

Tatiana Pinotti

**LEVEDURAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE PLANTAS DE
ÁREAS DE CULTIVO ORGÂNICO NA REGIÃO DE
SEROPEDICA, RJ**



Tese apresentada ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes (IMPPG) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientadores: Ulysses Garcia Lins, Allen Norton Hagler



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes
Rio de Janeiro
Agosto de 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ficha Catalográfica

Pinotti, T.

Diversidade de leveduras endofíticas em plantas de agricultura orgânica (Seropedica – RJ) e sua produção de micocinas e proteases / Tatiana Pinotti – Rio de Janeiro, 2010
XVII, 124

Tese [Doutorado em Ciências (Microbiologia)]

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2010

Orientadores: Ulysses Garcia Casado Lins, Allen Norton Hagler

Referências Bibliográficas: f 96

1. leveduras endofíticas 2. meios de enriquecimento 3.bioprospecção 4.leveduras “killer”, 5. leveduras queratinolíticas I. Ulysses Garcia Casado Lins, Allen Norton Hagler II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Doutorado em Ciências (Microbiologia). III. Diversidade de leveduras endofíticas em plantas orgânicas (Seropedica – RJ) e sua produção de micocinas e proteases

TATIANA PINOTTI

**DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS EM PLANTAS
DE AGRICULTURA ORGÂNICA (SEROPEDICA – RJ) E SUA
PRODUÇÃO DE MICOCINAS E PROTEASES**

Tese apresentada ao Instituto de Microbiologia
Professor Paulo de Góes visando a obtenção do grau
de Doutor em Ciências - Microbiologia

Rio de Janeiro, 17 de agosto de 2010

Prof. Ulysses Garcia Casado Lins (Prof. Associado – IMPPG - UFRJ) - Orientador

Prof. Allen Norton Hagler (Prof. Titular – IMPPG - UFRJ) - Orientador

Prof. Andrew Macrae (Prof. Adjunto – IMPPG – UFRJ) - Revisor

Prof. Rosalie Reed Coelho (Prof. Associado – IMPPG – UFRJ) – Titular interno

Prof. Rodolfo P. da Rocha Paranhos (Prof. Associado – IB – UFRJ) - Titular externo

Prof. Fernando Carlos Pagnocca (Prof. Adjunto – UNESP) - Titular externo

Prof. Fernando Portela Camara (Prof. Associado – IMPPG – UFRJ) – Suplente externo

Prof. Alane Beatriz Vermelho (Prof. Associado – IMPPG – UFRJ) - Suplente interno

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Ambiental e de Leveduras e no Laboratório de Biologia e Ultraestrutura de procariotos, ambos no Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro sob a orientação do Prof. Ulysses Garcia Casado Lins e do Prof. Allen Norton Hagler.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado, pela confiança e dedicação.

A minha família, em especial minha mãe e minha irmã por compreenderem os diversos momentos em que não podia dar atenção a elas pois estava escrevendo tese. Amo muito vocês.

Ao meu amado Luiz Fernando Zmetek, melhor amigo, companheiro, futuro marido e eterna fonte de inspiração.

Aos amigos e companheiros de laboratório, do passado e do presente: Patricia Carvalho, Anderson Cabral, Marcella Novaes, Natália Soares, Karina Garcia, Andrei Huszar, José Roberto Ribeiro, Oscarina Vianna, Zhoraidy Lima, Selma Batista, Paulo Hargreaves, Simone Dealtry, Angela Michelato, Ida Neves. Poderia dizer mil coisas mas me limito a dizer que são uma segunda família.

Aos amigos de outros laboratórios: Daniele Alves, Adriana Fróes, Talita Duarte, Renata Calixto.

Aos amigos de sempre: Elisabeth Silveira, Marluce Fonseca, Tatyane Reis, Xanda, Dani, Paula Sette, Ian Vieira e diversos outros que me trazem tantas alegrias.

Aos meus queridos alunos de Iniciação Científica (“meus filhinhos”) Vinicius Santos e Tayná Rosa, por tudo que aprendemos juntos.

A todos os professores do IMPPG-UFRJ, que contribuíram para minha formação como microbiologista. Em especial a Prof. Leda Mendonça Hagler, Prof. Rosalie Reed Coelho e Prof. Alane Vermelho, pela colaboração com este trabalho.

A EMBRAPA Agrobiologia, em especial a Prof. Norma Rumjanek, por conceder o acesso ao local de coleta.

Ao Centro Pan-Americano de Febre Aftosa por permitir o uso do 310 Genetic Analyzer.

Aos órgãos de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/ Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (CNPq/Pronex) pelas bolsas concedidas e pelo apoio financeiro, sem o qual esse trabalho não poderia ser realizado.

E a Deus por ter guiado meus passos até aqui.

RESUMO

A escassez de dados sobre leveduras endofíticas na literatura pode estar relacionada ao fato de que a metodologia tradicional de isolamento de endofíticos não seja adequada para o isolamento de leveduras. Nosso objetivo foi caracterizar a comunidade de leveduras endofíticas utilizando metodologia adaptada para estes organismos e detectar estirpes “killer” e queratinolíticas. Foram realizadas 3 coletas de amostras de folhas sadias de milho, café, abacaxi, alface, limão, cana de açúcar, arroz, mandioca, cultivados no sistema orgânico. No total, foram coletadas 60 amostras no SIPDA da EMBRAPA (Seropédica, RJ). Amostras de 11g foram utilizadas e a superfície das folhas foi esterilizada utilizando etanol e hipoclorito de sódio. Além disso, foi realizada uma lavagem com meio de cultivo BIL [glicose (0,5%), extrato de levedura (0,1%), (NH₄)₂ SO₄ (0,1%), NaH₂PO₄ (0,2%), MgSO₄ (0,01%), KCl (0,04%), cloranfenicol (0,04%), amoxicilina (0,05%)] para o controle de esterilidade. As amostras foram imersas no mesmo meio e trituradas em liquidificador. Variações do meio de cultivo BIL foram utilizadas como enriquecimento e após 3, 7, 14 e 28 dias foi feito o isolamento em Agar YM e/ou Agar BIL contendo xilose e lactose. As estirpes isoladas foram então identificadas utilizando morfologia, testes bioquímicos e seqüenciamento da região D1/D2 do rDNA. Foram obtidas 226 leveduras endofíticas em 36 amostras. Por outro lado, utilizando o método convencional de isolamento de endofíticos, só foram isoladas 2 estirpes em 24 amostras. Nas amostras de mandioca, limão e café foi possível detectar menos de 1 espécie de levedura por amostra. As plantas da família Poaceae (milho, cana de açúcar e arroz) apresentaram os maiores números de espécies por amostra. Para todas as plantas, exceto arroz, a maioria dos isolados foi de basidiomicetos (*Cryptococcus* spp. e *Pseudozyma* spp.) e destaca-se também a presença de leveduras produtoras de pigmentos carotenóides (*Rhodotorula*, *Sporidiobolus* e *Sporobolomyces*). Dentre os ascomicetos notou-se uma dominância de espécies de *Candida intermedia*, *Candida pseudointermedia* e *Candida saopaulonensis*, *Candida etchelsii*, *Candida guilliermondii* e espécies do clado *Debaryomyces*. Também foram detectadas leveduras pretas. Muitas das espécies detectadas são comuns no filoplano. Quatorze estirpes seqüenciadas tiveram menos de 99% de similaridade com sequências de espécies descritas, sugerindo serem de espécies novas. Esse fato ocorre principalmente para os basidiomicetos, dentro dos gêneros *Pseudozyma*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus*. Porém, dentre os ascomicetos *Candida* sp. 1 se destaca por ter apenas 84% de similaridade com *C. sorbophila*, a espécie descrita mais próxima. Onze isolados, identificados como *Pseudozyma* aff. *profilica*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus flavescens*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus* sp., *C. pseudointermedia*, *C. intermedia*, *Aureobasidium pullulans*, foram capazes de produzir queratinases. Quatorze isolados foram capazes de produzir toxinas “killer” (*Pseudozyma* aff. *fusiformata*, *C. flavescens*, *C. sorbosa*, *Derxomyces pseudohuiaensis*, *C. flavus*, *Cryptococcus* sp., *A. pullulans*, *C. guilliermondii*, *C. etchelsii*, *C. sake*). Trituração e uso de diversos meios de cultivo foram eficientes na recuperação de leveduras endofíticas tendo em vista que foi possível recuperar leveduras das oito plantas testadas. Diferentes meios selecionaram grupos distintos de leveduras. Os tecidos vegetais, por terem sido pouco estudados, podem ser um ambiente propício a detecção de novas espécies de leveduras, em especial as espécies basidiomicéticas.

Palavras chave: leveduras endofíticas, meios de enriquecimento, bioprospecção, leveduras “killer”, leveduras queratinolíticas

ABSTRACT

The lack of data on endophytic yeasts may be due to the inefficacy of the traditional methodology used for isolating endophytic microorganisms when applied to yeasts. Our goal was to characterize the endophytic yeast community using a yeast oriented methodology and to detect killer and keratinolytic yeasts. Healthy leaf samples from organic grown maize, coffee, pineapple, lettuce, lemon, sugar cane, rice and manioc were collected at 3 different times. A total of 60 samples were collected in SIPDA, EMBRAPA (Seropédica, RJ). Leaf surfaces (11g) were sterilized using ethanol and sodium hypochlorite. The sterilized leaves were washed with BIL medium (0.1% yeast extract; 0.1 % (NH₄)₂ SO₄; 0.2% NaH₂PO₄; 0.01% MgSO₄; 0.04% KCl; 0.04% cloramphenicol; 0.05% amoxicilin) with 0,5% glucose, which was used as a sterility growth control. Samples were placed in the same medium and processed using a blender. BIL media with different C sources and inhibitors were used in enrichment cultures for 3, 7, 14 and 28 days with isolations carried out on YM Agar and/or BIL Agar with xylose and lactose. The strains obtained were identified by morphological and biochemical tests and by partial rDNA sequencing. A total of 226 endophytic yeast strains were isolated from 36 samples, however, using the conventional method for endophytic isolation, only 2 strains were harvested from 24 samples. Less than 1 yeast species per sample was detectable from manioc, lemon and coffee. Plants of the Poacea family presented the highest yield of species per sample. All plants, apart from rice, had mostly basidiomycetous yeasts (*Cryptococcus*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* e *Sporobolomyces* species). Within ascomycetes yeasts, *Candida intermedia*, *Candida pseudointermedia* e *Candida saopaulonensis*, *Candida etchelsii*, *Candida guilliermondii* and other species from the *Debaryomyces* clade were dominant. Black yeasts were also detected. Fourteen sequenced strains had under 99% similarity with sequences of known species, suggesting that they are new species. This happened generally in basidiomycetes of the *Pseudozyma*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus* genera. Nevertheless the ascomycete *Candida* sp. 1stands out by having only 84% similarity with the closest described species *Candida sorbophila*. Eleven strains, identified as *Pseudozyma aff. profilica*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus flavescens*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus* sp., *C. pseudointermedia*, *C. intermedia*, *Aureobasidium pullulans*, produced keratinases. Fourteen strains were killer yeasts (*Pseudozyma aff. fusiformata*, *C. flavescens*, *C. sorbosa*, *Dexomyces pseudohuiaensis* ?, *Cryptococcus flavus*, *Cryptococcus* sp., *A. pullulans*, *C. guilliermondii*, *C. etchelsii*, *C. sake* ?). The triturating step and use of different culture media were essential in isolating diverse endophytic yeasts. Different media selected distinct yeast groups. Most species detected are common yeasts of the phylloplane. Since there have only been a limited number of studies of yeasts in the phyllosphere, this is a good environment for discovering new yeast species, especially basidiomycetes.

Keywords: endophytic yeasts, enrichment media, bioprospection, killer yeasts, keratinolytic yeasts.

LISTA DE TABELAS

- ❖ **Tabela 1:** Dados referentes a temperatura e umidade relativa média obtidos no local de coleta – página 31
- ❖ **Tabela 2:** Meios de enriquecimento utilizados – página 33
- ❖ **Tabela 3:** Leitura de resultados dos testes de assimilação – página 38
- ❖ **Tabela 4:** Culturas tipo utilizadas como padrões para identificação molecular e número de acesso no GeneBank da seqüência da região D1/D2 do rDNA - página 47
- ❖ **Tabela 5:** Estirpes sensíveis (alvo) utilizadas no teste de detecção do fenótipo “killer” – página 48
- ❖ **Tabela 6:** Similaridade entre as seqüências da região de D1/D2 de leveduras endofíticas e leveduras tipo. As culturas com similaridade de 99% (ou maior) com a espécie tipo foram consideradas da mesma espécie. Espécies com similaridade superior a 96% e inferior a 99% foram consideradas espécies relacionadas (*aff.*). As espécies indicadas com um * foram identificadas apenas através de seqüenciamento da região D1/D2 do rDNA. – página 51
- ❖ **Tabela 7:** Frequência de espécies de leveduras endofíticas por planta por folha - 3 amostras de arroz (AR), cana de açúcar (CA), mandioca (MA), café (C) e limão (L), 6 amostras de alface (AL) e abacaxi (AB) e 7 amostras de milho (MI). As espécies marcadas com um * tiveram suas identificações confirmadas por seqüenciamento da região D1/D2 de rDNA. As espécies com um ? não possuem todas as características fenotípicas idênticas a descrição padrão da espécie – página 53
- ❖ **Tabela 8:** Frequência de espécies de leveduras endofíticas por meio de enriquecimento – página 55
- ❖ **Tabela 9:** Número de espécies detectadas por planta e por meio de enriquecimento – página 56
- ❖ **Tabela 10:** Distribuição das espécies de leveduras endofíticas isoladas de abacaxi por meio de enriquecimento – página 58
- ❖ **Tabela 11:** Distribuição das espécies de leveduras endofíticas isoladas de milho por meio de enriquecimento – página 60

- ❖ **Tabela 12:** Distribuição das espécies de leveduras endofíticas isoladas de arroz por meio de enriquecimento – página 61
- ❖ **Tabela 13:** Distribuição das espécies de leveduras endofíticas isoladas de cana de açúcar por meio de enriquecimento – página 62
- ❖ **Tabela 14:** Distribuição das espécies de leveduras endofíticas isoladas de alface por meio de enriquecimento – página 63
- ❖ **Tabela 15:** Detecção de microrganismos endofíticos utilizando metodologia convencional. Para cada amostra foram testados 12 fragmentos de folha, em cada um dos meios de cultura (4 fragmentos por placa, 3 placas de cada meio, por amostra). Os números representam o número de colônias de fungo em cada amostra – página 66
- ❖ **Tabela 16:** Leveduras endofíticas que apresentaram fenótipo “killer” (+) ou inibitório (i) – página 67
- ❖ **Tabela 17:** Leveduras endofíticas queratinolíticas – página 68
- ❖ **Tabela 18:** Caracterização fenotípica de leveduras endofíticas. As culturas marcadas com * tiveram sua identificação confirmada por sequenciamento – páginas 113 a 122 (em anexo)

