul escuro	*C. tropicalis*
LGMG 7B	Azul escuro	*C. tropicalis*
LGMG 7E	Verde escuro	*C. albicans/C. dubliniensis*
LGMG 8A	Roxo	*C. krusei*
LGMG 8B	Lilás	Não definida

4.8 Comparação entre as diferentes metodologias de identificação

As diferentes metodologias empregadas para identificar as espécies resultaram em dados que são confrontados no Quadro 3 que inclui também a identificação original das amostras, definida como identificação prévia. Diante das divergências na identificação, adotou-se nesse trabalho a identificação provinda da genotipagem por seqüenciamento.

4.9 Análise *in silico* dos padrões de diversas endonucleases de restrição

Foram analisadas, *in silico*, 78 enzimas no total, dessas apenas 5 tinham um padrão de restrição suficientemente distinto entre as 7 espécies, *Mse*I, *Cac*8I, *BsaJ*I, *Dde*I e *BspW*I (todas da NEB). Para escolher a enzima a ser testada, além do padrão de restrição, foram considerados o custo da enzima e a eficácia da digestão.

Optou-se por testar inicialmente a *Dde*I. A Tabela 10, mostra a localização do sítio de clivagem da *Dde*I, o número indica a posição da primeira base do sítio de restrição no rDNA de cada espécie.

Tabela 10: Posição dos sítios de clivagem para *Dde*I na seqüência do rDNA.

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C. albicans	56	389	1266	136	1424	1648	2199			
C. dubliniensis	56	389	1264	1360	1422	1645	1722	2187	2210	
C. glabrata	54	389	1279	1373	1435	1658	1669	1680	1814	1858
C. guilliermondii	54	389	905	1279	1375	1437	1681	2254	2443	
C. Krusei	21	351	1233	1329	1391	1615	1785	2214		
C. parapsilosis	59	391	1268	1364	1426	1650	2298			
C. tropicalis	56	389	1264	1360	1422	1645	1722	2227		

Quadro 3: Comparação entre as diferentes metodologias de identificação.

Linhagem	Identificação prévia	CHROMagar	Identificação fenotípica	Seqüenciamento
ATCC 34135	*C. Krusei*	*C. Krusei*	*C. glabrata*	*C. Krusei*
ATCC 10123	*C. albicans*	*C. albicans/C.dubliniensis*	*C. albicans*	*C. albicans*
FCF14	*C. albicans*	*C. albicans/C.dubliniensis*	*C. tropicalis*	*C. albicans*
FCF14,1	*C. albicans*	*C. albicans/C.dubliniensis*	*C. albicans*	*C. albicans*
FCF 426	*C. tropicalis*	Não definida	*C. tropicalis*	*C. tropicalis*
ICB 06	*C. guilliermondii*	Não definida	*C. lusitaniae/ C. guilliermondii*	*guilliermondii*
ICB 15	*C. parapsilosis*	Não definida	*C. lusitaniae*	*C. parapsilosis*
ICB 58	*C. albicans*	*C. albicans/C.dubliniensis*	*C. albicans*	*C. albicans*
15D	*C. albicans*	*C. albicans/C.dubliniensis*	*C. kefyr*	*C. albicans*
LGMG 1D	*C. Krusei*	*C. albicans/C.dubliniensis*	*C. albicans*	*C. albicans*
LGMG 1H	*C. guilliermondii*	*C. albicans/C.dubliniensis*	*C. famata*	*C. albicans*
LGMG 1J	*C. stelltoidea*	*C. albicans/C.dubliniensis*	*C. tropicalis*	*C. albicans*
LGMG 2A	*C. parapsilosis*	*C. Krusei*	*C. glabrata*	*C. glabrata*
LGMG 5A	*C. albicans*	Não definida	*C. albicans*	*C. parapsilosis*
LGMG 5C	*C. lusitaniae*	Não definida	*C. guilliermondii*	*C. parapsilosis*
LGMG 5D	*C. parapsilosis*	Não definida	*C. famata*	*C. parapsilosis*
LGMG 5E	*C. Krusei*	Não definida	*C. lusitaniae/ C. guilliermondii*	*C. parapsilosis*
LGMG 5F	*C. guilliermondii*	Não definida	*C. albicans*	*C. parapsilosis*
LGMG 5G	*C. tropicalis*	Não definida	*C. albicans*	*C. parapsilosis*
LGMG 5K	*C. albicans*	Não definida	*C. famata*	*C. parapsilosis*
LGMG 5L	*C. guilliermondii*	Não definida	*C. lusitaniae/ C. guilliermondii*	*C. parapsilosis*
LGMG 6A	*C. tropicalis*	*C. tropicalis*	*C. tropicalis*	*C. lusitaniae*
LGMG 7A	*C. parapsilosis*	*C. tropicalis*	*C. albicans*	*C. tropicalis*
LGMG 7B	*C. tropicalis*	*C. tropicalis*	*C. tropicalis*	*C. tropicalis*
LGMG 7E	*C. albicans*	*C. albicans/C.dubliniensis*	*C. tropicalis*	*C. tropicalis*
LGMG 8A	*C. glabrata*	*C. krusei*	*C. lusitaniae*	*P. anomala*
LGMG 8B	*C. krusei*	Não definida	*C. tropicalis*	*P. anomala*

A ferramenta “Restriction Analysis” permite ainda a visualização em forma de um mapa circular no qual está indicada a posição de cada sítio de restrição (Figura 66).

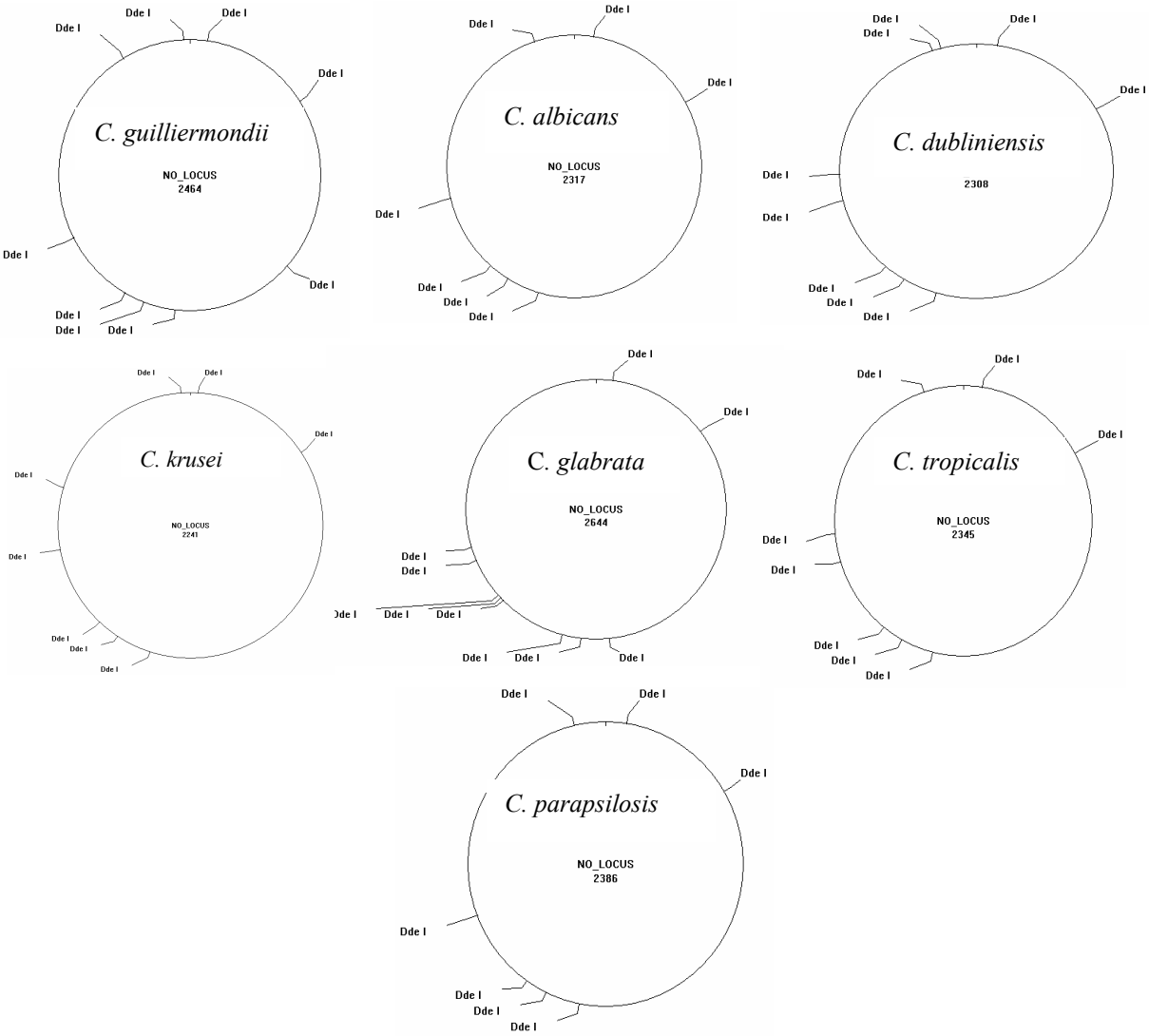


Figura 66: Mapas dos sítios de restrição da enzima *Dde*I das 7 espécies estudadas no trabalho de uma seqüência aproximada de 2800 bp contendo os genes 18S e 5.8S completos, as regiões ITS 1 e 2 completas e o gene 28S incompleto.

Sabendo a localização do sítio de restrição para cada espécie, foi possível prever o padrão dos fragmentos de restrição que poderiam ser gerados pela digestão *in vitro.* Calculando-se as distâncias entre os cortes foi possível criar uma tabela preditiva com o tamanho da cada banda (Tabela 11).

Tabela 11: Tamanho dos fragmentos de restrição gerados pela *Dde*I.