LISTA DE FIGURAS

- ❖ **Figura 1:** Levedura endofítica (*R. mucilaginosa*) em estômato de citrus (escala: 3µm) detectada por GAI e colaboradores (2009). - página 6.
- ❖ **Figura 2:** A) Placa de Petri contendo meio de cultura PCA, com fragmentos de folhas de erva baleeira (*Cordia verbenácea*), após incubação por 48 horas a 30°C (disponível em http://eduep.uepb.edu.br/biofar/n2v2/08-producao_de_antimicrobianos.htm, consultado em 21/05/2010). B) Aspecto de um fungo endofítico crescendo a partir de segmentos de ramos de café (disponível em <http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/endofiticos/resultados1/imagens/cafe2.jpg>, consultado em 21/05/2010) - página 10.
- ❖ **Figura 3:** Representação anatômica da folha (adaptada a partir da figura disponível em <http://www.molecularexpressions.com/cells/leaftissue/leaftissuelarge.html>) – página 20.
- ❖ **Figura 4:** Imagens do local de coleta: cultivo de mandioca (1), alface e outras hortaliças (2), café (3) e abacaxi (4) no SIPA da EMBRAPA Agrobiologia. A imagem de satélite (5) da parte aérea do SIPA foi obtida na página de internet Google Maps – página 30.
- ❖ **Figura 5:** Dados de precipitação mensal total e da temperatura média estação meteorológica Ecologia Agrícola, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2008. As setas indicam os meses da coletas – página 31.
- ❖ **Figura 6:** A) Base do multi-inoculador com 32 poços. B) carimbo do multinoculador com 32 pinos flutuantes – página 38.
- ❖ **Figura 7:** Aspecto da placa após o crescimento das colônias: à esquerda, o cultivo em glicose 0,5% e à direita o controle negativo, sem fonte de carbono – página 38.
- ❖ **Figura 8:** Escala de Wickerham. Os números indicam os valores atribuídos à leitura dos tubos. Os dados das tabelas de assimilação mostram a escala indicada na tabela 3 – página 39.
- ❖ **Figura 9:** Leitura de tubos de fermentação de glicose. De acordo com a escala de Wickerham o tubo 1 apresentou resultado +1; o tubo 2 é considerado negativo (0); os tubos 3 e 4 apresentam resultado positivo (+3) – página 41.

- ❖ **Figura 10:** Leitura do teste de síntese de compostos amilóides após 24 horas. As colônias azuis são consideradas positivas – página 43.
- ❖ **Figura 11:** Árvore filogenética mostrando a relação evolucionária dos isolados 1CA2Yb, 1MI8XL-XLa, CA1XLO e 1MI3Eb com outras espécies de leveduras baseadas no alinhamento da subunidade D1/D2 da região 26S do rDNA. A árvore foi construída usando a distância corrigida de Kimura e MEGA v4 (TAMURA et al., 2007). Os números nos ramos indicam os valores de “bootstrap” em porcentagem, baseados em 1000 repetições. A barra de escala representa 0,02 substituições de nucleotídeos em cada posição – página 59.
- ❖ **Figura 12:** Levedura detectada pela metodologia tradicional de isolamento de microrganismos endofíticos em amostra de milho – página 65
- ❖ **Figura 13:** Detecção de microrganismos endofíticos em amostras de milho, cana de açúcar, abacaxi, café, limão e alface utilizando metodologia tradicional de isolamento (meios de cultivo: PDA, BIL com glicose e YGP) – página 65
- ❖ **Figura 14:** Detecção de leveduras com capacidade de inibição, indicadas pela seta branca. – página 67.
- ❖ **Figura 15:** Leveduras em meio para detecção de atividade queratinolítica. As estirpes que apresentaram halo branco ao seu redor (indicadas com seta branca) foram consideradas positivas – página 68.
- ❖ **Figura 16:** Zimografia de queratina. A coluna 1 corresponde ao isolado 2MI7XL-XL; a coluna 2 corresponde ao isolado 2MI6XL-XL; a coluna 3 corresponde ao isolado MI8XLOb; a coluna 4 corresponde ao isolado 2MI6Y; a coluna 5 corresponde ao isolado 2AR2Y, a coluna 6 corresponde ao isolado 2AR3Y; a coluna 7 corresponde ao isolado CA3XLO-XLb; a coluna 8 corresponde ao isolado 1CA1XLa; a coluna 9 corresponde ao isolado 4AB6XL; a coluna 10 corresponde ao isolado 4AB6XL-XL; a coluna 11 corresponde ao isolado 2MI5XL-XL; a coluna 12 é um controle negativo. A seta indica a posição da banda com atividade queratinolítica, bem como seu peso molecular aproximado em comparação com seu padrão de peso molecular – página 69.
- ❖ **Figura 17:** Árvore filogenética mostrando a relação evolucionária dos isolados 2MI3G, 2MI3Y, 1MI3Ya, 4MI3XL-XL, 4MI9Y, 1MI3XL, 2MI3XL-XL, 4MI6XL, 2MI9Y, MI3E, 1MI3Ga, 2AR2Y, 2AR3Y, 1MI3B, 2MI3XL, 2MI8XL-XLc, 4MI8XL, MI7XLO-XLb, 4MI3Ga, 2AL4Ga, 2MI8XL, 2AL4Ga, 1MI7G, 1AR2Y com as espécies tipo de *Candida pseudointermedia* (CBS

6918^T), *Candida intermedia* (CBS 5572^T), *Candida saopaulonensis* (CBS 10001^T) e *Rhodotorula mucilaginosa* CBS 316^T baseadas no alinhamento da subunidade D1/D2 da região 26S do rDNA. A árvore foi construída usando a distância corrigida de Kimura e MEGA v4 (TAMURA et al., 2007). Os números nos ramos indicam os valores de “bootstrap” em percentagem, baseados em 1000 repetições. A barra de escala representa 0,02 substituições de nucleotídeos em cada posição – página 75.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ❖ AACK: Agar Amido Caseína KNO₃
- ❖ ATCC: American Type Culture Collection
- ❖ BIL: Base para isolamento de leveduras
- ❖ BLAST: Basic Local Alignment Sequence Tool
- ❖ CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures
- ❖ CMA: Corn Meal Agar
- ❖ CNPAB: Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia
- ❖ CNPMS: Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
- ❖ DBB: Diazonium Blue B
- ❖ dNTP: Desoxirribonucleótido-trifosfato
- ❖ EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético
- ❖ EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ❖ IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ❖ IMPPG: Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes
- ❖ INMET: Instituto Nacional de Meteorologia
- ❖ ITS: espaçador interno transcrito
- ❖ KLB: meio de cultivo Luria Bertani
- ❖ MLA: meio para leveduras aquáticas
- ❖ MMS: meio de cultivo para o isolamento de bactérias metilotróficas
- ❖ NCBI: National Center for Biotechnology Information
- ❖ NRRL: Agricultural Research Service Culture Collection
- ❖ PCR: reação em cadeia da polimerase
- ❖ PDA: Ágar Batata Dextrosado
- ❖ SDS: Dodecil-Sulfato de Sódio
- ❖ SIPA: Sistema Integrado de Produção Agropecuária
- ❖ TSA: Tryptone Soya Agar
- ❖ TSB: Tryptone Soya Broth
- ❖ TSR: Template Supression Reaction
- ❖ Tween 80: Polioxietileno Sorbitan Monolaurato
- ❖ UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro
- ❖ UNICA: União da Indústria de Cana de Açúcar

LISTA DE ABREVIATURAS (continuação)

- ❖ UWO: University of Western Ontario
- ❖ YCB: yeast carbon base
- ❖ YEPD: meio de cultivo com extrato de levedura, peptona e glicose
- ❖ YGP: meio de cultivo com extrato de levedura, peptona e glicose
- ❖ YNB: yeast nitrogen base
- ❖ UCD: University of California, Davis

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
INTRODUÇÃO	1
1. DISTRIBUIÇÃO DE LEVEDURAS EM PLANTAS.....	1
2. MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS.....	3
2.1. INSTALAÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS NOS HOSPEDEIROS.....	5
2.2 BENEFÍCIOS QUE OS ENDOFÍTICOS PODEM TRAZER PARA SEUS HOSPEDEIROS	7
2.3. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS.....	8
2.4. LEVEDURAS ENDOFÍTICAS.....	10
2.5. APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	14
2.6. PRODUTOS COMERCIAIS CONTENDO MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS.....	15
2. PRODUÇÃO DE TOXINAS “KILLER”	16
3. PRODUÇÃO DE ENZIMAS QUERATINOLÍTICAS.....	18
4. PRODUTOS AGRÍCOLAS ESCOLHIDOS PARA ESTE ESTUDO	19
4.1 ALFACE.....	21
4.2 MANDIOCA	21
4.3 CAFÉ	22
4.4 LIMÃO.....	23
4.5 ABACAXI.....	23
4.6 MILHO.....	24
4.7 ARROZ	25
4.8 CANA DE AÇÚCAR.....	26
CONTEXTO E MOTIVAÇÃO	27
OBJETIVOS	28
1. GERAL.....	28
2. ESPECÍFICOS.....	28
MATERIAIS E MÉTODOS	29
1. COLETA DAS AMOSTRAS	29
2. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS	31

3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E ISOLAMENTO DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS	32
3.1. ESTERILIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS AMOSTRAS.....	32
3.2. PREPARO DO CONTROLE DE ESTERILIDADE.....	33
3.3. PREPARO DO INÓCULO.....	33
3.4. OBTENÇÃO DE CULTURAS PURAS.....	34
3.5. CÓDIGO DAS ESTIRPES ISOLADAS.....	34
4. UTILIZAÇÃO DE METODOLOGIA CONVENCIONAL NA DETECÇÃO DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS	35
5. ESTOQUE DAS ESTIRPES.....	35
5.1 EM GELADEIRA.....	35
5.2 EM FREEZER -60°C.....	36
6. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	36
6.1 OBSERVAÇÃO DA MORFOLOGIA COLONIAL.....	36
6.2 OBSERVAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR UTILIZANDO MICROSCOPIA ÓPTICA.....	36
7. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA.....	37
7.1 ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO.....	37
7.1.1 Assimilação de fontes de carbono em placas.....	37
7.2 UTILIZAÇÃO DE NITRATO COMO FONTE DE NITROGÊNIO.....	40
7.3 FERMENTAÇÃO DE GLICOSE.....	40
7.4 TESTE DE DIAZONIUM BLUE B.....	41
7.5 TESTE DE TOLERÂNCIA A ALTAS CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO.....	42
7.6 TESTE DE TOLERÂNCIA A CICLOHEXIMIDA.....	42
7.7 FORMAÇÃO DO AMIDO.....	42
7.8 CRESCIMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS 37, 40 E 42°C.....	43
8. IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS.....	43
9. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	44
9.1 EXTRAÇÃO DE DNA DE LEVEDURAS.....	44
9.2 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO D1/D2 DO 26S rDNA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	44
9.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO INTERGÊNICA (ITS) POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	45
9.5 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO D1/D2 DO 26S rDNA.....	46
9.6 PRECIPITAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO COM ISOPROPANOL.....	46
9.7. ANÁLISE DA SEQUÊNCIAS DE rDNA UTILIZANDO FERRAMENTA BLAST.....	46
9.8. ANÁLISE DA SEQUÊNCIAS DE rDNA UTILIZANDO SEQUÊNCIAS TIPO.....	47
9.9. CONSTRUÇÃO DE ÁRVORE FILOGENÉTICA.....	48
10. DETECÇÃO DA ATIVIDADE “KILLER”	48
11. TRIAGEM PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE QUERATINOLÍTICA.....	49
11.1. OBTENÇÃO DO SUBSTRATO QUERATINA.....	49
11.2. DETECÇÃO DE ATIVIDADE QUERATINOLÍTICA.....	49
11.3 ZIMOGRÁFIA COM GELATINA E QUERATINA.....	50

RESULTADOS **51**

1. IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS.....	51
2. DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS POR PLANTA	53
3. DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS POR MEIO DE ENRIQUECIMENTO.....	55
4. LEVEDURAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE ABACAXI (<i>ANANAS COMOSUS</i>).....	57
5. LEVEDURAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE PLANTAS DA FAMÍLIA POACEAE	58
5.1. LEVEDURAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE MILHO (<i>ZEAMAYS</i>).....	58
5.2. LEVEDURAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE ARROZ (<i>ORYZASATIVA</i>).....	60
5.3. LEVEDURAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE CANA DE AÇÚCAR (<i>SACCHARUM SPP.</i>).....	61
.....	61
6. LEVEDURAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE ALFACE (<i>LACTUCASATIVA</i>).....	62

7. LEVEDURAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE MANDIOCA, CAFÉ E LIMÃO.	63
8. PRESENÇA DE BIÓTIPOS INCOMUNS E POSSÍVEIS ESPÉCIES NOVAS NO INTERIOR DAS AMOSTRAS DE FOLHAS.....	64
9. RECUPERAÇÃO DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS UTILIZANDO METODOLOGIA CONVENCIONAL DE ISOLAMENTO:.....	64
10. ISOLAMENTO DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS COM FENÓTIPO “KILLER”	66
11. DETECÇÃO DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS QUERATINOLÍTICAS.....	68
DISCUSSÃO	70
1. DISTRIBUIÇÃO DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS EM FOLHAS	70
2. METODOLOGIA UTILIZADA NA DETECÇÃO DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS.....	79
3. PRESENÇA DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS NAS PLANTAS INIBINDO A DETECÇÃO DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS	82
4. UTILIZAÇÃO DE DIVERSOS MEIOS DE ENRIQUECIMENTO PARA DETECÇÃO DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS	83
5. DETECÇÃO DE ATIVIDADE “KILLER” EM LEVEDURAS ENDOFÍTICAS	87
6. DETECÇÃO DE ATIVIDADE QUERATINOLÍTICA EM LEVEDURAS ENDOFÍTICAS	89
7. DETECÇÃO DE ESPÉCIES NOVAS ASSOCIADAS A PLANTAS.....	91
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS:.....	92
CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
ANEXOS	114

INTRODUÇÃO

1. Distribuição de leveduras em plantas

Leveduras são fungos ascomicéticos ou basidiomicéticos que se reproduzem assexuadamente por brotamento e, em algumas espécies, por fissão. Quando estes organismos apresentam estrutura sexual este não está relacionado a um corpo de frutificação. Porém, uma definição para estes organismos não é algo simples, nem mesmos para os estudiosos da área, tendo em vista que a diferenciação entre estes e os fungos dimórficos ainda é obscura. Esses organismos fazem parte de um grupo taxonômico artificial cuja principal característica da maioria dos representantes é ser predominantemente unicelular em pelo menos uma fase do seu ciclo celular, sem formar hifas aéreas ou conídios (WICKERHAM, 1951; BARNETT, PAYNE e YARROW, 1990; KURTZMAN e FELL, 1998; RIBEIRO, 2009).