C. albicans	877	551	333	224	118	96	
C. dubliniensis	876	465	333	223		96	
C. glabrata	890	786	335	223	134	94	
C. guilliermondii	593	516	374	335	286	189	96
C. Krusei	882	429	330	224	170	96	
C. parapsilosis	877	648	332	224		96	
C. tropicalis	875	505	333	223	118	96	

4.10 RFLP com a enzima *Dde* I

A primeira análise PCR-RFLP, foi realizada sem a identificação definitiva, baseada no seqüenciamento do rDNA, pois o intuito foi avaliar o número e a distribuição dos fragmentos de restrição gerados pela enzima e sua atividade, e se confirmava a previsão obtida pelos mapas de restrição obtidos com a análise *in silico* (Figura 67). Inicialmente pensamos que esta enzima não permitia a distinção entre todas as espécies pois, como pode ser observado na Figura 67, espécies diferentes apresentavam o mesmo padrão de restrição (colunas 3, 4 e 6; colunas 5 e 7). Contudo, após os seqüenciamento, percebeu-se que na verdade, tratavam-se das mesmas espécies. A Tabela 12 evidencia essa comparação.

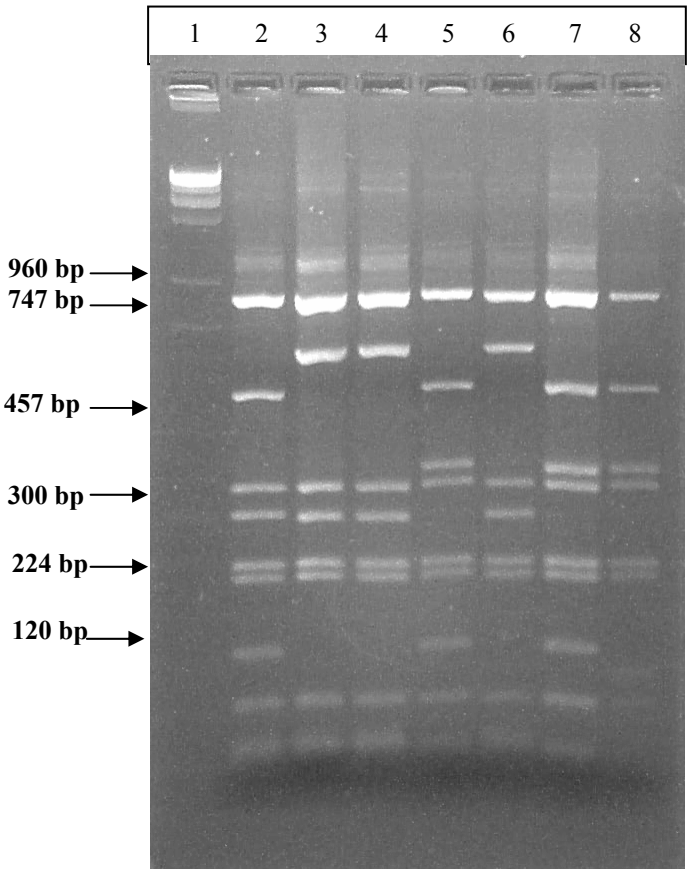


Figura 67: Gel de agarose 2% da RFLP com *Dde*I: 1 padrão de tamanho molecular; 2 *C. tropicalis*; 3, 4 e 6 *C. parapsilosis*; 5 e 7 *C. albicans*; 8 *C. dubliniensis.*

Tabela 12: Comparação entre a RFLP, identificação prévia e seqüenciamento

Colunas	Identificação prévia	Seqüenciamento
2	*C. albicans*	*C. tropicalis*
3	*C. lusitaniae*	*C. parapsilosis*
4	*C. krusei*	*C. parapsilosis*
5	*C. guilliermondii*	*C. albicans*
6	*C. parapsilosis*	*C. parapsilosis*
7	*C. stellatoidea*	*C. albicans*
8	*C. dubliniensis*	*C. dubliniensis*

A Figura 67 mostra ainda, um padrão nítido de diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* e, tendo resolvido o problema da identificação com seqüenciamento, prosseguiu-se a genotipagem por RFLP dos demais fungos de interesse (Figura 69), confirmando, assim a previsão feita pela análise *in silico.*

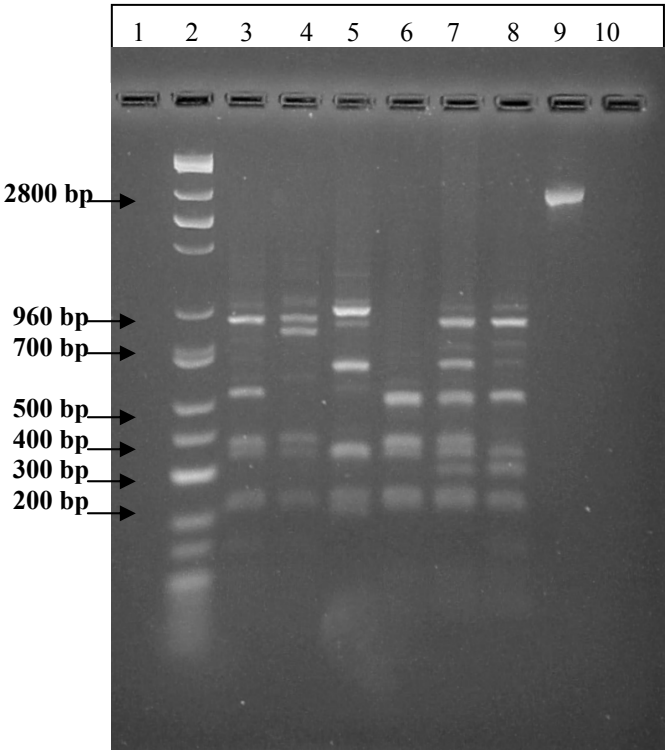


Figura 68: Gel de agarose 1,5% da RFLP com *Dde*I: 1 e 10 Stop Mix A e água; 2 padrão de tamanho molecular; 3 *C. albicans*; 4 *C. glabrata*; 5 *C. Krusei*; 6 *C. guilliermondii*; *7 C. parapsilosis*; 8 *C. tropicalis*: 9 2800 bp de *C. albicans* não digerido.

4.11 Análise dos genomas mitocondriais

O mapa feito no "Corel Draw" permitiu identificar genes que estavam próximos um do outro, na mesma seqüência e mesma orientação: ATP8, ATP6, ATP9 e COX3 (Figuras 69, 70 e 71). O alinhamento desses genes evidenciou as regiões conservadas entre eles que foram sendo selecionadas de acordo com os critérios estabelecidos (Tabela 13).

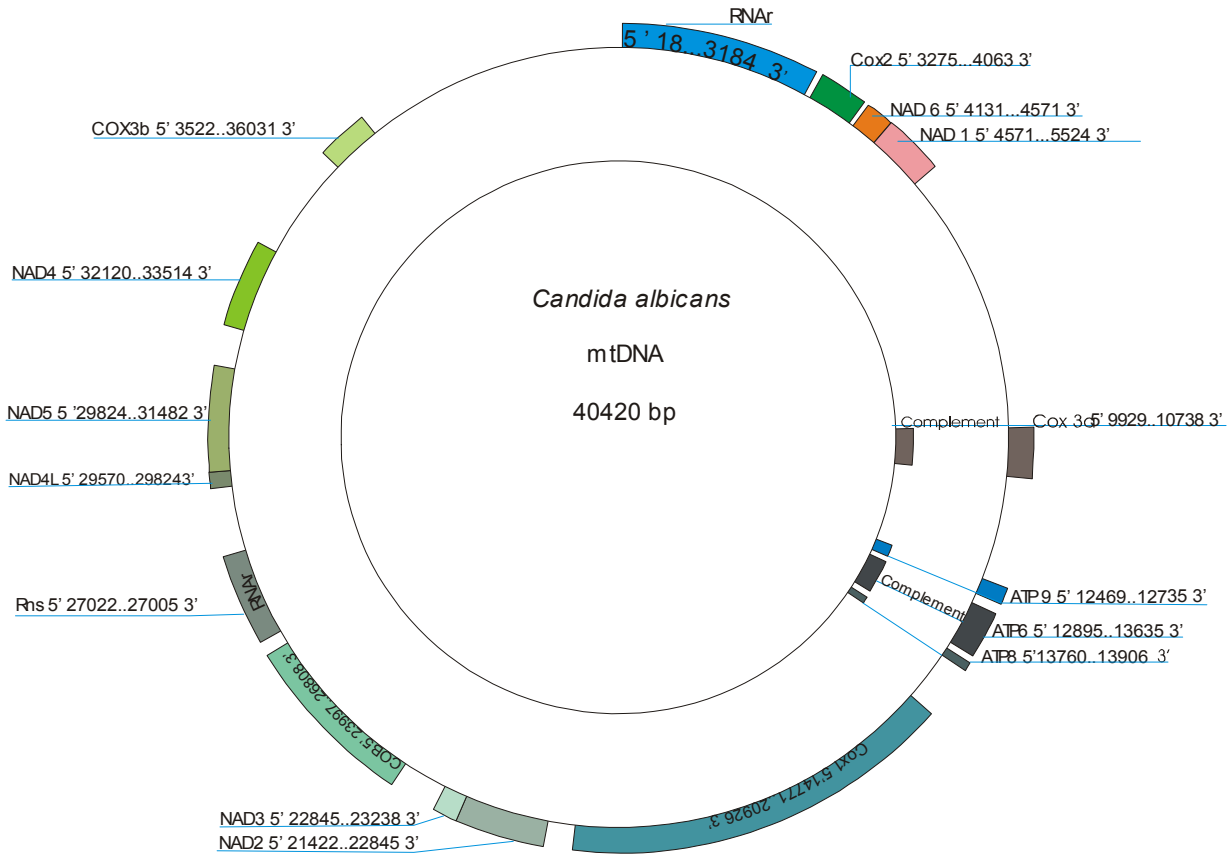


Figura 69: Mapa do mtDNA de *C. albicans*. rRNA rnl – RNA ribossomal subunidade maior; rRNA rns – RNA ribossomal subunidade menor; COX 1, 2 e 3 – citocromo oxidase subunidades 1, 2 e 3; NAD 1, 2, 3, 4, 5 e 6 – NADH desidrogenase subunidades 1, 2, 3, 4, 5, 6; ATP 6, 8 e 9 – ATPase subunidades 6, 8 e 9; COB – provável apocitocromo b; VAR1 provável proteína ribossomal mitocondrial VAR1.