Embora representem apenas uma pequena parte dos fungos, as leveduras são organismos ubíquos. Os substratos colonizados por estas refletem os parâmetros que permitem seu crescimento e sobrevivência. São aspectos particularmente importantes a faixa de pH (em geral entre 3 e 8), temperatura (são normalmente mesófilos, com temperatura ótima de crescimento em torno de 22 a 30°C), oxigênio (variando entre aeróbios obrigatórios e anaeróbios facultativos) e água disponível (SILVA, 2003).

As leveduras ocorrem com frequência nos solos, nos sedimentos, corpos d'água e na superfície externa e trato intestinal de animais, especialmente de insetos. Os basidiomicetos são encontrados em substratos como solo, folhas e casca de frutos devido a baixa concentração de açúcares presentes nestes substratos. Já os ascomicetos, conhecidos por sua habilidade em fermentar açúcares, são predominantes em ambientes com altas concentrações de carboidratos tais como flores, frutos e néctares (ROBBS, HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1989; SANTOS et al., 1996; ABRANCHES et al., 2000, ABRANCHES, STARMER e HAGLER, 2001).

As folhas das plantas constituem um dos maiores habitats microbianos do planeta, com dimensões estimadas em $2-6 \times 10^8 \text{ Km}^2$. Muitas espécies de leveduras são encontradas associadas a plantas, sendo abundantes nas folhas, frutas, exudatos, néctar das flores e tecidos vegetais em decomposição. Também estão presentes na rizosfera

apesar de este habitat ainda ser pouco estudado para diversidade de leveduras (PHAFF e STARMER, 1987; LACHANCE e STARMER, 1998; FONSECA E INÁCIO, 2006).

As plantas são um habitat importante para uma grande variedade de leveduras, pois sua habilidade fotossintética permite que elas sintetizem açúcares e polissacarídeos que são fontes de carbono em potencial para o crescimento desses microrganismos. Além disso, a planta fornece às leveduras sais minerais e outros micronutrientes, como as vitaminas, obtidos do solo (HAGLER et al., 1995; FONSECA e INÁCIO, 2006).

As plantas são eficientes em fornecer um meio complexo e acessível para a colonização microbiana pois crescem continuamente expostas aos microrganismos do ar, do solo e ocasionalmente da água das redondezas (ANDREWS e HARRIS, 2000). Uma grande variedade de leveduras pode ser encontrada nas diversas partes das plantas vivendo como saprófitos, comensais, simbioses, patógenos e endofíticos. Na superfície das folhas as leveduras são capazes de explorar os nutrientes de exudatos naturais e os exudatos originados de lesões ou de senescência de partes das plantas (CARVALHO, 2007; GARCIA, 2007; HAGLER et al., 1995; PHAFF e STARMER, 1987).

As leveduras, juntamente com os fungos filamentosos, constituem o maior grupo da microbiota do filoplano (LANDELL, 2009; ANDREWS e HARRIS, 2000). McCORMACK, WILDMAN e JEFFRIES (1994) afirmam que, em termos de biomassa, leveduras e leveduras similares a fungos superam os outros organismos em uma taxa de 50 para 1.

Na superfície de plantas saudáveis, nas folhas e nos frutos imaturos em geral são prevalentes leveduras não fermentativas que são parcialmente disseminadas por correntes de ar. Essas comunidades são dominadas por basidiomicetos e seus anamorfos, especialmente espécies de *Cryptococcus* (especialmente *C. laurentii* e *C. albidus*) e gêneros relacionados. Também são abundantes diversas espécies de *Rhodotorula* (*R. glutinis*, *R. mucilaginosa* e *R. minuta*) e outros gêneros produtores de pigmentos carotenóides (ex. *Sporobolomyces*) e leveduras pretas como o ascomiceto leveduriforme *Aureobasidium pullulans*.

As leveduras pertencentes aos gêneros *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus* e gêneros similares produzem pigmentos carotenóides que auxiliam na proteção contra luz solar. Essa característica favorece sua permanência no filoplano. Esses organismos também produzem cápsulas mucóides que protegem contra a rápida perda de água e também se ligam com maior facilidade a nutrientes orgânicos e inorgânicos (FONSECA e INÁCIO, 2006; LANDELL, 2009). KACHALKIN e

colaboradores (2008), baseados em uma ampla experiência com leveduras do filoplano, citam que esses são os gêneros predominantes independente da planta testada, podendo em alguns casos, alcançar 10^7 UFC por grama de folha. Espécies formadoras de balistrosporos também são importantes porém não são detectadas pelos métodos de plaqueamento tradicionalmente utilizados na maioria dos estudos (FONSECA E INÁCIO, 2006).

A distribuição espacial de leveduras na superfície das plantas ainda não está bem elucidada, porém, já foi descrita uma agregação de células microbianas em pontos específicos tais como os tricomas, estômatos e principalmente os vasos condutores. Os vasos condutores são um ponto óbvio para o crescimento microbiano, tendo em vista o maior aporte de nutrientes. Microrganismos endofíticos podem ter origem em comunidades epifíticas na filosfera, adentrando por esses pontos onde há uma maior concentração de organismos da filosfera (SILVA et al., 2006, GARCIA, 2007).

2. Microrganismos endofíticos

Microrganismos endofíticos são definidos como aqueles que residem, em alguma fase do seu ciclo de vida, dentro dos tecidos vegetais sem causar dano aparente a estes; ou também como aqueles que podem ser extraídos do interior da planta após a desinfecção de sua superfície (TIAN et al., 2004; LARRAN, MÓNACO e ALIPPI, 2001; GAO et al., 2005). As micorrizas também estão intimamente associadas aos seus hospedeiros e são consideradas por alguns autores como endofíticas. Porém, pelo fato de formarem estruturas externas (hifas) à raiz, estes microrganismos são estudados como um grupo separado (AZEVEDO et al., 2000; SAIKKONNEN et al., 1998).

Os primeiros relatos da presença de fungos e bactérias no interior de plantas ocorreram no século XIX. Possivelmente o primeiro pesquisador a publicar nessa área foi Fernbach, em 1888, que detectou a presença de células bacterianas no interior de tecidos de tomate, cenoura e beterraba. Em 1898 foi detectado um fungo endofítico em sementes de joio, *Lolium temulentum* L. Estas descobertas desencadearam uma série de estudos por vários pesquisadores da época sobre novos fungos, principalmente ascomicetos, vivendo no interior de gramíneas (SILVA et al., 2006).

Até a década de 70, os endofíticos eram considerados “neutros”, ou seja, não causavam benefícios nem danos as plantas. Posteriormente, esses microrganismos

foram alvos de outros estudos e atualmente pode se dizer que em muitos casos eles podem proteger seu hospedeiro contra predadores e patógenos (AZEVEDO et al., 2000) e aumentar a sua resistência a estresses ambientais (GAO et al., 2005). Essa relação simbiótica pode ter surgido simultaneamente com o aparecimento dos vegetais superiores do planeta, há centenas de milhões de anos (STROBEL, 2002). Evidências de microrganismos associados à tecidos vegetais fossilizados podem ser indícios de co-evolução (SILVA et al., 2006). Estudos paleobotânicos mostraram que as primeiras briófitas terrestres, há 400 milhões de anos (período Devoniano da era Paleozóica) já possuíam associações com microrganismos endofíticos (BRUNDRETT, 2002).

Diversos autores consideram que esses microrganismos, bem como aqueles que habitam o filoplano, são ubíquos em todo o reino Plantae (GAO et al., 2005; LARRAN, MÔNACO e ALIPPI, 2001) constituindo então uma grande fonte de biodiversidade ainda desconhecida (STROBEL, 2003).

Entre os microrganismos endofíticos, os fungos e bactérias que formam nódulos nas raízes das plantas às quais estão associados são extensamente estudados devido a sua importância na agricultura, particularmente pela participação das bactérias na fixação de nitrogênio pelas plantas. Por outro lado, os endofíticos das partes aéreas dos vegetais só recentemente têm despertado o interesse da comunidade científica, especialmente por seus potenciais na produção de metabólitos de interesse econômico, incluindo alguns que anteriormente haviam sido atribuídos às plantas hospedeiras (SOUZA et al., 2004).

Acredita-se que existam aproximadamente 300.000 espécies de plantas e que cada uma delas seja hospedeira de um ou mais microrganismos endofíticos. Apesar disso, poucas plantas têm sido estudadas quanto à sua população de endofíticos (STROBEL e DAISY, 2003). Além disso, a maioria dos dados disponíveis utilizou plantas de regiões temperadas; portanto, dados de plantas em regiões tropicais ainda são escassos. Porém, plantas de habitats tropicais são consideradas grandes reservatórios de microrganismos endofíticos e a conservação e a prospecção de uso da diversidade microbiana endofítica é diretamente dependente da conservação de ecossistemas tropicais (AZEVEDO et al., 2000).

Segundo a atual compreensão que se tem sobre este tema, sugere que as populações de endofíticos das regiões temperadas diferem grandemente daquelas de regiões tropicais (FRÖHLICH, HYDE e PETRINI, 2000) e indica a necessidade de mais estudos sobre fungos endofíticos de regiões tropicais. Como poucos trabalhos têm

sido feitos nessa área, suspeita-se que exista um grande número de novos gêneros de bactérias e fungos endofíticos a serem descritos (AZEVEDO et al., 2000; AZEREDO et al., 1998).

No Brasil, um grande projeto para caracterizar a biodiversidade de bactérias, fungos e actinomicetos endofíticos está sendo realizado pela EMBRAPA no Estado de São Paulo. Esse projeto é intitulado "Diversidade de Microrganismos Endofíticos e seu Potencial Biotecnológico". Seus principais objetivos são: 1) isolar microrganismos de plantas de importância agrícola como café, milho, soja, citros, *Brachiaria* (tipo de erva daninha) e mandioca e ecológica (*Dicksonia*, uma samambaia ornamental conhecida como "xaxim"); 2) caracterizar os metabólitos secundários (do tipo antibiótico) produzidos por estes. Os resultados parciais podem ser acompanhados na página na rede mundial de computadores Jornal do Endofítico (<http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/endofiticos/index1.html>). Neste projeto, até o momento, a presença de bactérias e fungos endofíticos foi verificada em todas as plantas testadas e a presença de leveduras apenas em plantas do gênero *Citrus*.

2.1. Instalação de microrganismos endofíticos nos hospedeiros

A origem, formas de penetração, colonização e transmissão de microrganismos endofíticos são questões muito discutidas pelos pesquisadores. Esses microrganismos podem ser provenientes de sementes, da rizosfera e do filoplano. A maioria dos microrganismos endofíticos produz uma "infecção" localizada nos tecidos vegetais. A penetração pode ocorrer através de aberturas naturais da planta, como os estômatos (ou estomas) e os hidatódios. Os estômatos (figura 1) são um conjunto de células que apresentam um orifício central que permite a troca de gases e transpiração do vegetal. Os hidatódios são aberturas semelhantes aos estômatos que são responsáveis pela eliminação de água. A penetração também pode ocorrer através de tricomas, apêndices vistos como "pêlos" ou "escamas" na superfície da folha, com função secretora ou não. Por serem estruturas frágeis, estes se rompem facilmente sob ligeira pressão, sendo sua base um sítio de penetração e multiplicação. A principal via de entrada dos endofíticos é através de feridas, danos na superfície das raízes devido a abrasão com o solo durante o processo de crescimento radicular ou na parte aérea devido a ação de chuvas, ventos e insetos (REIS e OLIVARES, 2006). SAKIYAMA et al. (2001) também mostra a

capacidade que algumas bactérias endofíticas possuem de penetrar nos tecidos vegetais através da produção de enzimas hidrolíticas como as celulases e as pectinases.

Os endofíticos são transmitidos verticalmente quando penetram através das sementes ou da zona radicular. Também podem ser transmitidos horizontalmente quando penetram através de estômatos ou diretamente na parede celular ou utilizando apressórios e haustórios. Em alguns casos já foram descritos endofíticos localizados em todas as partes de planta, como raízes, ramos, folhas, sementes, frutos, tubérculos e flores, colonizando os espaços intercelulares, vasos condutores ou mesmo apresentando colonização intracelular (SAIKKONEM et al, 2004; SILVA et al., 2006; GAI et al., 2009).

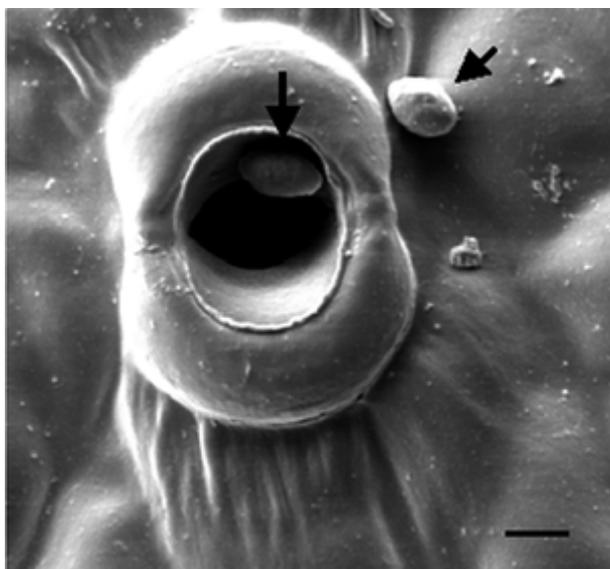


Figura 1: Levedura endofítica (*R. mucilaginosa*) em estômato de citrus (escala: 3 μ m) detectada por GAI e colaboradores (2009).

Após a penetração os endofíticos podem se estabelecer em tecidos específicos ou colonizar sistemicamente a planta hospedeira. A capacidade de colonizar o interior das plantas confere vantagens sobre outros microrganismos pois eles podem viver em condições ambientais (p. ex. temperatura, potencial osmótico, radiação ultra violeta) mais uniformes (SUZUKI, 2006).