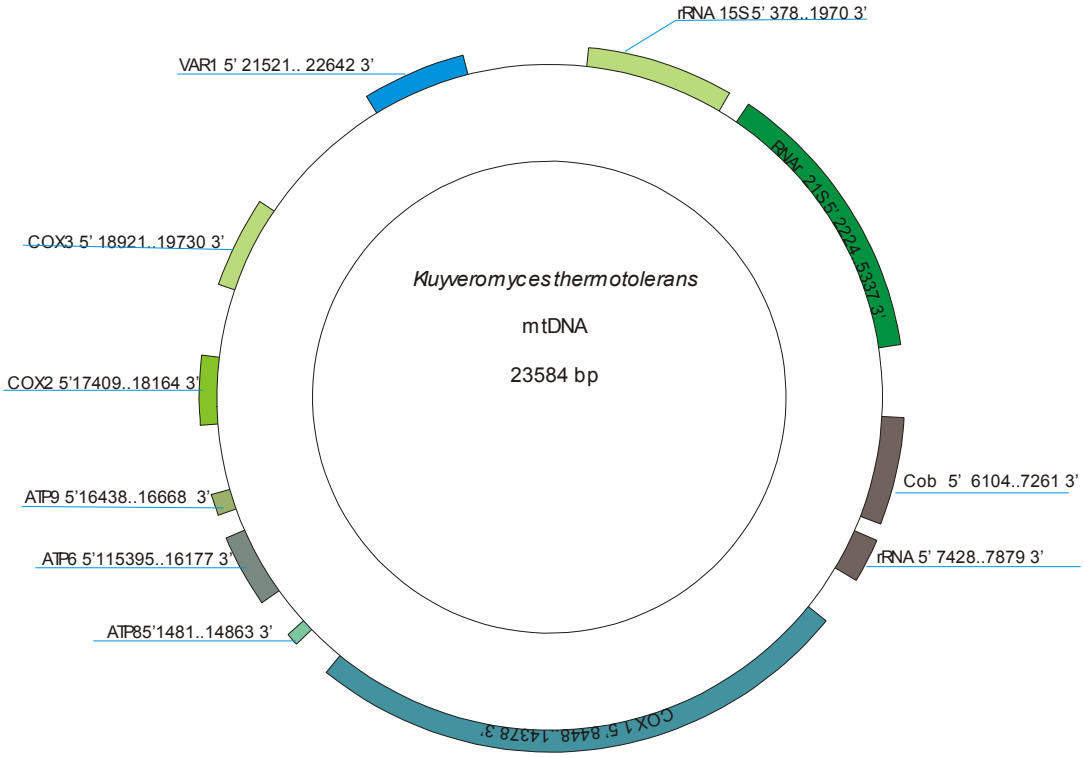


Figura 70: Mapa do mtDNA de *K. thermotolerans.* COX 1, 2 e 3 – citocromo oxidase subunidades 1, 2 e 3; ATP 6, 8 e 9 – ATPase subunidades 6, 8 e 9; COB – provável apocitocromo b; VAR1 provável proteína ribossomal mitocondrial VAR1.

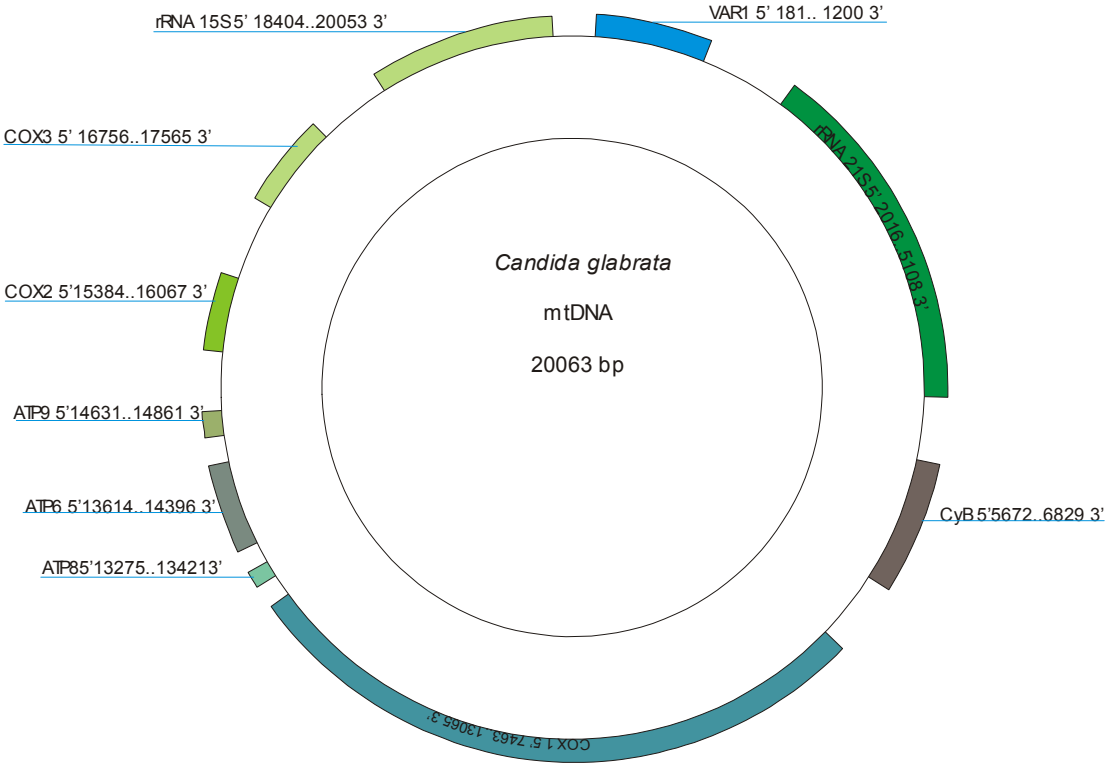


Figura 71: Mapa do mtDNA de *C. glabrata.* COX 1, 2 e 3 – citocromo oxidase subunidades 1, 2 e 3; ATP 6, 8 e 9 – ATPase subunidades 6, 8 e 9; CyB – provável apocitocromo B; VAR1 provável proteína ribossomal mitocondrial VAR1.

Tabela 13: Regiões conservadas em cada gene que foram selecionadas em primeira análise.

Gene	Nº bases	TM	GC %	observações
ATP 8	23 b	61,9ºC	30.4%	Hairpin e dímeros entre AT
ATP 8	21 b	57,6ºC	33.3%	Hairpin e dímeros entre AT
ATP 6	18 b	50,5ºC	33.3%	Dímeros entre AT (3´)
ATP 6	21 b	58,6ºC	33.3%	Hairpin e dímeros entre AT
ATP 6	18 b	49,5ºC	27.8%	Hairpin e dímeros entre AT
ATP 9	20 b	60.1ºC	40.0%	Hairpin entre AT e dímeros entre CG(5´)
ATP 9	20 b	50.5ºC	25.0%	Hairpin entre AT e dímeros entre AT (3´)
ATP 9	18 b	45.4ºC	27.8%	Hairpin e Dímeros entre AT (3')
COX 3	17 b	52.9ºC	47.1%	Hairpin entre AT e Dímeros entre GC
COX 3	24 b	57,4ºC	20.8%	Hairpin e dímeros (3') entre AT
COX 3	20 b	47.1ºC	20.0%	Hairpin e dímeros (3') entre AT
COX 3	20 b	47.0ºC	30.0%	Hairpin entre AT e dímeros entre GC(5')
COX 3	24 b	60.3ºC	33.3%	Hairpin e dímeros entre GC(3')
COX 3	18 b	44.2ºC	27.8%	Dímeros entre GC (meio)
COX 3	26 b	67.2ºC	30.8%	Hairpin e dímeros entre GC
COX 3	21 b	59.6ºC	38.1%	Hairpin e dímeros entre GC
COX 3	20 b	51.7ºC	35.0%	Dímeros entre GC
COX 3	19 b	48.8ºC	36.8%	Dímeros entre AT

A partir dos dados da Tabela 13 foram escolhidos seis alinhamentos que apresentaram uma temperatura de anelamento média de 50º C, poucas possibilidades de formarem dímeros, ter a extremidade 3´ conservada entre os três fungos e o tamanho médio de 20 bases.

No gene COX3 foi possível encontrar três alinhamentos viáveis, identificados na Tabela 14 como Aln 1, 2 e 3, respectivamente.

Os iniciadores (Quadro 4) foram desenhados a partir da seqüência consenso (indicada pelo asterisco na Tabela 14) de cada alinhamento, sendo que para os alinhamentos do gene COX3 desenhou-se a seqüência complementar.

Tabela 14: Seqüências consenso dos genes entre os 3 fungos selecionadas para desenho dos iniciadores.

Gene	Alinhamento	Organismo
ATP8	5′TGCCACAATTAGTACCATTTTA	*K.thermotolerans*
	5′TGCCACAATTAATTCCATTTTA	*C.glabrata*
	5′TGCCACAATTAGTTCCTTTTTA	*C.albicans*
	********** * ** *****	
ATP6	5′TGCTAATATTATTGCTGGACA	*K.thermotolerans*
	5′TGCTAATATCTTCTCTGGACA	*C.glabrata*
	5′TGCTAATATATTATCTGGACA	*C.albicans*
	********* * *******	
ATP9	5′ATGCAATTAGTATTAGCCGC	*K.thermotolerans*
	5′ATGCAATTAGCATTAGCCGC	*C.glabrata*
	5′ATGCAATTAGCTTTAGCTGC	*C.albicans*
	********** ***** **	
COX3 Aln1	5′CCTTCACCATGACCAAT	*K.thermotolerans*
	5′CCATCACCATGACCAAT	*C.glabrata*
	5′CCTTCACCATGACCTAT	*C.albicans*
	** ********** **	
COX3 Aln2	5′TAGGTGATCATACAATTGCAGT	*K.thermotolerans*
	5′TAGGTGATCATACAATTGCAGT	*C.glabrata*
	5′TAGGAGATCATACTTTAGCAGT	*C.albicans*
	**** ******** * *****	
COX3 Aln3	5′TTTGAGCTTACTTTCATTCAGC	*K.thermotolerans*
	5′TTTGAGCATATTTTCATTCAGC	*C.glabrata*
	5′TTTGAGCATATCTACATTCAGC	*C.albicans*
	******* ** * ********	

Quadro 4: iniciadores Mitocondriais.

Primer	Gene	Orientação	Tamanho	Tm	Desenho
575	ATP8	sense	21 bases	57.6ºC	5' GCC ACA ATT AAT TCC ATT TTA
576	COX3 aln 4	antisense	24 bases	60.3ºC	5' ACT GCA ATT GTA TGA TCA CCT AAA
577	ATP6	sense	21 bases	58.6ºC	5' TGC TAA TAT CTT CTC TGG ACA
578	COX3 aln 5	antisense	21 bases	59.6ºC	5' GCT GAA TGA AAA TAT GCT CAA
579	ATP9	sense	20 bases	60.1ºC	5' ATG CAA TTA GCA TTA GCY GC*
580	COX3 aln 1	antisense	17 bases	52.9ºC	5' ATT GGT CAT GGT GAW GG **

* Y= C, T ** W = A, T

4.12 PCR com os iniciadores mitocondriais

A reação de PCR ainda não foi otimizada como seria desejável, alguns testes preliminares resultaram na amplificação do produto desejado, contudo o resultado não foi reproduzível (Figura 72).

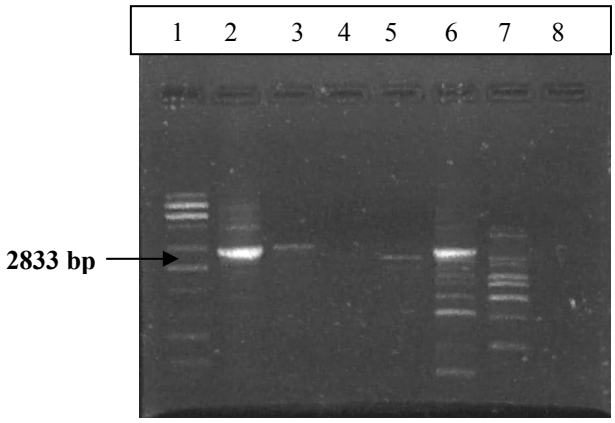


Figura 72: Gel de agarose 1% : amplificação do mtDNA de *P. anômala* com os iniciadores mitocondriais: 1padrão de peso molecular; 2 par 577/576; 3 par 577/578; 4 par 579/578; 5 par 579/576 ; 6 577/580; 7 579/50; 8 controle negativo.

4.13 Ensaio da Fosfolipase

Foram testadas 27 amostras nesse ensaio, conforme mostrado no Quadro 5. Apenas as 5 linhagens de *C. albicans* produziram o halo indicativo de atividade enzimática (Figura 73). A Linhagem FCF 14 foi usada como controle positivo para o ensaio.

4.14 Ensaio da Proteinase

Para o ensaio da proteinase, foram testadas as mesmas amostras do teste da fosfolipase, contudo, o resultado foi negativo para todas as amostras, mesmo para o controle positivo. O meio utilizado foi modificado do original, o que pode ter interferido no resultado final.

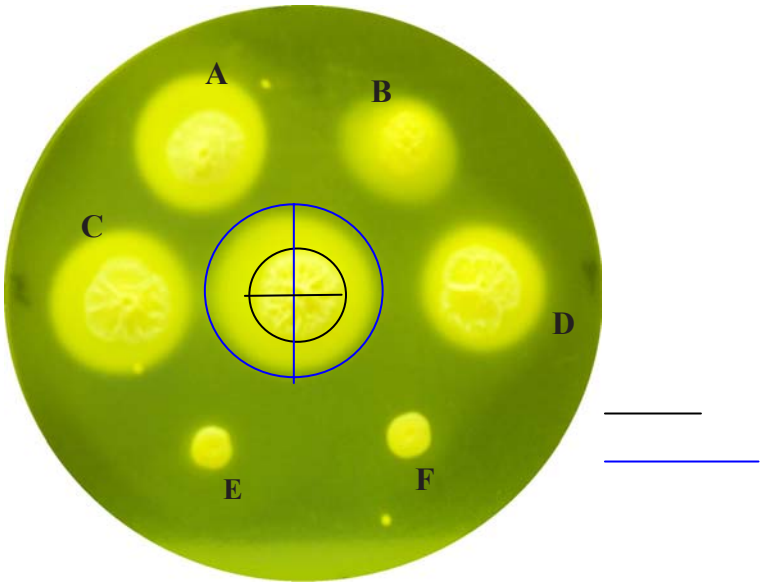


Figura 73: Ensaio da fosfolipase: A, B, C e D: *C. albicans,* linhagens FCF 14,1, 15D, LGMG 1H e ATCC 10123, respectivamente. E e F, *C. dubliniensis*, linhagens CD 33 e CD 36. Ao centro, controle positivo, *C. albicans* FCF 14. Os diagramas indicam a forma como foi obtido o Pz.

Quadro 5: Resultado do ensaio da fosfolipase.

Espécie	Linhagem	Pz
C. albicans	ATCC 10231 FCF 14 FCF 14.1 LGMG 1.H 15 D	0,70 0,50 0,38 0,57 0,57
C. glabrata	LGMG 2.A LGMG 2.B LGMG 2.C LGMG 2.D	0,00 0,00 0,00 0,00
C. krusei	ATCC 6258 ATCC 34135 LGMG 3.A	0,00 0,00 0,00
C. guilliermondii	H585 H1020 ICB 06 LGMG 4.B	0,00 0,00 0,00 0,00
C. parapsilosis	ICB 15 LGMG 5.A LGMG 5.C LGMG 5.D	0,00 0,00 0,00 0,00
C. tropicalis	FCF 426 LGMG 7.A LGMG 7.B LGMG 7.D	0,00 0,00 0,00 0,00
C. dubliniensis	ATCC 777 ATCC 778157 CD 33 CD 36	0,00 0,00 0,00 0,00

4.15 Ensaio de Filamentação e Invasão do Agar

Para o ensaio da filamentação e invasão do agar com os meios SPIDER e SDC, foram testadas as mesmas amostras dos testes anteriores. Foi possível observar a filamentação e a invasão do agar, em ambos os meios, em quase todas as amostras testadas. O padrão de filamentação é variável, em *C. albicans*, *C. tropicalis e C. glabrata,* as hifas surgem de todo o perímetro da colônia (Figura 74 A e B); já em *C. krusei,* as hifas surgem de determinados pontos isolados, e a partir desse "tronco" se ramificam (Figura 74 C e D). *C. dubliniensis, C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* filamentam menos, as hifas surgem como pequenas "franjas" da borda da colônia (Figura 74 G), sendo que as linhagens ICB 06 e LGMG 4B de *C. guilliermondii* não filamentaram (Figura 74 H). Invariavelmente, as hifas avançam tanto no sentido horizontal à placa, quando no sentido vertical, atingindo o fundo da placa (Figura 74 E e F).

O teste com o meio SDC modificado mostrou que de alguma forma, o SFB é capaz de induzir a filamentação dos fungos, mesmo quando não estão em contato direto e curiosamente, nesse teste todas as linhagens filamentaram, inclusive ICB 06 e LGMG 4B de *C. guilliermondii* que não haviam filamentado no teste clássico.