A nutrição dos endofíticos dentro dos tecidos ainda é uma questão discutível. Alguns autores sugerem que os microrganismos endofíticos utilizam-se de exsudatos que extravasam para os espaços intercelulares. Em cana-de-açúcar, por exemplo, sabe-se que os espaços intercelulares contêm fluido rico em sacarose (12%), e que foram isoladas deste sítio culturas puras de uma bactéria endofítica. Embora seja um assunto de considerável importância, pouca atenção tem sido dada a este tema. Ainda é matéria

de especulação se fungos endofíticos invadem as células para retirar seus nutrientes (SILVA et al. 2006).

2.2 Benefícios que os endofíticos podem trazer para seus hospedeiros

As interações entre os endofíticos e as plantas ainda não são muito bem compreendidas, porém sabe-se que muitos endofíticos são capazes de produzir ou induzir a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens às plantas tais como: diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (SUSUKI, 2006).

Em alguns casos os fungos endofíticos podem ser utilizados para promover o crescimento de diversas plantas. *Piriformospora indica* influenciou positivamente o crescimento de plantas como milho (*Zea mays* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum*), salsa (*Petroselinum crispum* L.) e erva de São João (*Artemisia annua* L.) (VARMA et al., 1999). Esse mesmo fungo foi testado em cevada (*Hordeum vulgare* L.) e não só promoveu o crescimento da planta, como aumentou a tolerância ao stress salino e aumentou a resistência a patógenos como *Fusarium culmorum* e *Blumeria graminis* (WALLER et al., 2005). Além disso, já foi demonstrado que a presença de microrganismos endofíticos pode resultar em uma redução dos ataques de insetos em seus hospedeiros. Diversas toxinas são produzidas por fungos endofíticos, conferindo proteção contra diversos herbívoros (AZEVEDO et al., 2000).

SAMUELS e colaboradores (2006) destacam o potencial uso de fungos endofíticos no controle de fungos fitopatogênicos. Nesse trabalho, foi isolada uma nova espécie de *Trichoderma* (*T. theobromicola*) a partir de cascas de um cacaueteiro (*Theobroma cacao*) localizado as margens do Rio Marañon (Peru). Essa estirpe foi testada contra *Moniliophthora roreri*, agente causador da monilíase, uma das principais doenças que afetam o cacaueteiro na América Latina e foi possível observar até 100% de redução do fitopatógeno. Essa inibição está relacionada à produção do ácido nonanóico e de 6-pentil-alfa-pirona, compostos que inibem a germinação de esporos fúngicos.

Fungos endofíticos podem auxiliar o hospedeiro na adaptação a ambientes extremos. Uma simbiose entre a gramínea *Dichanthelium lanuginosum* e o fungo *Curvularia protuberata* permite que ambos os organismos estejam aptos a crescer nos

solos com elevadas temperaturas no Parque Nacional de Yellowstone (Wyoming, EUA). Experimentos de laboratório e de campo mostraram que, quando as raízes dessas plantas eram aquecidas a 65°C, as plantas em associação com fungo eram capazes de suportar o calor enquanto as plantas que não tinham associação com o fungo não sobreviviam. Essa associação se torna ainda mais interessante com a descoberta da associação do fungo com um vírus, nomeado vírus da “resistência térmica de *Curvularia*”, tendo em vista que é a associação com o fungo que confere esse fenótipo (MARQUEZ et al., 2007).

2.3. Isolamento de Microrganismos endofíticos

Bactérias e fungos endofíticos têm sido isolados de sementes, raízes, folhas e cascas de diversas plantas sadias (NASSAR e EL TARABILY, 2005). O isolamento destes organismos requer cuidados especiais para que sejam excluídos os microrganismos epifíticos, ou seja, aqueles que habitam a superfície do hospedeiro (AZEVEDO, 1998).

O tecido vegetal a ser estudado deve estar sadio, sem manchas ou qualquer tipo de lesão causada por patógenos, insetos, ou danos mecânicos. A parte aérea a ser coletada (folhas e ramos) não deve estar em contato com o solo. Após a coleta as amostras devem ser acondicionadas em bolsas plásticas a fim de reduzir a contaminação externa. O transporte deve ser realizado em câmaras de gelo e as amostras devem ser processadas e armazenadas em câmaras frias por, no máximo, 72 horas (ARAUJO et al., 2002).

A primeira etapa nesse processo é uma pré-lavagem da amostra, que reduz a carga microbiana da superfície do material e remove sujidades. Esse procedimento aumenta a eficácia da etapa de esterilização da superfície e pode ser realizado com água destilada ou salina estéreis com ou sem a adição de um detergente. Após a etapa de pré-lavagem é feita a esterilização da superfície da amostra (BACON e HINTON, 1997).

A desinfecção superficial consiste na mais importante etapa no trabalho com microrganismos endofíticos, pois, se houver falhas nesse procedimento, não será possível garantir que os microrganismos isolados vêm do interior do tecido vegetal. Normalmente, para eliminar os microrganismos epifíticos utilizam-se um ou dois tipos de agentes sanitizantes. O álcool (70 a 90%), em associação com o hipoclorito de sódio

(2 a 4%), é a forma mais comum de esterilização, porém outros agentes podem ser utilizados. Dentre outros, podem ser utilizados na etapa de esterilização da superfície dos tecidos vegetais: cloramina T (1%), cloreto de mercúrio (0,2%), peróxido de hidrogênio (20%), formaldeído (37-40%) (ARAUJO et al., 2002). Alguns autores utilizam tratamento térmico por flambagem (GYANESHWAR et al., 2001) e irradiação por luz UV. Os tempos e técnicas a serem utilizados podem variar de acordo com as características da planta a ser estudada.

Todos os resíduos de agentes sanitizantes devem ser removidos, rinsando a amostra sucessivas vezes com água destilada ou salina estéreis. Para verificar a eficácia do processo de desinfecção é necessário preparar um controle de esterilidade. Em alguns trabalhos, esses controles são feitos a partir de pequenas alíquotas da última água de lavagem inoculadas em meio de cultivo sólido. Em outros casos, a superfície de pequenos fragmentos estéreis é pressionada sobre meio de cultivo sólido (GÖTZ et al., 2006). SOUZA e colaboradores (2004) utilizaram 50 µL da última água de lavagem para inocular meio de cultivo sólido. Porém, em diversos trabalhos, o controle de esterilidade nem é mencionado (RADU e KQUEEN, 2002; NEJAD e JOHNSON, 2000; TAYLOR, HYDE e JONES, 1999; PEREIRA, VIEIRA e AZEVEDO, 1999). O uso de pequenas alíquotas para o preparo do controle de esterilidade pode induzir ao erro no isolamento de microrganismos endofíticos, pois se os epifíticos estiverem presentes em baixa frequência, podem escapar ao limite de detecção do método.

Após a desinfecção da superfície, o tecido estéril é então fragmentado em pedaços de aproximadamente 1 cm² e estes fragmentos de tecidos são transferidos para a superfície de meios de cultura sólidos (figura 2), em placas de Petri. Para o isolamento de bactérias podem ser utilizados diversos meios de cultivo tais como TSA (Tryptone Soya Agar), LB (Luria Bertani), PW (Periwinkle Wilt Agar), BCYE, Ágar Nutriente, Ágar Água (ARAUJO et al., 2002) . Também podem ser utilizados meios específicos para determinados grupos de microrganismos como o Meio King (para o isolamento de *Pseudomonas*), o Meio MMS (para o isolamento de bactérias metilotróficas) e os meios AACK (Agar Amido Caseína KNO₃) e Caseína Glicerol para o isolamento de actinomicetos. A temperatura de incubação deve estar entre 25 e 30°C e o tempo de incubação pode variar, mas normalmente fica em torno 24 a 72 horas (BACON e HINTON, 1997).

Para o isolamento de fungos endofíticos podem ser usados meios de cultura tais como Ágar Extrato de Malte (Difco), Ágar “Cornmeal” (Difco), Ágar Batata Dextrose,

Meio de Folhas, Meio Glicose-Extrato de Levedura-Pepton (YGP), Meio Sabouraud Maltose dentre outros (ARAUJO et al., 2002). É recomendável a adição de um ou mais antibióticos aos meios de cultura utilizados para inibir o crescimento de bactérias. A temperatura de incubação deve variar entre 24 e 28°C e as colônias fúngicas normalmente se desenvolvem dentro de 3 dias a 6 semanas, embora, para algumas espécies, o tempo necessário para crescimento pode ser de até 3 meses (BACON e HINTON, 1997).

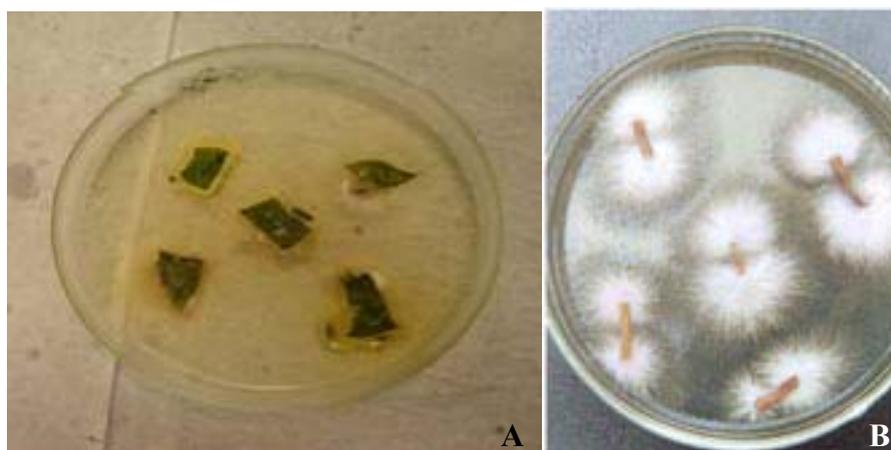


Figura 2: A) Placa de Petri contendo meio de cultura PCA, com fragmentos de folhas de erva baleeira (*Cordia verbenácea*), após incubação por 48 horas a 30° C (disponível em http://eduep.uepb.edu.br/biofar/n2v2/08-producao_de_antimicrobianos.htm, consultado em 21/05/2010). B) Aspecto de um fungo endofítico crescendo a partir de segmentos de ramos de café (disponível em <http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/endofiticos//resultados1/imagens/cafe2.jpg>, consultado em 21/05/2010)

2.4. Leveduras endofíticas

Poucos estudos foram visando ao isolamento de leveduras endofíticas, inclusive no Brasil. CAMATTI-SARTORI e colaboradores (2005) demonstraram a presença de leveduras como *Sporobolomyces roseus*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Rhodotorula mucilaginoso*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida* spp., *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus* spp. e *Pichia* spp. em amostras de folhas, flores e frutas de macieiras (*Malus domestica*, BORKH). LANDELL, MAUTONE e VALENTE (2006) isolaram *Rhodotorula glutinis* e *Debaryomyces hansenii* de amostras de *Vrisea procera* e *Cryptococcus albidus* e *Candida* spp. de amostras de *Tillandsia gardneri*, bromélias isoladas da Mata Atlântica (Parque Estadual de Itapuã/RS). Dados desse grupo de pesquisa mostram ainda a presença de uma espécie nova de endofítico, do gênero *Lalaria*, ainda não publicada (LANDELL, 2009).

Recentemente, GAI e colaboradores (2009) mostraram a presença de *Cryptococcus flavescens*, *Pichia guilliermondii* e *Rhodotorula mucilaginosa* colonizando o xilema e também os estômatos de plantas do gênero *Citrus*, coletadas no Estado de São Paulo. Leveduras endofíticas também foram detectadas nos espaços intercelulares e no interior das células em amostras de frutos do carvalho vermelho (*Quercus robur* L.) (ISAEVA et al., 2009).

Apesar da escassez de dados disponibilizados na literatura, esse campo de pesquisa pode ser promissor principalmente na detecção de espécies novas. Em 2002, ZHAO e colaboradores descreveram uma nova espécie de basidiomiceto endofítico, *Rhodotorula pinicola* isolada de pinho (*Pinus tabulaeformis*). Essa espécie foi isolada ao acaso em um trabalho anterior sobre diversidade de fungos endofíticos associadas ao pinho. SCHWEIGKOFER e PRILLINGER (1999) isolaram uma nova espécie do gênero *Sporobolomyces* a partir de amostras de caule de videira. Além desse microrganismo, nesse mesmo trabalho, foram detectadas estirpes de *Rhodotorula glutinis* e *Cryptococcus macerans*. ABDEL-MOTAAL e colaboradores (2009) descreveram quatro novas espécies de *Pseudozyma* (*P. japonica*, *P. henbania*, *P. egyptica*, *P. mutica*) a partir de amostras de *Hyoscyamus muticus* L. cultivadas em casa de vegetação no Japão.

Diversos trabalhos sobre isolamento de fungos endofíticos revelaram a presença de leveduras, principalmente leveduras filamentosas e leveduras pretas. Essas espécies podem estar sendo selecionadas pelo tipo de metodologia usada no isolamento de endofíticos. LARRAN, MONACO e ALIPPI (2001) isolaram estirpes dos gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula* a partir de folhas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) coletadas em Buenos Aires (Argentina). Em outro trabalho deste mesmo grupo de pesquisadores (LARRAN et al., 2002), foi feito isolamento de *R. mucilaginosa* e de estirpes de *Cryptococcus* sp. a partir de folhas de trigo (*Triticum aestivum* L.). Leveduras endofíticas não identificadas foram isoladas de amostras de folhas de arroz Qilisimiao (nome comercial) por TIAN e colaboradores (2004). MARIA e SRIDHAR (2003) fizeram o isolamento de fungos endofíticos de plantas halófitas em manguezais da Índia e mostraram que uma levedura (não identificada) era a espécie dominante em *Acrostichum aureum*.

A partir de folhas de bananeira (*Musa acuminata*), coletadas de três regiões no estado de São Paulo, foram isoladas quatro estirpes de leveduras não identificadas (PEREIRA, VIEIRA e AZEVEDO, 1999). Em 2002, CAO, YOU e ZHOU isolaram,

desta mesma planta, sete estirpes de *Aureobasidium* sp. no sul da China. Em 1999, TAYLOR, HYDE e JONES isolaram *Aureobasidium pululans* e outras estirpes de leveduras (não identificadas) de folhas de palma (*Trachycarpus fortunei*), utilizando amostras coletadas durante estação chuvosa na China, Suíça e Austrália. *Aureobasidium* sp. também foi isolado de folhas de rosa (*Rosa hybrida*) na Colômbia (SALAZAR e DE GARCIA, 2005).