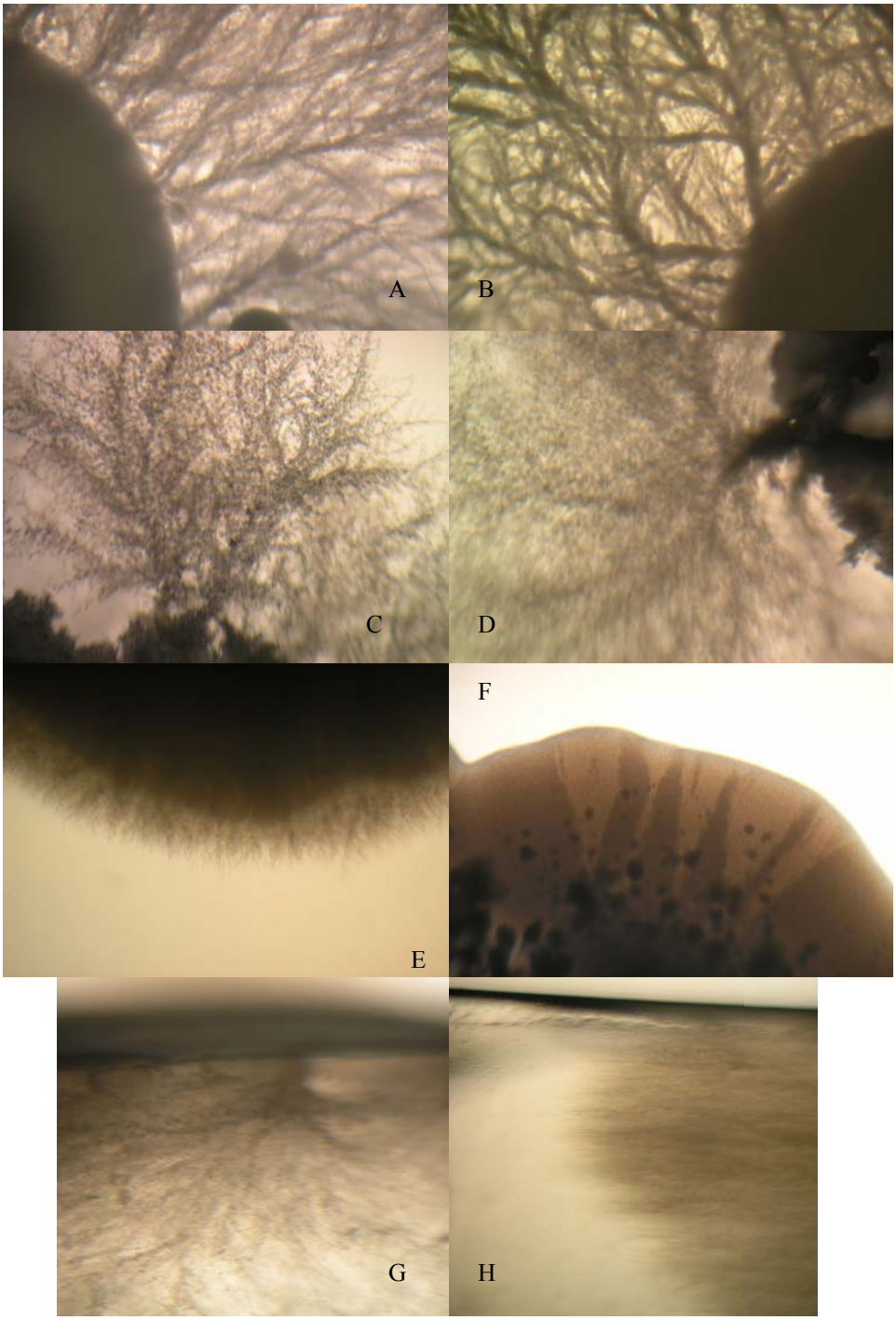


Figura 74: Teste de filamentação e invasão do Agar. (A e B) padrões encontrados em *C. albicans, C. tropicalis* e *C. glabrata*. (C e D) padrões encontrado em *C. krusei*. (E) padrão encontrado em *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis.* (F) colônia da linhagem LGMG de *C. guilliermondii* que não filamentou. (G e H) Hifas invadindo o agar no sentido vertical e horizontal da placa, respectivamente

5 Discussão

5.1 Extração do DNA genômico

As três estratégias utilizadas para a extração do DNA genômico permitiram uma amplificação eficiente por PCR. Contudo, existe uma diferença substancial quanto à viabilidade do DNA em longo prazo.

A extração com água é uma metodologia rápida e de baixo custo e é convenientemente empregada quando há uma grande quantidade de amostras a terem seu DNA extraído para amplificação por PCR imediata ou a curto prazo, pois a quantidade de DNA extraída é pequena (Figura 15) e sua integridade é mantida por um curto espaço de tempo. A Figura 75 mostra o DNA após seis meses da extração, com um nítido padrão de fragmentação.

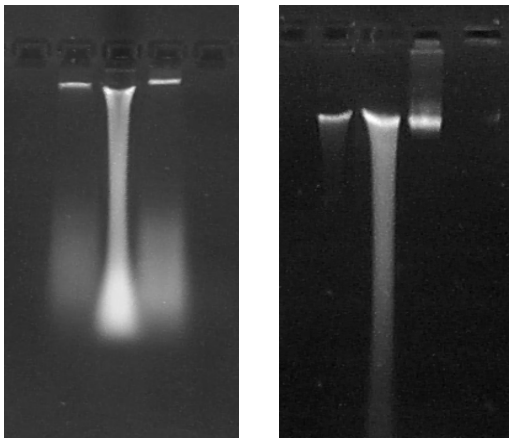


Figura 75: gel de agarose de 20 μL do produto das três metodologias de extração: Esquerda, TE zimoliase; ao centro, fervura em água e à direita, proteinase K, lisozima e SDS.

A extração com zimoliase rende uma quantidade maior de DNA, o custo é mais elevado, contudo, a praticidade é comparável a primeira. A integridade do DNA também não é mantida a longo prazo, assim, é útil quando a utilização do produto de extração ocorrer em um curto período de tempo.

A terceira metodologia empregada, indiscutivelmente é a menos prática de todas. O custo é mais elevado e o tempo de execução também é maior o que a inviabiliza quando o número de amostras a ser testada é muito grande. Contudo, das três é a que rende uma maior quantidade de DNA e o mantém íntegro por mais tempo, certamente superior a dois anos.

Nossa interpretação para a maior estabilidade do DNA extraído com Proteinase K e SDS certamente se deve à eliminação provavelmente completa de enzimas que possam degradar o DNA extraído.

5.2 PCR "multiplex"

A PCR "multiplex", utilizando os dois pares de iniciadores, 377/572 (ribossomais) e 573/574 ACT1, mostrou-se capaz de diferenciar em uma análise imediata *C. dubliniensis* dos demais fungos testados, corroborando em nossas mãos trabalhos publicados anteriormente (DONNELLY *et al.* 1999; MÄHNB, 2005).

O intuito de se trabalhar com a PCR "multiplex" foi criar um fluxo prático de diferenciação, onde o processo inicial e obrigatório, a amplificação, reduzisse o número de espécies e conseqüentemente amostras, para o processo seguinte, a digestão com a endonuclease de restrição, o que resulta na otimização do processo já que o produto da PCR é essencial para o RFLP.

C. glabrata possui um produto de amplificação ligeiramente maior que o das outras espécies podendo servir como um critério diferencial, porém não suficiente, entre espécies. Uma possibilidade de acentuar essa diferença seria a utilização de um gel de agarose mais concentrado, 1,5 ou 2%, algo que não foi realizado nesse trabalho.

5.3 Purificação de DNA através do método de eletroeluição

A eletroeluição é uma parte do processo que pode ser suprimida sem detrimento para o resultado final, ou contrário, pode contribuir para eventuais artefatos durante a RFLP. Há uma alternativa viável, inclusive mais prática, precipitar o produto de PCR com glicogênio, NaCl e etanol 100%, seguida de duas lavagens sucessivas com etanol 70%.

A digestão inicial com *Dde*I foi feita com o produto de PCR sem eletroeluir (Figura 67), o resultado obtido foi melhor do que quando utilizado o DNA eletroeluídio (Figura 68). O tempo necessário para a digestão no primeiro caso foi menor, 2h. Utilizando-se o DNA eletroeluídio, a digestão por duas horas resultou em digestão parcial para todas as amostras testadas (Figura 76), sendo o tempo necessário para uma digestão satisfatória, 16h (figura 68).

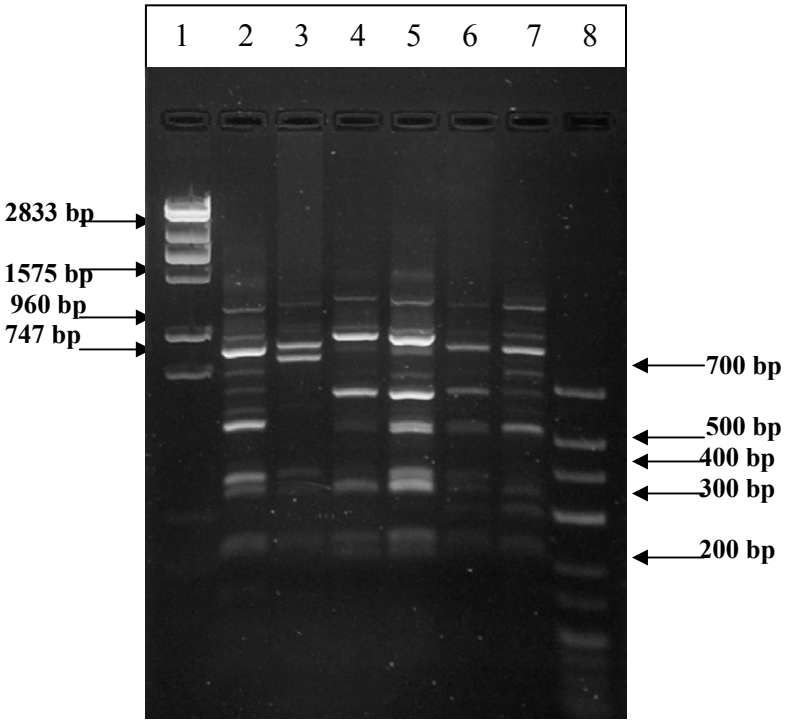


Figura 76: Digestão parcial com a enzima *Dde*I: 1 e 8, padrões de peso molecular; 2 *C. albicans*; 3 *C. glabrata*; 4 *C. krusei*; 5. *C. guilliermondii*; 6 *C. parapsilosis*; 7 *C. tropicalis.*

5.4 Genotipagem por seqüenciamendo do DNA

O propósito inicial do seqüenciamento era simplesmente confirmar a identificação fenotípica, contudo, por haver divergência entre a identificação fenotípica e genotípica, o seqüenciamento passou a ser a principal ferramenta para a identificação precisa das espécies, antes de proceder aos demais objetivos do trabalho.

O seqüenciamento dos polimorfismos das regiões ITS 1 e 2 e do gene 18S, é a estratégia normalmente adotada para estabelecer relações filogenéticas entre os organismos e conseqüentemente sua identificação (COLEMAN, 2003; McCULLOGH, *et al.,*1999; CHEN, 2001; WU *et al,* 2003). Contudo, foi possível um excelente padrão de identificação usando a extremidade 5´ do rDNA 28S que apesar de conservado apresenta variações suficientes para que se possa estabelecer as relações filogenéticas.