CARUSO e colaboradores (2000) isolaram, a partir de amostras de caule e folhas de plantas do gênero *Taxus* (*T. baccata* e *T. brevifolia*) coletadas na Itália, duas estirpes do gênero *Aureobasidium* e duas estirpes de *Geotrichum*. Uma das estirpes de *Geotrichum*, isolada a partir de amostra de folha, foi capaz de produzir taxanas. As moléculas dessa classe são drogas comumente utilizadas para o tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo o de mama, ovário e pulmão (ANDRÉ e MEILLE, 2006).

Aureobasidium pullulans foi a espécie de endofítico prevalente em diversas espécies de cactos tais como *Opuntia* sp., *Cylindropuntia fulgida*, *Echinocereus fasciculatis*, *Cylindropuntia imbricata*. Essa espécie também pode ser isolada do interior de diversas outras seis espécies de cactos no Arizona (*Carnegiea gigantea*, *Cylindropuntia arbuscula*, *Cylindropuntia ramosissima*, *Cylindropuntia whipplei*, *Opuntia engelmannii*, *Cylindropuntia acanthocarpa*) (SURYANARAYANAN, WITTLINGER e FAETH, 2005).

LI e colaboradores (2008) estudaram a diversidade de fungos endofíticos em *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, uma tradicional erva medicinal chinesa. Foram detectados no interior de rizomas dessa planta 63 isolados de endofíticos, dentre eles a levedura *P. guilliermondii*.

SAITO (2006) isolou leveduras endofíticas em amostras de trigo (*Triticum* spp.), batata (*Solanum tuberosum*), soja (*Glycine max*) e beterraba (*Beta vulgaris*) coletadas em Hokkaido (Japão). A maioria (74.6%) das estirpes foi isolada de trigo e apenas uma foi isolada de beterraba. Quase todas as estirpes foram identificadas como *Candida parapsilosis*, mas também foi possível detectar *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus* sp. e *Rhodotorula mucilaginosa*.

Existem indícios de que leveduras endofíticas também possam atuar como “fertilizantes biológicos”, promovendo um estímulo ao crescimento de plantas. NASSAR e EL-TARABILY (2005) publicaram um estudo mostrando que a levedura endofítica *Williopsis saturnus* estimulou o crescimento de milho (*Zea mays* L.) em casas de vegetação. Esse fato está ligado à produção de auxinas como o ácido indol 3-acético

(IAA) e o ácido indol 3-pirúvico (IPYA). As auxinas são a principal classe de fitohormônios, moléculas fundamentais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. XIN, GLAWE e DOTY (2009) isolaram, a partir de amostras *Populus trichocarpa* coletadas no Estado de Washington, três estirpes identificadas como *R. graminis* e *R. glutinis*. Essas estirpes também foram capazes de produzir o IAA.

SACKS, ABBAS e MENGISTU (2006) isolaram *Candida ipomoeae*, uma espécie similar a *C. intermedia* a partir de amostras de óvulos de algodão (gênero *Gossypium*) de plantações no Mississipi. RODRÍGUEZ e colaboradores (2007) isolaram microrganismos endofíticos a partir de amostras de raiz de cenouras (*Daucus carota*). Uma estirpe de levedura foi selecionada pela sua habilidade de realizar reações de biocatálise de cetonas.

Possivelmente, poucos estudos foram visando leveduras endofíticas, pois a metodologia para isolamento é a mesma utilizada para o isolamento de fungos filamentosos. O método consiste em colocar um pequeno pedaço de folha previamente esterilizada na superfície de um meio de cultivo sólido (LARRAN, MÔNACO e ALIPPI, 2001; CAO, YOU e ZHOU, 2002; WIYAKRUTTA et al., 2004) possibilitando, com isso, a migração das hifas dos fungos filamentosos para o meio. Porém as leveduras não são organismos móveis e somente aquelas que estiverem nas bordas das amostras, ou forem capazes de produzir filamentos, entrarão em contato com o meio de cultivo. Além disso, uma vez que os fungos filamentosos crescem na placa, torna-se difícil recuperar leveduras da mesma. Por isso, o número de leveduras pode estar sendo subestimado. STONE, WHITE e POLISHOOK (2004) sugerem que a trituração do tecido, seguida de diluições seriadas poderia fornecer uma estimativa mais acurada das taxas de colonização de leveduras.

O laboratório de Biotecnologia Ambiental e de Leveduras começou a trabalhar com leveduras endofíticas em 1998 (AZEREDO et al., 1998). A partir de 2005, algumas adaptações na metodologia de isolamento foram testadas tais como o processamento em liquidificador das amostras de folhas estéreis e o uso de meios de enriquecimento (GARCIA, 2007). O uso desses meios foi uma estratégia valiosa para captação de espécies raras e/ou de crescimento lento. Isso porque essas não conseguem competir com o rápido crescimento de fungos filamentosos em meios de cultivo sólidos (CARVALHO, 2007).

Também foi preparado um controle de esterilidade muito mais sensível que consistiu na lavagem de toda a amostra previamente esterilizada com meio de cultura

líquido, seguida da incubação deste meio de cultura. Esta metodologia permite a detecção dos epifíticos presentes em baixas densidades populacionais.

Com essas alterações foi possível isolar, a partir de amostras da bromélia *Neoregelia cruenta*, 48 estirpes de leveduras endofíticas que foram classificadas em dez espécies de basidiomicetos (*Cryptococcus luteolus*, *C. laurentii*, *Cryptococcus* spp., *Fellomyces* sp., *Pseudozyma* sp., *Rhodotorula minuta*, *R. mucilaginosa*, *Rhodotorula* sp., *Tremella* sp., *Trichosporun ovoides*) e oito espécies de ascomicetos (*Candida famata*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondi*, *Candida robusta*, *Candida sake*, *Candida* sp., *Debaryomyces occidentalis* e *Kodamaea ohmeri*). Diversas espécies não puderam ser identificadas nesse trabalho, dando indício da presença de espécies novas de leveduras endofíticas associadas a amostras de bromélia. Também foi possível verificar que diversas espécies isoladas em tanque e filoplano de *N. cruenta* também foram isoladas do interior dos tecidos vegetais (GARCIA, 2007).

Além disso, esse trabalho mostrou que a comunidade de leveduras é diretamente influenciada por variações sazonais. No período chuvoso foi obtida maior riqueza de espécies, tanto para ascomicetos quanto para basidiomicetos. Já no período seco, a maioria das espécies isoladas foi de basidiomicetos.

2.5. Aproveitamento biotecnológico dos fungos endofíticos

Atualmente o interesse pelo estudo dos fungos endofíticos vêm aumentando pois estes representam uma ampla gama de aplicações biotecnológicas em potencial (LARRAN et al., 2002). Estes microrganismos são reconhecidos, por exemplo, como uma importante fonte de moléculas de interesse farmacológico (GAO et al., 2005). WIYAKRUTTA e colaboradores (2004) isolaram fungos endofíticos de plantas medicinais da Tailândia. Destas, 360 foram testadas quanto a seu potencial antimicrobiano, anti-viral e anti-células cancerígenas. Resultados promissores foram obtidos quando testadas frente a Herpes simplex vírus do tipo 1 (HSV-1) em culturas de células Vero (31% dos isolados possuíam atividade anti-HSV-1), *Mycobacterium tuberculosis* (26%), *Plasmodium falciparum* (2%). Quando as estirpes foram testadas frente a linhagens de células cancerosas, 17% das estirpes demonstraram atividade anti-KB (linhagem de célula de carcinoma epidermóide oral humano) e 13% demonstraram atividade anti-BC-1 (linhagem de célula de câncer de mama). Um “screening”

semelhante foi realizado na Malásia e algumas estirpes também apresentaram atividade antimicrobiana e anti-tumoral (RADU e KQUEEN, 2002).

Um metabólito não peptídico (L-783,281) isolado do fungo endofítico *Pseudomassaria sp.* pode ser uma alternativa promissora ao tratamento do diabetes. Esse composto tem mecanismo de ação similar ao da insulina, porém não é destruído pelo trato digestivo, podendo ser administrado por via oral. Experimentos feitos com ratos mostraram que esse composto reduziu significativamente o nível de glicose no sangue (ZHANG et al., 1999). Esse estudo foi patrocinado pela empresa Merck, e em alguns anos, essa substância pode ser uma alternativa a insulina injetável.

Fungos endofíticos também podem ser uma nova fonte a ser explorada para a descoberta de novos compostos imunossupressores. *Fusarium subglutinans*, isolado de *Tripterygium wilfordii*, uma árvore que tradicionalmente é usada na medicina popular chinesa, foi capaz de produzir dois compostos imunossupressores (Subglutinol A e B) (LEE et al., 1995). Drogas anticancer também podem ser produzidas por esses microrganismos. A partir do floema da árvore *Taxomyces andreanae* foi isolado o fungo endofítico *Taxus brevifolia*, produtor de taxol e substâncias relacionadas (STIERLE, STROBEL e STIERLE, 1993). Essa substância está normalmente presente na casca de árvores de gênero *Taxus*, mas o custo dessa substância a torna inacessível a uma grande parte dos pacientes. Esse estudo encorajou diversos outros estudos sobre microrganismos produtores dessas moléculas (CARUSO et al., 2000; WANG et al., 2000) visto que fontes alternativas poderiam tornar o custo da produção mais viável.

Um exemplo de aplicação industrial em potencial dos microrganismos endofíticos é a detecção de enzimas de interesse. SUTO e colaboradores (2002) isolaram, de 14 plantas diferentes, 169 estirpes de fungos, 155 destas, produtores de xilanases. Isso mostra que o interior das plantas pode ser uma excelente fonte alternativa ao solo para o isolamento de microrganismos produtores de xilanases.

2.6. Produtos comerciais contendo microrganismos endofíticos

Uma parceria entre as empresas AGRICOM Research e Pennington Seed Inc e a University of Georgia levou a seleção de uma estirpe de fungo endofítico produtor de alcalóide (peramina) associado a gramíneas. Essa associação é muito benéfica para a agricultura pois reduz a incidência de pragas. Após investimentos das empresas

AGRICOM New Zeland LTDA e Wrightson Seeds LTDA foram lançados produtos utilizando *Beauveria bassiana*, um fungo entomopatogênico conhecido mundialmente no controle de inúmeras pragas de interesse agrícola. Este fungo tem sido disponibilizado comercialmente na forma de inseticida microbiano desde que foi possível a sua produção e formulação em larga escala, além de linhagens resistentes à exposição a Luz Ultra Violeta e extremos de temperatura e umidade. Atualmente, existem vários produtos comerciais com *B. bassiana*, incluindo Naturalis and Mycotrol. Em estudos em Iowa (EUA), após aplicações em plantações de milho de formulações granulares de esporos deste fungo, observa-se colonização interna, persistência durante o desenvolvimento da planta hospedeira e significativa redução de infecção pela broca do colmo (AGRICOM, 2004).

2. Produção de toxinas “killer”

A produção de toxinas “killer” por leveduras foi descrita pela primeira vez em 1963 por Makower e Bevan que observaram que certas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* poderiam eliminar estirpes sensíveis da mesma espécie (WALKER, MCLEOD e HODGSON, 1995). As leveduras com fenótipo “killer” (K+) produzem proteínas extracelulares conhecidas como proteínas ou toxinas “killer” que são letais a células microbianas sensíveis (IZGÜ, ALTINBAY e ACUN, 2006). Existem evidências que as leveduras com esse fenótipo podem secretar diferentes toxinas “killer” com atividades específicas em diferentes alvos nas células de levedura (BANERJEE e VERMA, 2000).

O fenótipo “killer” pode ser codificado por genes presentes em um vírus (família *Totiviridae*) de RNA de fita dupla que infecta as células de leveduras como *S. cerevisiae*. Esses genes também podem estar presentes em DNA plasmidial como é o caso de *Kluyveromyces lactis* e *Pichia acaciae* ou em DNA cromossômico em *Williopsis californica* e *Pichia farinosa*. Com exceção da toxina secretada por *Zygosaccharomyces bailii*, o fenótipo de produção de uma toxina “killer” sempre vem acompanhado da imunidade a esta toxina (SCHMITT e BREINIG, 2006).

Dentre as leveduras selvagens, isoladas dos mais diversos habitats, estima-se que 5-30% das estirpes possam eliminar a espécie padrão sensível, *Candida glabrata*. A produção dessas toxinas confere uma grande vantagem competitiva em relação às

estirpes sensíveis (ZAGORC et al., 2001; CZÁRÁN e HOEKSTRA, 2003). Esse fenômeno de amensalismo previne acesso das leveduras sensíveis aos nutrientes e resulta em redução ou exclusão das populações de leveduras menos competitivas (VITAL et al., 2002).

As toxinas “killer” matam as células sensíveis por diferentes mecanismos. Elas hidrolizam ou inibem a síntese dos principais componentes das paredes celulares (β -1,3 glucanas) ou causam extravasamento de íons através de canais iônicos formados na membrana citoplasmática. Em alguns casos, a toxina bloqueia a síntese de DNA ou interrompe o ciclo celular na fase G1 da mitose (IZGÜ, ALTINBAY e ACUN, 2006).

Diversos gêneros de leveduras possuem espécies com fenótipo “killer” como *Bullera* (*B. sinensis*), *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*), *Candida* (*C. glabrata*, *C. krusei*), *Hanseniaspora* (*H. uvarum*), *Pichia* (*P. acaciae*, *P. farinosa*, *P. fermentans*, *P. inositovora*, *P. kluyveri*, *P. membranifaciens*), *Wickerhamomyces* (*W. anomala*), *Ustilago* (*U. maydis*), *Cryptococcus* (*C. humicola*), *Metschnikowia*, *Williopsis* (*W. saturnus*), *Lindnera* (*L. mrakii*) *Debaryomyces* (*D. occidentalis*, *D. hansenii*), *Tilletiopsis* (*T. albescens*), *Kluyveromyces* (*K. fragilis*, *K. lactis*, *K. waltii*) e *Zygosaccharomyces* (*Z. bailii*) (WALKER, MCLEOD e HODGSON, 1995; MARQUINA, SANTOS e PEINADO, 2002). Esses microrganismos vêm sendo isolados dos mais diversos habitats tais como lagos, rios, frutas, solos e vegetais (ZAGORC et al., 2001).

As “leveduras killer” e suas toxinas possuem potencial para diversas aplicações. Elas podem ser utilizados, por exemplo, como sistemas modelo para estudar os mecanismos de processamento de polipetídeos, secreção e interação de toxinas com células sensíveis. Além disso, a produção de toxinas “killer” pode ser um modelo para o estudo de controle e expressão de vírus em eucariotos (MARQUINA, SANTOS e PEINADO, 2002).

Em processos de fermentação industrial, a utilização de leveduras “killer” como iniciadoras do processo pode ser bastante desejável. No processo de produção de vinho, muitas vezes é realizada uma seleção de estirpes que possuam as propriedades enológicas desejadas associadas ao fenótipo “killer”. Isso porque, nesse caso, o mosto da uva estará mais protegido da ação de contaminantes que possam alterar as propriedades organolépticas do vinho (ZAGORC et al., 2001).

Na medicina, as leveduras “killer” têm aplicações na tipagem de estirpes de patógenos como *Cryptococcus* spp. e *Candida albicans*. Também se sugere que as

toxinas possam ser utilizadas como novos agentes anti-fúngicos para o tratamento de micoses em humanos e animais (WALKER, MCLEOD e HODGSON, 1995). Por exemplo, FUENTEFRÍA e colaboradores (2006) verificaram que diversas amostras clínicas de *Cryptococcus neoformans* (vars. *neoformans*, *grubii* e *gattii*) foram inibidas por estirpes de “killer” de *Pichia ohmeri*. Essa aplicação pode ser especialmente importante no caso de patógenos emergentes como as leveduras *Candida glabrata*, *Issatchenkia orientalis* e *Pichia guilliermondii* (BUZZINI et al., 2004). CAILLIEZ e colaboradores (1994) sugerem a utilização de uma toxina “killer” produzida por *Pichia anomala* no tratamento da pneumonia causada pelo fungo *Pneumocystis carinii*.

A habilidade “killer” dessas toxinas pode estar sendo subestimada ou pode ainda não ter sido descrita devido ao uso de uma ou poucas estirpes sensíveis selecionadas e outras condições experimentais. Por exemplo, a adição de cloreto de sódio potencializa o fenótipo “killer” em algumas estirpes, mostrando que algumas consideradas resistentes eram sensíveis a toxina (MARQUINA, SANTOS e PEINADO, 2002).

Pesquisas visando incremento na produção do fator “killer”, aliado a caracterização molecular abrem perspectivas para o desenvolvimento desse novo elemento no controle biológico. Além disso, a constatação da letalidade do fator “killer” em determinadas linhagens de leveduras perante fungos filamentosos ampliou ainda mais o potencial de aplicação, também sob controle de fitopatógenos e fungos deteriorantes de alimentos (COELHO, HOFFMANN e HIROOKA, 2003).

3. Produção de enzimas queratinolíticas

Queratinas são polipeptídios formados por unidades de aminoácidos, com massa molar média da ordem de $10.000 \text{ g mol}^{-1}$, apresentando resíduos de cisteína na proporção de 7 a 20% do número total de resíduos de aminoácidos. Pertencem à classe de proteínas fibrosas, com formação de pontes dissulfeto inter ou intramolecular, resultando em um material com características de conformação rígida e tenaz (MOORE et al., 2006). Esta proteína é o principal componente da pele, pêlos, penas, unhas, cascos e escamas constituindo uma importante barreira mecânica, estrutural e térmica (CORRÊA, 2009).

A queratina não é degradada pelas proteases comuns tais como pepsina, tripsina e papaína (CAI, LOU e ZHENG, 2008). Esta proteína é degradada por enzimas

específicas, denominadas queratinases, que são capazes de hidrolisar as ligações peptídicas da queratina e são produzidas por diversos microrganismos e vegetais (SALES et al., 2008).

A literatura fornece inúmeros exemplos de isolamento de fungos filamentosos queratinolíticos tais como *Microsporum gypseum*, *Aspergillus flavus*, *Chrysosporium indicum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Penicillium funiculosum*, *Mucor hiemalis* (ABDEL-FATTAH, MOUBASHER, MAGHAZY, 1982). Porém, são mais escassas as referências a leveduras com essa atividade e, em sua maioria, essas referências dizem respeito a espécies relacionadas a enfermidades isoladas de material clínico. HATTORI e colaboradores (1984) detectaram a presença de uma queratinase em *Candida albicans*. DUARTE (2009) causou mutagênese em *C. parapsilosis* isolada de resíduos da indústria avícola, aumentando a capacidade desta estirpe em produzir queratinases.

As queratinases microbianas são empregadas nos mais diversos tipos de indústrias (CAI, LOU e ZHENG, 2008). Na indústria avícola as queratinases degradam a queratina proveniente de penas que são produzidas em larga escala e, de outra forma, seriam responsável por um grande dano ambiental (SALES et al., 2008). Com o auxílio dessas enzimas, o resíduo agroindustrial pode ser usado como fonte de aminoácidos para fabricação de ração animal. Na indústria farmacêutica as queratinases auxiliam no aumento na disponibilidade de medicamentos e até mesmo na degradação de príons. No ramo dos cosméticos, as queratinases podem ser utilizadas em métodos de mudanças estruturais nas fibras capilares (alisamento), em “peelings” e no tratamento da acne. Essas enzimas também são utilizadas na formulação de detergentes e na indústria de processamento de couro.

4. Produtos agrícolas escolhidos para este estudo

O Brasil tem na sua agricultura uma das bases mais potentes da economia, garantindo o fornecimento contínuo de cereais, oleaginosas, hortaliças, frutas e produtos derivados oriundos do processamento desses vegetais. Esse setor é umas das áreas onde o país vem investindo esforços para melhoria da competitividade no mercado internacional (COELHO, HOFFMANN e HIROOKA, 2003).

Uma possível saída ao uso excessivo de fungicidas é o controle biológico desses patógenos utilizando microrganismos endofíticos. Isso atende a demanda de consumidores, cada vez mais exigentes, quanto a oferta de produtos isentos de resíduos de agrotóxicos (COELHO, HOFFMANN e HIROOKA, 2003).

A escolha das plantas utilizadas nesse estudo deu-se majoritariamente pela importância econômica que esses produtos possuem para o Brasil. Além disso, foram selecionadas angiospermas de diferentes famílias. Foram selecionadas quatro monocotiledôneas e quatro dicotiledôneas. Essa diversidade filogenética pode ser um importante fator para o isolamento de uma maior diversidade de leveduras endofíticas.

Todas as amostras coletadas para este estudo foram de folhas. A figura 3 mostra um corte de uma folha vascularizada, com suas principais estruturas, onde as leveduras endofíticas podem estar localizadas.

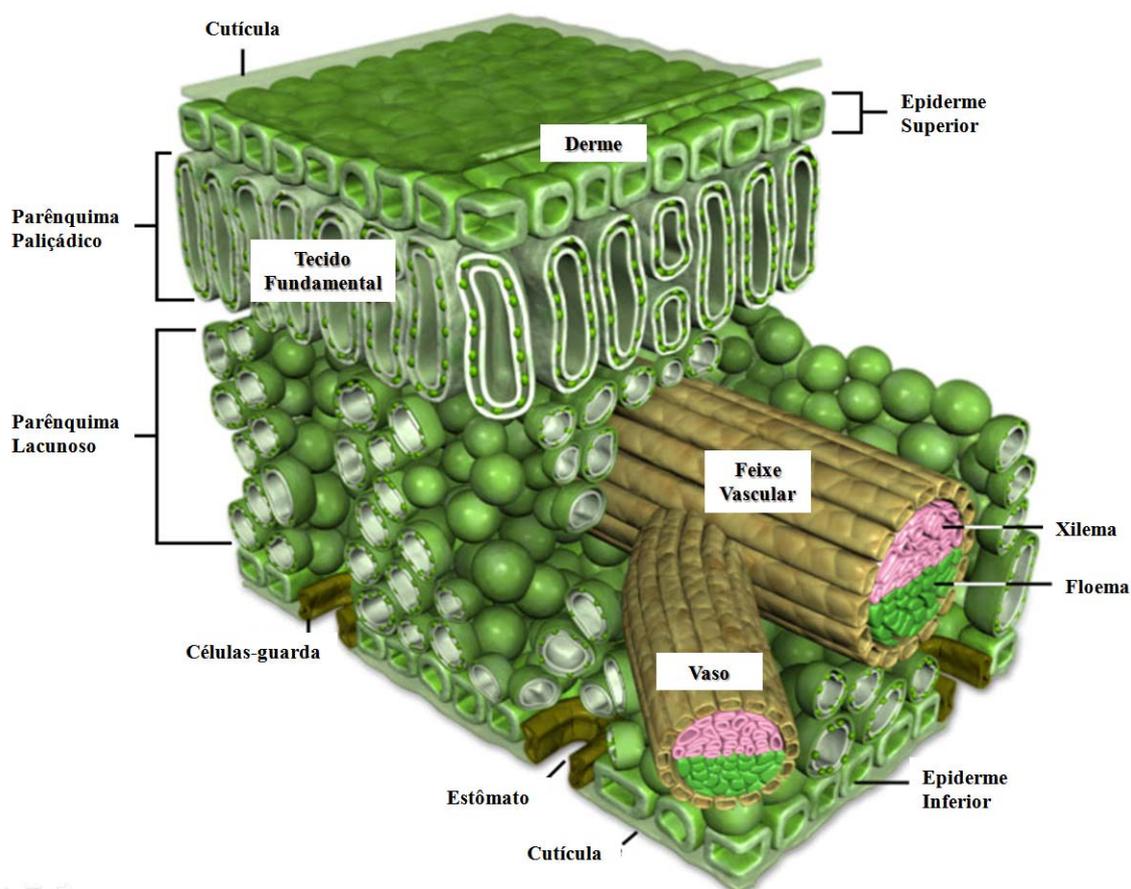


Figura 3: Representação anômica da folha (adaptada a partir da figura disponível em http://www.molecularexpressions.com/cells/leaf_tissue/leaf_tissue_large.html, consultada em 15 de julho de 2010).

4.1 Alface

A família Asteraceae é o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies. São dicotiledôneas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores. Cerca de 98% dos gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte, e são encontradas em todos os tipos de habitats, mas principalmente nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul (VERDI, BRIGHENTE E PIZZOLATTI, 2005). As folhas são muito variadas, inteiras ou fendidas, de disposição alterna ou oposta, podendo ser latescentes ou não (JOLY, 1979).

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertence à família das Asteraceae e é uma planta herbácea, muito delicada, com caule diminuto, não ramificado, ao qual se prendem as folhas em forma de roseta. Hortalíça típica de saladas, considerada como uma planta de propriedades tranqüilizantes e que, sendo consumida crua, conserva todas as suas propriedades nutritivas (ANDRADE Jr e KLAR, 1997). Apresenta elevados teores de vitaminas e de sais minerais, indispensáveis na dieta alimentar, além de possuir baixo teor de calorias, aconselhável nas dietas por ser de fácil digestão (YURI et al., 2002). Além disso, a alface é uma espécie hortícola muito atrativa para os horticultores, tendo em vista que possui ciclo de vida curto e alta produtividade, podendo ser cultivada o ano todo (TEIXEIRA-YÃNEZ, 2005).

No Brasil, a alface é a hortalíça folhosa de maior aceitação pelo consumidor. De acordo com o último censo agropecuário realizado pelo IBGE (1996) a produção nacional é de 260.000 toneladas por ano, sendo a região Sudeste responsável por 70% dessa produção (YURI et al., 2002; SALA e COSTA, 2005).

4.2 Mandioca

A família Euphorbiaceae, uma das maiores das dicotiledôneas, compreende cerca de 317 gêneros e 8000 espécies, distribuídas em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais (SANTOS, MACHADO e LOPES, 2005; JOLY, 1979). São plantas de hábito bastante variado, desde ervas, subarbustos, árvores, até trepadeiras. Muitas espécies da família Euphorbiaceae são tóxicas e vêm causando muitos casos de intoxicações em humanos em várias partes do mundo, inclusive no Brasil (OLIVERIA,

GIMENEZ e GODOY, 2007). A mandioca é uma planta da família Euphorbiaceae, gênero *Manihot* (SUZUKI, 2006). As folhas da mandioca apresentam uma delgada cutícula e as células do tecido lacunoso se dispõem em quatro camadas horizontais. As duas epidermes foliares apresentam estômatos (VANNUCCI, 1982).

Com uma produção anual acima de 170 milhões de toneladas, a mandioca constitui uma das principais explorações agrícolas do mundo. Entre as tuberosas, perde apenas para a batata. Nos países tropicais, essa importância aumenta. O Brasil é o maior produtor do continente e ocupa a segunda posição na produção mundial de mandioca (12,7% do total). Cultivada em todas as regiões, tem papel importante na alimentação humana e animal, como matéria-prima para inúmeros produtos industriais e na geração de emprego e de renda. Estima-se que na fase de produção primária e no processamento de farinha e fécula sejam gerados um milhão de empregos diretos e que a atividade mandioqueira proporcione receita bruta anual equivalente a 2,5 bilhões de dólares e uma contribuição tributária de 150 milhões de dólares; a produção que é transformada em farinha e fécula gera, respectivamente, receitas equivalentes a 600 milhões e 150 milhões de dólares (CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL, 2008).

4.3 Café

A família Rubiaceae é a quarta maior família das angiospermas, com cerca de 550 gêneros e 9.000 espécies de ampla distribuição, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (PEREIRA, MEIRA e AZEVEDO, 2003). São plantas de hábito muito variado, desde ervas, arbustos, subarbustos, árvores até trepadeiras, com folhas opostas ou verticalizadas (JOLY, 1979). O café é um arbusto da família das Rubiaceas, dicotiledônea, gênero *Coffea*, do qual há várias espécies e variedades. Do ponto de vista econômico, as espécies mais importantes são a *Coffea arabica*, vinda do planalto da Etiópia e a *Coffea robusta*, vinda da floresta equatorial da África. Da *C. arabica* vem as principais variedades cultivadas na América Central e do Sul (ZANOTTI e SOUZA NETO, 2005).

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA a, 2006) o Brasil é o segundo maior consumidor de café do mundo. Além disso, detém a liderança absoluta em pesquisas cafeeiras, o que lhe assegura maior competitividade no

mercado e elevada sustentabilidade nesse agronegócio. Com tantos títulos, o café é um dos mais importantes produtos brasileiros comercializados nos mercados nacional e internacional. Segundo o IBGE, em 2004, a produção nacional ocupou 2.398.598 ha de área cultivada gerando 2.465.710 toneladas de grãos. O potencial competitivo do país, no entanto, poderá crescer ainda mais com a redução dos custos de produção através do aumento da produtividade (GUZZO et al., 2001).