Observando as figuras dos alinhamentos, é possível observar a variação entre linhagens da mesma espécie. Gee *et al.,* (2002), já haviam observado essa variação em *C. dubliniensis* considerando-a uma microevolução. Comparação similar foi feita com *C. albicans* por Soll e Pujol, (2003), encontrando o mesmo resultado.

5.5 Genotipagem por RFLP com a *Dde*I

As estratégias normalmente adotadas para o mapeamento físico do DNA por PCR-RFLP utilizam as regiões ITS por seu caráter polimórfico (McCULLOUGH, *et al*.,1999, PINTO *et al.* 2004). Contudo, o produto de amplificação dessa região é relativamente pequeno entre as espécies estudadas nesse trabalho, não excedendo os 800 bp. A comparação feita entre os padrões dos fragmentos de restrição, *in silico*, revelou uma pequena variação que dificilmente poderia ser observada em gel de agarose. Igualmente verdade, foi a comparação com o produto de amplificação para o gene 18S. Nesse caso, o produto de

amplificação é maior, em geral 1800 bp, contudo por ser uma região mais conservada revelou um baixo polimorfismo na previsão *in silico.* Contudo, a associação dessas duas regiões gerou um padrão inconfundível entre as sete espécies estudadas.

Pode ser observada uma pequena variação entre os padrões previstos para os fragmentos de restrição da análise *in silico,* e os efetivamente encontrados na digestão *in vitro,* essa discrepância pode ser inerente à técnica de eletroforese em gel de agarose cujo resultado pode ser influenciado por fatores como concentração do gel e concentração de íons presentes na amostra a ser testada. Um segundo fator que pode ter contribuído para essa divergência foi a diferença no tamanho total das seqüências analisadas *in silico*, em média 2300 bp, e as efetivamente geradas pela PCR, 2800, e digeridas *in vitro.* Contudo o padrão é inequívoco e muito similar ao previsto o que indica que pode ser reproduzível e confiável.

A escolha da enzima *Dde*I foi motivada pelo seu custo relativamente baixo e o seu padrão de restrição que permite a diferenciação desejada. Adicionalmente sua boa estabilidade na armazenagem e alta atividade nos ensaios, revelando insensibilidade a possíveis inibidores existentes na mistura de reação, aumentam muito seu valor para que o procedimento seja realmente de utilidade na prática diária da microbiologia clínica. O fato de ela admitir uma base N no centro da seqüência palindrômica, ampliaria a possibilidade de encontrar polimorfismos entre as espécies.

5. 6 Identificação fenotípica clássica

A identificação fenotípica clássica, que vem de longa data sendo usada na identificação dos fungos do gênero *Candida* revelou ser uma estratégia sujeita a falhas além de trabalhosa e de custo não desprezível. A proposta inicial do trabalho era avaliar 28 linhagens, 4 para cada espécie. A coleção do laboratório já contava com 5 linhagens ATCC (ATCC 34135, ATCC 10123, ATCC 777, ATCC 778157 E ATCC 6258) e duas (CD 33 e CD

36) cuja identificação molecular já havia sido feita, faltando apenas 21 linhagens para completar o grupo. Contudo, foi necessário seqüenciar clones derivados de 39 fungos que já haviam sido identificados fenotipicamente, desses, apenas 13 tiveram a identificação fenotípica confirmada pelo seqüenciamento.

O baixo número de confirmações pela via molecular nos preocupou. Qual seria a causa: identificação incorreta, identificação trocada ao longo do tempo que as culturas são preservadas por repiques sucessivos, método usual nas coleções clássicas ou também contaminação do isolado inicial ?

Para reduzir o risco de contaminação pós-identificação, há uma alternativa viável para a manutenção da coleção que é o estoque em YPD-Glicerol em –80ºC. A Figura 77 mostra o crescimento, após 48h a 30 ºC, em YPD das 7 espécies estudadas no trabalho após 2 anos de congelamentos e descongelamentos freqüentes. É possível observar um bom crescimento para todas as espécies, e aparentemente não sofreram com o processo de descongelamento e congelamento.

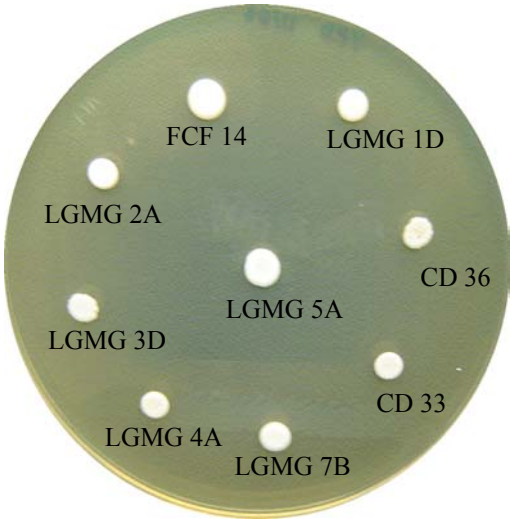


Figura 77: Viabilidade das 7 espécies em YPD por 48h a 30ºC, após vários ciclos de congelamento a –80ºC e descongelamento.

5.7 Ensaio da fosfolipase

No trabalho original que estabeleceu a metodologia do ensaio em placa da fosfolipase, Price, Wilkinson e Gentry (1982), sugerem que a formação da zona de precipitação em torno da colônia é resultante da interação do íon cálcio com o produto da digestão dos fosfolipídios catalisada pela fosfolipase. Os autores citam ainda, que a atividade em placa foi confirmada por testes bioquímicos, exibindo uma única figura na qual há uma correlação entre a atividade enzimática da fosfolipase e o halo do teste em placa. Samaranayake, Raeside e Macfarlane (1984), demonstraram que o período de incubação, pH, variação qualitativa no material, como a gema de ovo e diferentes açúcares presentes no meio podem interferir no resultado final do ensaio.

Sendo a fosfolipase uma enzima hidrolítica, a efeito visto em placa deveria ser da hidrólise do substrato, como o da proteinase, e não a sua coagulação. Para testar a hipótese de Price, Wilkinson e Gentry (1982), sobre a ação do cálcio, resultados preliminares de um teste que ainda está em desenvolvimento, revelaram que há formação do halo mesmo quando o cálcio não é adicionado ao meio. Interessantemente, um teste feito sem a gema do ovo e com adição de BSA fração V, mostrou o mesmo padrão de coagulação (Figura 78) o que pode ser explicado pela ação de uma coagulase (RODRIGUES, 2003) que estaria agindo sobre proteínas da gema do ovo.

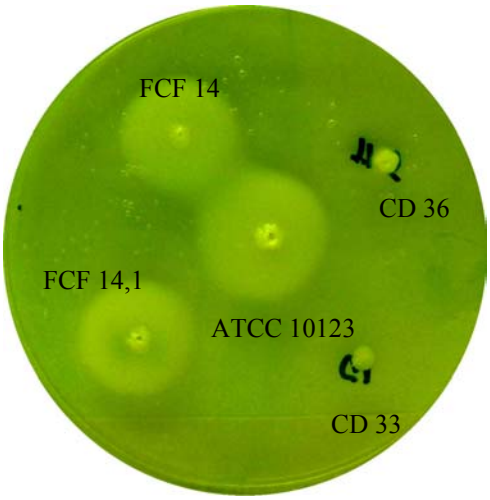


Figura 78: Meio WO acrescido de 5% BSA fração V v/v. Em torno das colônias FCF 14, FCF 14,1 e ATCC 10123, todas de *C. albicans*. ocorreu a formação de um halo de coagualçao. As linhagens CD 33 e CD 36 de *C. dubliniensis* foram usadas como controle negativo.

5.8 Ensaio da filamentação

O processo de filamentação em *Candida spp*, entendido como importante fator de virulência (BISWAS, 2007), foi facilmente identificado nos ensaios empregados. Adicionalmente, a modificação no meio originalmente descrito (DIAS, 2006) pode ser o início de um método novo para estudar este fenômeno, *in vitro*, e certamente correlacioná-lo com a virulência do isolado. Através dos resultados é possível propor uma hipótese plausível: um fator de crescimento ou indutor, se difunde a partir do SFB atingindo uma concentração na superfície do meio onde inoculamos o fungo suficiente para induzir a filamentação. Contudo, a diferença temporal e qualitativa na filamentação entre o teste clássico e o teste modificado, sugere a existência de um inibidor que retarda o aparecimento das hifas quando a cultura cresce diretamente em presença de SFB. Aparentemente o processo é complexo, e poderíamos sugerir que existe um ativador e também, inibidores da filamentação no soro.

6 Conclusão

As duas metodologias empregadas para a genotipagem dos fungos estudadas no trabalho mostraram ser ferramentas eficientes que permitiram a identificação e diferenciação inequívoca entre as diversas linhagens das sete espécies estudadas.

A ribotipagem por PCR "multiplex" e RFLP com *Dde*I é uma alternativa viável por ser prática e acessível, necessitando de um mínimo de recursos para ser realizada, podendo inclusive ser empregada em larga escala.

Tornam-se necessários mais estudos para estabelecer a abrangência do seu poder de diferenciação entre outras espécies do gênero, e sua reprodutibilidade, o que pode ampliar o espectro de aplicações.

A identificação fenotípica deve ser usada com cautela, principalmente se empregada em estudos epidemiológicos, podendo gerar dados estatísticos de baixa precisão, ou em associação com testes de virulência gerando resultados falso-positivo/falso-negativo.

A análise *in silico* do genoma mitocondrial dos três fungos estudados identificou genes que possuem seqüências bem conservadas e que foram usadas para a construção de iniciadores, que buscam identificar regiões possivelmente polimórficas nos fungos do gênero *Candida spp* podendo, dessa forma, auxiliar na diferenciação das espécies entre si. Contudo, se faz necessário a otimizar o processo de amplificação por PCR e verificar se o resultado é facilmente reproduzível. A dificuldade de encontrar regiões de alta discriminação e amplificáveis por PCR gerando produtos de tamanhos abaixo de 2 kb tornou as amplificações difíceis de serem otimizadas. Para estudos de diversidade esta estratégia não levará a procedimentos práticos.