4.4 Limão

A família Rutaceae compreende cerca de 150 gêneros e 1500 espécies de tamanhos variados, amplamente distribuídas nas regiões tropicais e temperadas do globo terrestre, sendo mais abundantes na América tropical, sul da África, Ásia e Austrália. No Brasil são descritas cerca de 160 espécies. São plantas subarborescentes ou arbóreas, de folhas compostas, providas de glândulas oleíferas (JOLY, 1979). Essa família apresenta uma produção diversa de metabólitos secundários tais como os alcalóides, cumarinas, lignanas, flavonóides, terpenóides e limonóides (AMBROZIN, 2004) e seus óleos essenciais possuem atividade antimicrobiana (VIUDA MARTOS et al., 2008).

As plantas cítricas são dicotiledôneas pertencentes ao gênero *Citrus*, família Rutaceae, no qual limão siciliano, também denominado limão verdadeiro é classificado em nível de espécie como *Citrus lemon* (Linn). Normalmente o destino dos limões verdadeiros é o consumo in natura, indústria do suco concentrado e obtenção de óleos essenciais (HENRIQUE e CEREDA, 2007).

Limoeiro floresce várias vezes ao ano e está característica lhe assegura uma grande produtividade. No Brasil, São Paulo é o maior produtor de limão, seguido pelo Rio de Janeiro e pelo Rio Grande do Sul (DA REPORT, 2003).

4.5 Abacaxi

A família Bromeliaceae possui cerca de 54 gêneros e 2700 espécies distribuídas em três subfamílias bem definidas: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae. É uma família que possui representantes predominantemente neotropicais, exceto por *Pitcairnia feliciana* do oeste africano (PROENÇA e SAJO, 2004; LEME e MARIGO,

1993). Essa família é abundante em ambientes de Mata Atlântica, sendo que 22% dos gêneros descritos para essa família são restritos ao território brasileiro (LANDELL, 2009). Originário do Brasil, o abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merril) é uma planta de clima tropical, monocotiledônea, herbácea e perene da família Bromeliaceae.

No que se refere à anatomia foliar de *Ananas comosus*, em condições de campo, são descritas estruturas anatômicas características das bromeliáceas, tais como: presença de ceras, tricomas, epiderme uniestratificada revestida por cutícula, com diâmetro maior perpendicular ao eixo da folha e presença de hipoderme. Na face abaxial da epiderme, os estômatos encontram-se dispostos longitudinalmente em sulcos pequenos e paralelos. O mesofilo apresenta tecido aquífero logo abaixo da face adaxial da epiderme, parênquima clorofilado ou não, onde estão os feixes vasculares, cordões de fibras isolados e canais de aeração (BARBOZA et al., 2006).

O abacaxi é utilizado tanto para o consumo “in natura” quanto na industrialização, em diferentes formas: pedaços em calda, suco, pedaços cristalizados, geléias, licor, vinho, vinagre e aguardente. Como subproduto desse processo industrial pode-se obter ainda: álcool, ácidos cítrico, málico e ascórbico; rações para animais e a bromelina. A bromelina é uma substância de alto valor medicinal, trata-se de uma enzima muito utilizada como digestivo e anti-inflamatório. Na culinária, o suco de abacaxi é utilizado para o amaciamento de carnes. Além disso, os frutos do abacaxi são ótimas fontes de cálcio, vitaminas A, B e C (EMBRAPA b, 2006). O Brasil é um dos três maiores produtores mundiais de abacaxi, sendo o maior produtor na América do Sul. Entre os principais estados produtores estão Minas Gerais, Pará e Paraíba (VELOSO et al., 2001).

4.6 Milho

Poaceae é a quarta maior família entre as angiospermas, monocotiledôneas, compreendendo aproximadamente 11.000 espécies, distribuídas em 800 gêneros. Pertencem a essa família, as plantas mais importantes de para a produção de alimentos para a humanidade tais como o trigo, o arroz e o milho (SCHMIDT, 2008). A maioria das plantas incluídas nessa família é composta de herbáceas, anuais ou perenes, fazendo exceção os conhecidos bambus, que são de grande porte e lenhosos. Os representantes desta família estão espalhados por todo o mundo, ocupando vastas extensões em todos os continentes (JOLY, 1979).

Quanto à anatomia foliar, as células epidérmicas são alongadas longitudinalmente, apresentando grande quantidade de invaginações que ligam uma célula a outra congerindo um arranjo compacto e justaposto, sem espaços intracelulares. Além disso, a epiderme do milho é constituída por numerosos apêndices epidérmicos, tais como tricomas, células buliformes e estômatos. As células buliformes, também conhecidas como células motoras, estão intimamente envolvidas com o processo de diminuição da exposição das folhas à radiação solar mediante a promoção da curvatura da folha para cima, formando uma espiral (BALDO, 2007).

De acordo com o Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS, 2006), o milho (*Zea mays* L.) é, provavelmente, a planta comercial mais importante com origem nas Américas. Dados do IBGE mostram que, em 2004, o cultivo de milho no Brasil ocupou uma área de 12.864.838 ha gerando 41.787.588 toneladas de grãos.

A importância econômica do milho é evidenciada pelas diversas formas de sua utilização, que vai desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. Na realidade, o uso do milho em grão como alimentação animal representa a maior parte do consumo desse cereal, isto é, cerca de 70% no mundo. Nos Estados Unidos, cerca de 50% é destinado a esse fim, enquanto que no Brasil varia de 60 a 80%, dependendo da fonte da estimativa e de ano para ano. Apesar de não ter uma participação muito grande no uso de milho em grão, a alimentação humana, com derivados de milho, constitui fator importante de uso desse cereal em regiões com baixa renda (CNPMS, 2006).

4.7 Arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma monocotiledônea pertence a família Poaceae. Estudo da anatomia foliar de arroz selvagem (*Oryza glumaepatula*) mostra características comuns aos membros desse gênero, tais como a presença de cera epicuticular na face adaxial, estômatos e tricomas.

O arroz é um dos cereais mais cultivados e consumidos em todo o mundo (GALERA, 2006). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a área plantada com esse cereal no Brasil é de 2,89 milhões de hectares e a previsão para a safra 2009/2010 é de mais de 12 milhões toneladas (http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/1graos_09.10.pdf). Os principais estados produtores são o Rio Grande do Sul e o Mato Grosso (GALERA, 2006).

4.8 Cana de Açúcar

A cana de açúcar pertence à família Poaceae, gênero *Saccharum* L. que apresenta as seguintes espécies: *S. officinarum* L., *S. spontaneum* L., *S. sinensis* Roxb. e *S. barben* Jew, *S. robustum* Jew. e *S. edule* Hask. As variedades atuais de cana-de-açúcar são originadas de espécies e híbridos do gênero *Saccharum* L. (ALMEIDA, ROCHELLE e CROCOMO, 1995).

Quanto à anatomia foliar, é possível verificar a presença de estômatos e tricomas nas faces adaxial e abaxial. Os tricomas, na faixa adaxial, estão distribuídos em fileiras, alternados com fileiras de estômatos e faixas de células buliformes. Na faixa abaxial os tricomas estão presentes em maior quantidade. A presença de ceras ocorre em ambas as faces sendo que esta se apresenta na forma de grânulos muito pequenos (FERREIRA et al., 2005).

Historicamente a cana de açúcar é um dos principais produtos agrícolas do Brasil, sendo cultivada desde a época da colonização. Do seu processo de industrialização obtêm-se como produtos o açúcar nas suas mais variadas formas e tipos, o álcool (anidro e hidratado), a aguardante, o vinhoto e o bagaço. Devido à grandeza dos números do setor sucroalcooleiro no Brasil, não se pode tratar a cana-de-açúcar, apenas como mais um produto, mas sim como o principal tipo de biomassa energética, base para todo o agronegócio sucroalcooleiro, representado por 350 indústrias de açúcar e álcool e 1.000.000 empregos diretos e indiretos em todo o Brasil (INSTITUTO DE ELETROTÉCNICA E ENERGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2009).

De acordo com dados fornecidos pela União da Indústria de Cana de Açúcar (UNICA) o Brasil produziu 493.384.552 toneladas na safra 2007/2008, sendo as regiões Sul e Sudeste as principais produtoras (431.184.748 toneladas). O Estado de São Paulo é o responsável por mais de cinquenta por cento da produção (296.313.957 toneladas). Como houve uma expansão na área de plantio, a safra 2008/2009 foi recorde.

CONTEXTO E MOTIVAÇÃO

O Brasil possui uma grande variedade de ecossistemas, detendo aproximadamente 20% da biodiversidade mundial e grande parte da biodiversidade microbiana dos habitats brasileiros permanece por ser descoberta (SOUZA et al., 2004). Em primeiro lugar porque muitos destes habitats ainda não foram estudados, mas também devido a limitações da metodologia empregada nos estudos já realizados.

Acredita-se que existam aproximadamente 300.000 espécies de plantas e que cada uma delas seja hospedeira de um ou mais microrganismos endofíticos. Apesar disso, poucas plantas têm sido estudadas quanto a sua população de endofíticos (STROBEL e DAISY, 2003). Além disso, a maioria dos dados disponíveis utilizou plantas de regiões temperadas; dados de plantas em regiões tropicais ainda são escassos.

Diversos estudos já detectaram uma enorme diversidade de fungos filamentosos endofíticos, bem como uma ampla gama de aplicações desses microrganismos (VERMA, KHARWAR, STROBEL, 2009). Porém pouco tem sido realizado para detectar leveduras endofíticas bem como para caracterizar o seu possível papel em relação às plantas hospedeiras. Embora leveduras sejam fungos, esses microrganismos são imóveis e, em sua maioria, unicelulares. Essas características fazem com que os métodos para isolamento e identificação de fungos filamentosos sejam distintos dos métodos utilizados para leveduras.

As alterações na metodologia de isolamento de microrganismos endofíticos desenvolvidas em nosso laboratório foram testadas somente para uma espécie vegetal, a bromélia *Neoregelia cruenta*. Nossa proposta de trabalho foi testar a mesma metodologia com oito diferentes plantas, pertencentes a cinco famílias botânicas. Os produtos agrícolas escolhidos para este estudo são de extrema importância para a economia brasileira.

Além de caracterizar a comunidade de leveduras endofíticas associadas a estes cultivares, também desejávamos selecionar algumas estirpes com potencial biotecnológico. A literatura não descreve a presença de leveduras endofíticas com atividade “killer” bem como não há relatos de leveduras endofíticas produtoras de queratinases. Como nosso laboratório já possui experiência na detecção destas atividades, estas foram escolhidas para o presente estudo.

OBJETIVOS

1. Geral

❖ Caracterizar e comparar a diversidade de leveduras endofíticas associadas a folhas de diversas plantas de interesse comercial (alface, café, milho, abacaxi, limão, mandioca, arroz e cana de açúcar) e verificar a produção de toxinas “killer” e de proteases (queratinases).

2. Específicos

❖ Isolamento de leveduras endofíticas utilizando meios de enriquecimentos para isolar espécies que estejam presentes em populações menores.

❖ Utilização de meios seletivos para captar a maior diversidade de leveduras endofíticas usando um baixo número de amostras.

❖ Seleção de estirpes de leveduras endofíticas para avaliar potencial biotecnológico.

❖ Identificação das estirpes utilizando uma abordagem polifásica, ou seja, testes fenotípicos convencionais aliados ao seqüenciamento de rDNA.

❖ Detecção da produção de toxinas “killer” por leveduras endofíticas “in vitro”.

❖ Detecção da produção de queratinases por leveduras endofíticas.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Coleta das amostras

Durante os anos de 2007 e 2008 foram realizadas três coletas de amostras no SIPA da EMBRAPA Agrobiologia (“Fazendinha”), localizada no Km 47 da Antiga Rodovia Rio – São Paulo, Seropédica, Rio de Janeiro (22° 44’ 38”S, 43° 42’ 27”W).

O clima da região é o Aw de acordo com a classificação de Köppen-Geiger caracterizado por verão úmido e inverno seco. Os solos do local são, em sua maioria, de baixa fertilidade, formados pelas classes Planossolo e Argissolo (RIBEIRO, 2009).

A Fazendinha, uma área de 59 hectares, é uma espécie de laboratório vivo e é fruto de uma parceria entre a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, a Pesagro Rio e a Embrapa Solos. Neste local são realizadas pesquisas de campo em agroecologia, enfatizando a integração lavoura-pecuária (CNPAB – EMBRAPA, 2009). O sistema de produção de alimentos é orgânico e utiliza a técnica de “adubação verde” que consiste no plantio de espécies nativas ou introduzidas, cultivadas em rotação ou consórcio com culturas de interesse econômico. Por não aplicar fungicidas, favorece o crescimento de microrganismos endofíticos em relação ao sistema de plantio convencional (CAMATTI-SARTORI et al., 2005). Além disso, nessa área não há aplicação de fertilizantes químicos. A figura 4 mostra imagens do local de coleta e das amostras.

Foram coletadas quantidades iguais da seção mediana de folhas adultas saudáveis. Na primeira coleta (29 de janeiro 2007) foram coletadas três amostras de folhas de milho, café, limão, abacaxi, alface e mandioca, totalizando dezoito amostras. Na segunda coleta (15 de janeiro de 2008) foram coletadas seis amostras de milho e três amostras de abacaxi, alface, cana de açúcar e arroz. Na terceira coleta (10 de dezembro de 2008) foram coletadas 3 amostras de todos os produtos agrícolas coletados anteriormente, totalizando 24 amostras. Esta terceira coleta forneceu amostras para o teste de comparação entre a metodologia convencional e a metodologia de GARCIA (2007). Essas folhas foram transportadas sob refrigeração até o laboratório em sacos plásticos estéreis hermeticamente fechados. O processamento das amostras se deu em até 24 horas.

Na tabela 1 estão os dados sobre a temperatura (máxima e mínima) e sobre a umidade relativa média no local de coleta.