O teste em placa da fosfolipase é prático, contudo pode conter viés metodológico, se fazendo necessário comprovar seus resultados com um teste bioquímico bem estabelecido. Desde o trabalho original, grande número de artigos utilizaram o método, simples e barato

(KADIR, GÜMRÜ, CAN, 2007). No entanto, não houve preocupação de confirmar a associação entre o halo formado e a atividade enzimática da fosfolipase excretada no meio.

O meio modificado para induzir filamentação em *Candida spp* sugere a existência de indutores e inibidores da filamentação presentes em SFB. Mais estudos nessa área podem revelar mais detalhes que ajudem a entender o mecanismo pelo qual *Candida spp* percebe e reage às variações no meio ambiente no qual está adaptado. A nível de genes com expressão ativada ou reprimida neste processo muito se conhece (BISWAS, 2007), porém muito pouco se sabe sobre os compostos do soro responsáveis para essa resposta.

Destacaria que, dos resultados comentados acima, as contribuições mais importantes deste trabalho seriam:

1- A comparação entre a identificação molecular que é fortemente objetiva e a fenotípica, mais sujeita a variabilidade metodológica e ao viés de interpretação revelou, neste estudo, a necessidade de empregar a devida cautela na avaliação de resultados derivados do emprego da metodologia clássica.

2- Desenvolvemos um teste molecular de execução relativamente simples e barata que permitiu distinguir entre sete espécies de *Candida spp* de importância médica. A real utilidade prática deste método vai depender de um estudo com um número significativo de amostras adequadamente classificadas pela metodologia tradicional.

REFERÊNCIAS

ADANS, A., GOTTSCHLING, D. E., KAISER, C. A., STEARNS, T. **Methods in yeast genetics. A Cold Spring Harbor Laboratory course manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratoru Press, 1998, 177p

ALBERTS, B., *et al.* **Essential cell biology: an introduction to the molecular biology of the cell.** New York & London: Garland Publishing, Inc, 1998.

ANDERSON, J. B., WICKENS, C., KHAN, M., COWEN, L. E., FEDERSPIEL, N., JONES, T., KOHN, L. M. Infrequent genetic exchange and recombination in the mitochondrial genome of Candida albicans**. J. Bacteriol**. v. 183 n.3, p. 865-872, 2001.

Basic Local Alignment Search Tool: banco de dados. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome. Acesso em 10 jun 2007.

BISWAS, S., DIJCK, P.V., DATTAI, A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans.* **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v. 71, p. 348–376 , 2007.

CHEN Y., EISNER, J. D., KATTAR, M. M., BARRET, S. L R., LAFE, K., BUI, U., LIMAYE, AJIT, P., COOKSON, B. T. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically importan yeast. **J. Clin Microbiol.** v. 39, n.11, p. 4042-4051, 2001.

COLEMAN, A. W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparsisons. **Trends in Genetics.** v. 19, n.7, p. 370-375, 2003.

DANIEL, H. M., MEYER, W. Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. **Int. J. Food Microbiol.** v. 86, P. 61-78, 2003.

DIAS, M. V. S. **Novos transposons para construção de fusão com GFP em *Candida albicans*: um estudo fenotípico e de localização da septina Cdc3.** 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2006.

DIEZMANN, S., COX, C. J., SCHONIAN, G., VILGALYS, R. J., MITCHELL, T. G. Phylogeny and Evolution of Medical Species of Candida and Related Taxa: a Multigenic Analysis **J. Clin. Microbiol**. v. 42, n.12, p. 5624-5635, 2004.

DUARTE, F. A. M., PEREZ, A. M., PENA, S. D., BARROS, M. P. M., ROSSI, E. O. **A avaliação do DNA como prova forense.** Ribeirão Preto: FUNPEC, 2001, 283p.

GEE, S. F., JOLY, S., SOLL, D. R., MEIS, J. F. G. M., VERWEIJ, P. E., POLACHECK, I., SULLIVAN, D. J., COLEMAN. D. C. Identification of four genotypes of *Candida dubliniensis* and detection of microevolution *in vitro* an *in vivo.* **J. Clin. Microbiol.** v. 40, p. 556-574, 2002.

GILFILLAN, G. D., SULLIVAN, D. J., HAYNES, K., PARKINSON, T., COLEMAN, D. C., GOW, N. A. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. **Microbiology.** v. 144, p. 829-838, 1998.

GUARRO, J., GENÉ, J., STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clin. Microbiol**. **Rev**. v.12, p.454-500, 1999.

HAUSMANN, R. **História da biologia molecular.** 2 ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002, 295p.

IWEN, P. C., HENRY, T., HINRICHS, S. H. ITS sequence identification of fungal pathogens, 2002. Unpublished. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=6815813. Acesso em: 10 jun. 2007.

JONES, T., NANCY, A. F., CHIBANA, H., DUNGAN, J., KALMAN, S., MAGEE, B. B., NEWPORT, G., THORSTENSON, Y. R., AGABIAN, N., MAGEE, P. T., DAVIS, R. W., SCHERER, S. The diploid genome sequence of Candida albicans. **PNAS.** v.101, p 7329-7334, 2004.

KADIR, T., GÜMRÜ, B., CAN, U. B. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: the influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. **Arch Oral Biol.** v. 52, n. 7, p. 691-696, 2007.

KONEMAN, E. W., *et al*. **Diagnostico microbiologico: Texto e atlas colorido**. 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, 1465 p.

KOSZUL, R., MALPERTUY, A., FRANGEUL, L., BOUCHIER, C., WINCKER, P., THIERRY, A., DUTHOY, S., FERRIS, S., HENNEQUIN, C., DUJON, B. The complete mitochondrial genome sequence of the pathogenic yeast Candida (Torulopsis) glabrata. **J. FEBS Lett.** v. 534, p. 39-48, 2003.

LEINBERGER, D. M., SCHUMACHER, U., AUTENRIETH, I. B., BACHMANN,T.T. Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. **J. Clin. Microbiol**. v. 43, n.10, p 4943-4953, 2005.

LODISH, H., *et al*. **Molecular cell biology.** 4 ed. New York: W. H. Freeman Company, 1999

MÄHNB, B., STEHR, F, SCHÄFER,W., NEUBER, K. Comparison of standard phenotipic assays with a PCR method to discriminat *Canida albicans* and *C. dubliniensis.* **Mycoses.** v. 48, p. 55-61, 2005.

McCULLOUGH, M. J., CLEMONS, K. V., STEVENS, D. A. Molecular and phenotipic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellaoidea.* **J. Clin. Microbiol.** v. 37 n.2, p. 417-421, 1999.

MEDLIN, L., ELWOOD, H. J.; STICKEL, S., SOGIN, M. L. The characterization of enzymatically amplified eukariotic 16S-like rRNA-coding regions. **Gene.** v. 71, p. 491-499, 1988.

METZGAR, D., FIELD, D., HAUBRICH, R., WILLS, C. Sequence analysis of a compound coding-region microsatellite in Candida albicans resolves homoplasies and provides a high-resolution tool for genotyping. **FEMMS Immunol. Medical Microbiol**. v. 20, p. 103-109, 1998.

MORAN, G. P., SANGLARD, D., DONNELY, S. M., SHANLEY, D. B., SULLIVAN, D. J. COLEMAN, D. C. Identification and expression of multidrug transporters respponsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis.* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.42, p.1819-1830, 1998.

MORRIS, M. L., ANDREWS, R. H., ROGERS, A. H. ELLIS, D. H. 18S rRNA gene full sequence for the type strain of Candida albicans, CBS 562, Unpublished, 1999. Disponível em : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=4512045. Acesso em: 10 jun. 2007.

MOTA, A. J., NÓBREGA, F. G. Indução do pleomorfismo de *Cândida albicans* por Soro Fetal Bovino. In: IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, V Encontro Latino Americano de Pós Graduação da UNIVAP, 2005, São José dos Campos, SP. **Anais de Resumos**. São José dos Campos: UNIVAP, 2004. p. 21.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**. v. 262, n.4, p. 56-61, 64-5, 1990

NIEWERTH, M., KORTING, H. C. Phospholipases of *Candida albicans.* **Mycoses.** v. 44, p. 361-367, 2001.

ODDS, F. C., BERNARTS, R. CHROMagar Candida, a New Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important *Candida* Species. **J. Clin. Microbiol**. v. 32 p. 1923-1929, 1994

PADOVAN, A. C. B., MELO, A. S. A., BRIONES, M. R. S. Phylogenetic characterization of three groups of Candida parapsilosis by 18S rDNA sequences. Unpublished, 2001. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=17266284. Acesso em: 10 jun. 2007.

PETERSEN, R., F., MARINONI, G., NIELSEN, M., L., PISKUR, J. Molecular approahes for analyzing diversity an phylogeny among yeast species. **Contrib. Microbiol.** v. 5, p. 15-35, 2000.

PINTO, P. M., RESENDE, M. A., KOGA-ITO, C. Y., FERREIRA, J. A. G., TENDLER M. rDNA-RFLP identification of Candida species in immunocompromised and seriously diseased patients. **Can. J. Microbiol**. v. 50, p 514-520, 2004 .

PLAYFORD, E. G., KONG, F., SUN, Y., WANG, H., HALLIDAY, C., SORRELL, T. C. Simultaneous Detection and Identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Cryptococcus* Species by Reverse Line Blot Hybridization. **J. Clin. Microbiol.** v. 44 n.3, p. 876-880, 2006.

PRICE, M. F., WILKINSON, I. D., GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans.* **Sabouraudia**. v. 20, p. 7-14, 1982.

RODRIGUES, A. G., VAZ, C. P., OLIVEIRA, S. C., TAVARES, C. Expression of plasma coagulase among pathogenic *Candida* Species. **J. Clin. Microbiol**. v. 41, p. 5792-5793, 2003.

RUCHEL, R., TEGELER, R., TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains os *Candida albicans.* **Sabouraudia.** v. 20, p. 233-244, 1982.

RYCOVSKA, A., VALACH, M., TOMASKA, L., BOLOTIN-FUKUHARA, M., NOSEK, J. Linear versus circular mitochondrial genomes: intraspecies variability of mitochondrial genome architecture in Candida parapsilosis. **Microbiology**. v.150, p. 1571-1580, 2004.

SAMARANAYAKE, L. P., RAESIDE, J. M., MACFARLANE, T. W. Factores affecting the phospholipase activity of candida species in vitro. **Sabouraudia**. v. 22, p. 201-207, 1984.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 3 ed., New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A laboratory manual**. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.

SELVARANGAN, R. J., LIMAYE, A. J., COOKSON, B. T. Rapid Identification and Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by Capillary-Based Amplification and Fluorescent Probe Hybridization. **J. Clin. Microbiol.** v. 40 n.11, p. 4308-4312, 2002.

SHENG, J., WANG,L., WANG, X. Research on diversity of marine yeast. Unpublished, 2006. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=110564235. Acesso em: 10 jun. 2007.

SHIMIZU, M. T., JORGE,A. O. C., UNTERKIRCHER C. S., FANTINATO V., PAULA, C., R. Hyaluronidase and chondroitin sulphatase production by diferrent species of *Candia.* **J. Medical Veterenary Micol.** v. 33, p. 27-31, 1995.

SHIMIZU, M. T., ALMEIDA, N. Q., FANTINATO V., UNTERKIRCHER, C. S. Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase proteinase an phospholipase secreted by *Candida* species. **Mycoses.** v. 39, p. 161-167, 1996.

SKINNER, C. E, FLETCHER, D. W. A review of the genus candida. **Bacteriol Rev.** v.24 n.4, p.397-416, 1960.

SOLL, D. R., PUJOL, C. *Candida albicans* clades. **FEMS Immunol. Medical Microbiol.** v. 39, p. 1-7, 2003.

SOLL, D. R. *Candida* commensalism and virulence: the evoluion of phenotypic plasticity. **Acta Tropica**. v. 81, p.101-110, 2002.

SUH, S. O., NGUYEN, N. H., BLACKWELL, M. A yeast clade near Candida kruisii uncovered: nine novel Candida species associated with basidioma-feeding beetles. **Mycol. Res.** v. 110, p. 1379-1394, 2006.

SULLIVAN, D. J., COLEMAN, D. C. *Candida dubliniensis*; characteristics and identification. **J. Clin. Microbiol.** v.31, p.229-234, 1998.

TALLA, E., ANTHOUARD, V., BOUCHIER, C., FRANGEUL, L., DUJON, B. The complete mitochondrial genome of the yeast Kluyveromyces thermotolerans**. J. FEBS Lett**. v. 579, n.1, p. 30-40, 2005.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2004, 718 p.

TSUYOSHI,N., FUDOU,R., YAMANAKA,S., KOZAKI,M., TAMANG,N., THAPA,S. TAMANG,J.P. Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim, a microbial starter for amylolytic fermentation Int**. J. Food Microbiol**. v. 99 n.2, p 135-146, 2005.

YANG, Y. L. Virulence factors of *Candida* species. **J. Microbiol. Immunol. Infect**. v.36, p.223-228, 1998.

YANG, Y. LIU, Y. Biodiversity of Yeast Isolated from Viticultural District of Xinjiang, Unpublished, 2007. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=124108050. Acesso em 10 jun. 2007

VALÉRIO, H. M., OLIVEIRA, R. C. B. W., DE RESENDE, M. A. Differentiation of *Candida* species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 39, n.2, p. 174-178, 2006.

WU, Z., WANG, X., BLOMQUIST, G. Evaluation of PCR primers and PCR conditions for especific detection of common airborne fungi. **J. Environ. Monit.** v. 4, p. 377-382, 2002.

WU, Z., TSUMURA, Y., BLOMQUIST, G., WANG, X. 18S rRNA gene variation among common airborne fungi, and development os especific oligonucleotide probes for the detection of fungal isolates. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 69, n.9, p. 5389-5397, 2003.

ANEXO

Exemplo de uma publicação de uma das seqüências geradas nesse trabalho

```
LOCUS    EF591020        555 bp    DNA     linear   PLN 05-JUN-2007
DEFINITION  Candida albicans strain FCF 14 28S ribosomal RNA gene, partial
sequence.
ACCESSION   EF591020
VERSION     EF591020
KEYWORDS    .
SOURCE      Candida albicans
ORGANISM   Candida albicans
           Eukaryota; Fungi; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes;
           Saccharomycetales; mitosporic Saccharomycetales; Candida.
REFERENCE   1  (bases 1 to 555)
AUTHORS   Mota,A.J., Stanisce,R. and Nobrega,F.G.
TITLE     Use of molecular techniques for identifcation and differentiation
of Candida species
JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 555)
AUTHORS   Mota,A.J., Stanisce,R. and Nobrega,F.G.
TITLE     Direct Submission
JOURNAL   Submitted (03-MAY-2007) Laboratorio de Genetica Molecular e
Genomas, Universidade do Vale do Paraiba - IP&D I, Av. Shishima Hifumi,
2911 - Urbanova, Sao Jose dos Campos, Sao Paulo 12244-000, Brazil
FEATURES             Location/Qualifiers
    source          1..555
                    /organism="Candida albicans"
                    /mol_type="genomic DNA"
                    /strain="FCF 14"
                    /db_xref="taxon:5476"
                    /clone="1"
    rRNA            <1..>555
                    /product="28S ribosomal RNA"

   ORIGIN
     1  gcggcaaaag  ctcaaatttg  aaatctggcg  tctttggcgt  ccgagttgta  atttgaagaa
    61  ggtatctttg  ggcccggctc  ttgtctatgt  tccttggaac  aggacgtcac  agagggtgag
   121  aatcccgtgc  gatgagatga  cccgggtctg  tgtaaagttc  cttcgacgag  tcgagttgtt
   181  tgggaatgca  gctctaagtg  ggtggtaaat  tccatctaaa  gctaaatatt  ggcgagagac
   241  cgatagcgaa  caagtacagt  gatggaaaga  tgaaaagaac  tttgaaaaga  gagtgaaaaa
   301  gtacgtgaaa  ttgttgaaag  ggaagggctt  gagatcagac  ttggtatttt  gcatgctgct
   361  ctctcggggg  cggccgctgc  ggtttaccgg  gccagcatcg  gtttggagcg  gcaggataat
   421  ggcggaggaa  tgtggcacgg  cttctgctgt  gtgttatagc  ctctgacgat  gctgccagcc
   481  tagaccgagg  actgcggttt  ttaacctagg  atgttggcat  aatgatctta  agtcgcccgt
   541 cttgaaacac ggacc
```

Tabela 15: Números de acesso das seqüências publicadas em colaboração durante a realização do mestrado e as respectivas espécies identificadas.

Número de Acesso	Microorganismo
EF495131	*Mycena sp*
EF513169	*Mycena sp*
EF514207	*Gerronema viridilucens*
EF552370	*Arthroderma gypseum*
EF552371	*Arthroderma incurvatum*
EF552372	*Arthroderma incurvatum*
EF552373	*Arthroderma gypseum*
EF552374	*Arthroderma gypseum*
EF552375	*Arthroderma gypseum*

Tabela 16: Números de acesso das seqüencias geradas no projeto de mestrado.

Número de Acesso	Microorganismo	Linhagem
EF591020	*Candida albicans*	FCF 14
EF591021	*Candida albicans*	FCF 14,1
EF591022	*Candida albicans*	ICB 58
EF591023	*Candida albicans*	LGMG 1D
EF591024	*Candida albicans*	LGMG 1H
EF591025	*Candida albicans*	LGMG 1J
EF591026	*Candida albicans*	LGMG 1K
EF694598	*Candida albicans*	15D
EF690390	*Candida glabrata*	LGMG 2A
EF690391	*Candida glabrata*	LGMG 2B
EF690392	*Candida glabrata*	LGMG 2C
EF690393	*Candida glabrata*	LGMG 2D
EF690394	*Candida glabrata*	LGMG 2E
EF694597	*Candida guilliermondii*	H1020
EF694599	*Candida guilliermondii*	ICB 06
EF694600	*Candida guilliermondii*	H585
EF694619	*Candida guilliermondii*	LGMG 4B
EF694601	*Candida krusei*	LGMG 3A
EF694603	*Candida parapsilosis*	LGMG 5C
EF694605	*Candida parapsilosis*	LGMG 5D
EF694606	*Candida parapsilosis*	LGMG 5J
EF694607	*Candida parapsilosis*	LGMG 5I
EF694608	*Candida parapsilosis*	LGMG 5K
EF694609	*Candida parapsilosis*	LGMG 5A
EF694611	*Candida parapsilosis*	LGMG 5E
EF694613	*Candida parapsilosis*	LGMG 5F
EF694614	*Candida parapsilosis*	LGMG 5H
EF694620	*Candida parapsilosis*	LGMG 5G
EF694621	*Candida parapsilosis*	LGMG 5L
EF694602	*Candida parapsilosis*	ICB 15
EF694616	*Candida lusitaniae*	LGMG 6A
EF694604	*Candida tropicalis*	FCF 426
EF694610	*Candida tropicalis*	LGMG 7A
EF694612	*Candida tropicalis*	LGMG 7B
EF694617	*Candida tropicalis*	LGMG 7E
EF694622	*Candida tropicalis*	LGMG 7D
EF694615	*Picchia anomala*	LGMG 8A
EF694618	*Picchia anomala*	LGMG 8B