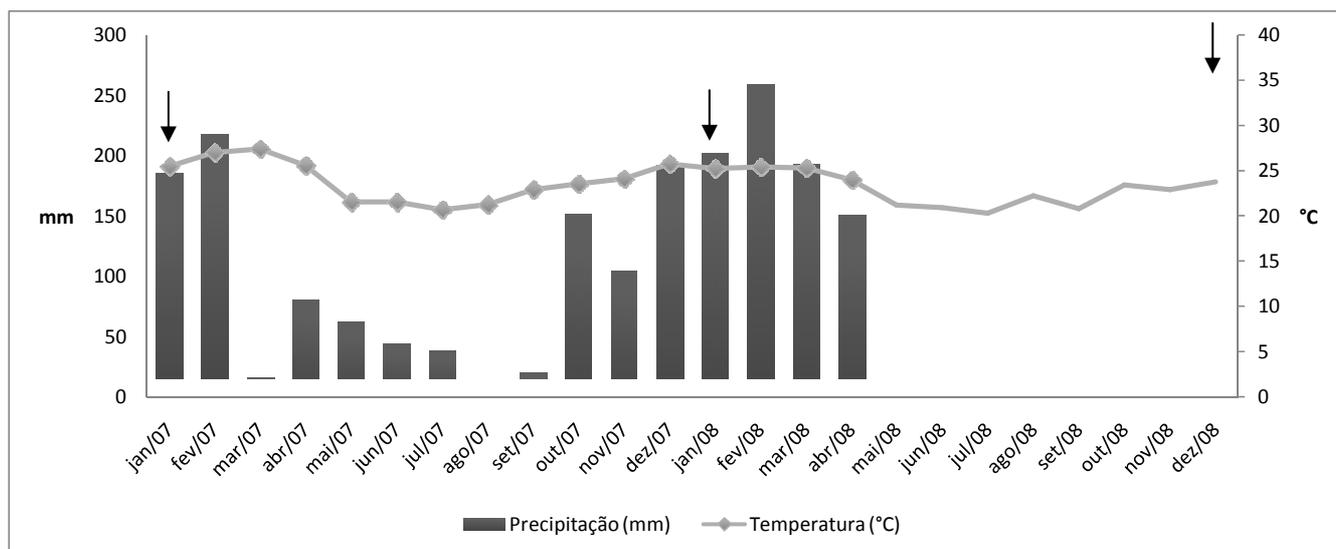
Figura 4: Imagens do local de coleta: cultivo de mandioca (1), alface e outras hortaliças (2), café (3) e abacaxi (4) no SIPA da EMBRAPA Agrobiologia. A imagem de satélite (5) da parte aérea do SIPA foi obtida na página de internet Google Maps.

Tabela 1: Dados referentes a temperatura e umidade relativa média obtidos no local de coleta.

Parâmetros climáticos	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Temperatura máxima	34°C	31°C	32°C
Temperatura mínima	21°C	20,2°C	18,3°C
Temperatura média	25°C	26°C	24°C
Umidade relativa média	72,34%	69,35%	70,15%

Dados meteorológicos da estação automática Ecologia Agrícola (código A160), localizada a aproximadamente 800 m da Fazendinha – Embrapa, foram obtidos no sítio do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), disponível em <http://www.inmet.gov.br>. Os dados apresentados na figura 5 mostram a temperatura média mensal e o total de precipitação mês a mês, para os anos de 2007 e 2008.

Figura 5: Dados de precipitação mensal total e da temperatura média estação meteorológica Ecologia Agrícola, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2008. As setas indicam os meses da coletas.



2. Composição dos meios de cultivo utilizados

- ↳ Agar Malte: (YARROW, 1998): Extrato de Malte (5%), ágar (2%).
- ↳ Agar YM (YARROW, 1998): extrato de levedura (0,3%), extrato de malte (0,3%), peptona (0,5%), glicose (1%), ágar (2%).

- ↳ Agar YGP (YARROW, 1998): glicose (2%), peptona (1%), extrato de levedura (0,5%), agar (2%). Para preparar o caldo YGP, o procedimento é o mesmo, exceto pela exclusão de ágar.
- ↳ BIL (base para isolamento de leveduras – CARVALHO, 2007): esse meio é baseado no meio MLA (HAGLER et al., 1986). Sua composição é extrato de levedura (0,1%), $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (0,1%), NaH_2PO_4 (0,2%), MgSO_4 (0,01%), KCl (0,04%), cloranfenicol (0,04%), amoxicilina (0,05%). Esse meio é um meio base ao qual pode ser adicionado de diferentes fontes de carbono, antibióticos e/ou inibidores. No presente trabalho foram utilizadas as variações descritas na tabela 2.
- ↳ GYMP (SCHRANK, 1982): glicose (2%), extrato de levedura (0,5%), extrato de malte (0,5%), NaH_2PO_4 (0,5%), ágar (2%), água.
- ↳ Meio de esgotamento (YARROW, 1998): Yeast Nitrogen Base 1 X (0,7%), glicose (0,1%), água destilada.
- ↳ PDA (HIMEDIA): PDA (3,9%), cloranfenicol (0,04%), amoxicilina (0,05%).
- ↳ Meio para detecção de microrganismos queratinolíticos: queratina (2%), agar (2%), extrato de levedura (0,01%).

Todos os meios descritos acima (exceto meio de esgotamento) foram esterilizados por calor úmido em autoclave (121°C/15 min). O meio de esgotamento foi esterilizado por calor úmido em autoclave (121°C/10 min).

3. Processamento das amostras e isolamento de leveduras endofíticas

3.1. Esterilização da superfície das amostras

Para isolar microrganismos endofíticos é necessária uma etapa de lavagem das amostras de tecido vegetal para retirada de poeira e outros artefatos eventualmente presentes. Após a exposição destas amostras aos agentes sanitizantes, para esterilizar a superfície das folhas e garantir que os microrganismos isolados venham do interior da amostra.

A lavagem das amostras (11g de cada) foi realizada pela imersão destas em 100mL de uma solução contendo salina estéril (NaCl 0,85%), Tween 80 (0,1%) e pirofosfato de sódio (0,1%). As amostras permaneceram nessa imersão por 15 min, sendo agitadas manualmente de tempos em tempos. Em seguida, as amostras foram imersas em álcool etílico 70% por 1 min, seguido de hipoclorito de sódio 2,5% por 3

min e novamente etanol 75% por 30 seg. Após essa etapa, foram feitas duas lavagens com salina estéril para retirar quaisquer resíduos de álcool etílico e hipoclorito de sódio (GARCIA, 2007).

3.2 Preparo do controle de esterilidade

Após a retirada dos agentes sanitizantes, as folhas sofreram uma lavagem adicional com 50 mL de meio de cultivo BIL com 0,5% de glicose, amoxicilina (0,05%) e cloranfenicol (0,04%). Esse meio de cultivo foi transferido para um Erlenmeyer (250 mL) estéril e incubado por duas semanas, a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Esse meio era checado diariamente quanto a sua turbidez, para detectar se havia crescimento de microrganismos da superfície da amostra. Além da observação também foram realizadas lâminas a fresco de alíquotas desse material, bem como semeadura em Ágar YGP.

Somente naquelas amostras em que houvesse ausência de microrganismos no controle de esterilidade, ou apenas a presença de bactérias/fungos filamentosos, as leveduras isoladas eram consideradas endofíticas.

3.3. Preparo do inóculo

Onze gramas de folhas estéreis e lavadas com BIL com 0,5% de glicose, foram transferidos para um copo de liquidificador estéril. As folhas foram novamente imersas em 100 mL desse meio de cultivo e então trituradas por alguns segundos para permitir a liberação dos endofíticos do interior do tecido vegetal. Esses 100 mL foram utilizados para inocular cada um dos meios de enriquecimento.

Os meios de enriquecimento utilizados foram preparados conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2: Meios de enriquecimento utilizados

Meio de enriquecimento	BIL adicionado de	Inóculo	Incubação
BIL (G)	glicose (0.5%)	Tubos de 25 mL contendo 9 mL de meio de cultivo e 1 mL do inóculo (aproximadamente 0.1g)	Temperatura ambiente, estático, durante 3 semanas
BIL (E)	glicose (5%) e etanol (6%)		
BIL (XL)	xilose (0,5%) e de lactose (0,5%)		
BIL (Y)	glicose 0.5% e extrato de levedura 0.5%		
BIL (XLO)	xilose (0,5%) e de lactose (0,5%)	Erlenmeyers de 25 mL contendo 9 mL de meio de cultivo e 1mL do inóculo	Temperatura ambiente, sob agitação (150 rpm), durante 3 dias
BIL (B)	glicose (0.5%)	Restante do inóculo - (aproximadamente 100 mL com 10g de folha) em Erlenmeyers de 250 mL	Temperatura ambiente, estático, durante 3 semanas

Todos os meios de enriquecimento foram plaqueados após três dias de incubação. Todos os meios de enriquecimento, exceto BIL (XLO), também foram plaqueados após uma, duas e quatro semanas de incubação (tempos 1, 2 e 4). Para tal plaqueamento foram utilizados Agar YGP e Agar BIL (XL), incubados em estufa à 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) por 3 a 5 dias.

3.4 Obtenção de culturas puras

As colônias obtidas em Ágar YGP e Ágar BIL (XL) foram sucessivamente esgotadas em placas de Agar YGP por três vezes consecutivas ou até a obtenção de culturas puras.

3.5 Código das estirpes isoladas

Para cada isolado foi atribuído um código que explica a origem da amostra, de qual meio de enriquecimento foi isolado, quantas semanas após a incubação no meio de enriquecimento ele foi isolado. Para exemplificar temos o isolado 1MI3E:

- ↳ O Número 1 indica o número de semanas de incubação após o qual aquela cultura foi isolada. O número pode ser um, dois ou quatro. Se não houver nenhum número a estirpe foi isolada no tempo 0, após 3 dias de incubação.
- ↳ MI indica que a estirpe foi isolada de amostras de milho. O código das outras plantas é: **AB** (abacaxi), **CA** (cana de açúcar), **C** (café), **AL** (alface), **AR** (arroz), **MA** (mandioca), **L** (limão).
- ↳ O número que vem logo após o tipo da amostra é o número da amostra. Nesse exemplo é amostra 3 de milho.
- ↳ A letra que vem depois do número da amostra é o meio de enriquecimento utilizado.

4. Utilização de metodologia convencional na detecção de leveduras endofíticas

Exemplares de todas as plantas coletadas na terceira coleta foram testadas utilizando a metodologia tradicional de isolamento de microrganismos endofíticos (AZEVEDO, 1998; ARAÚJO et al., 2002). Esses experimentos foram feitos para comparar o método utilizado nesse trabalho com o método padrão.

As amostras utilizadas tiveram sua superfície esterilizada de acordo com o item 3.1. As folhas foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 1cm² e esses fragmentos colocados sobre a superfície de meios de cultura sólidos, quatro fragmentos por placa. Três meios de cultivo foram utilizados: Agar BIL com glicose (0.5%), Agar YGP e PDA, todos acrescidos de cloranfenicol (0,04%) e amoxicilina (0,05%). Todas as amostras foram testadas em triplicata, em cada um dos meios de cultivo.

5. Estoque das estirpes

5.1 Em geladeira

As culturas isoladas foram mantidas em tubos (13x100 mm) contendo de 2,5 mL Agar GYMP inclinado. Para tal, as culturas puras foram inoculadas na superfície do meio inclinado e mantidas a 22°C±3°C por 48 h. Após obtenção de crescimento confluyente, as culturas foram cobertas com óleo mineral estéril (calor seco 170°C/60 min) em quantidade suficiente para cobrir toda superfície do meio de cultura. Estas

foram mantidas, em duplicata, em geladeira (8 - 16°C). Todas as estirpes isoladas foram armazenadas desta forma.

Algumas estirpes foram selecionadas e depositadas na coleção de culturas do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

5.2 Em freezer -60°C

Algumas estirpes foram selecionadas para ser armazenadas em freezer a -60°C. Para o congelamento, as culturas puras foram cultivadas em caldo GYMP por 48 h a temperatura ambiente. Uma alíquota de 1 mL desse caldo foi despejada em um criotubo contendo 0,15 mL de glicerol (agente crioprotetor). Após homogeneização os criotubos foram mantidos em “freezer” comum por 1 hora e posteriormente transferidos para “freezer” (Forma Scientific) a -60°C.

6. Caracterização morfológica

6.1 Observação da morfologia colonial

As culturas foram cultivadas em Ágar YGP por 5 - 7 dias a temperatura ambiente (25 ± 3°C). Após o crescimento, com o auxílio de um microscópio esterioscópico (Carl Zeiss/Jena, modelo: Technival 2), foram observados aspectos da morfologia colonial tais como a superfície, borda e a produção de pigmentos, com aumento de 20x a 40x.

6.2 Observação da morfologia celular utilizando microscopia óptica

As culturas foram cultivadas em Ágar YGP por 48 - 72 h a 22°C. Após o crescimento, foram preparadas lâminas a fresco. Uma gota de água destilada estéril foi transferida para a superfície de uma lâmina com uma alça de inoculação e, uma pequena porção de uma colônia isolada foi retirada da placa de Petri e espalhada na gota. O esfregaço foi coberto com uma lamínula e o material observado em microscópio óptico (Axioplan 2 em contraste interferencial diferencial de Nomarski) utilizando-se as objetivas de 40x e 100x. Tal procedimento permitiu a visualização da morfologia celular (células ovais, alongadas, fusiformes, redondas) e da reprodução assexuada (brotamento multipolar, unipolar ou bipolar). Outras características também foram

observadas tais como a formação de micélios e a presença de ascosporos em algumas estirpes.

7. Caracterização bioquímica

Os testes descritos nas seções 7.1 e 7.2 foram realizados de acordo com os métodos padrão descritos por YARROW (1998). O ágar utilizado para os testes de assimilação em meio sólido foi anteriormente lavado por decantação 3 vezes com água destilada para retirar traços de nutrientes (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1978). Depois da última lavagem o ágar foi ressuspensionado em um volume conhecido, geleificado por aquecimento e fracionado para cada um dos testes.

Como controles dos experimentos foram utilizadas linhagens autênticas pertencentes à coleção de culturas do IMPPG. Estas estirpes são *W. anomala* (IMUFRJ 50.407), *S. cerevisiae*^A (IMUFRJ 50.606) e *R. mucilaginosa*^A (IMUFRJ 51.707).

Para os testes de assimilação de fontes de carbono, a placa contendo glicose como fonte de carbono é um controle positivo, visto que todas as leveduras são capazes de utilizar esse açúcar. Também é feito um controle negativo, uma placa que não continha nenhuma fonte de carbono.

7.1 Assimilação de fontes de carbono

Para evitar a obtenção de resultados falsos positivos, todas as estirpes utilizadas nesses testes tiveram suas reservas de fontes de carbono esgotadas. Este procedimento foi realizado da seguinte maneira: após a obtenção de culturas puras em Agar YGP por 48 h, uma colônia foi transferida para tubos (13x100 mm) contendo o meio de esgotamento. Esse meio de cultura contém uma fonte de nitrogênio e vitaminas (YNB DIFCOTM) e glicose em concentração muito reduzida (0,1%), fazendo com que as leveduras tenham que utilizar seus carboidratos de reserva para se multiplicar. As leveduras foram cultivadas nesse meio por 5-7 dias e, após esse período, foram utilizadas como inóculo dos testes de assimilação de fontes de carbono (em placas e em tubos).

7.1.1 Assimilação de fontes de carbono em placas

Esses testes foram realizados utilizando meio contendo 1X de YNB DIFCO™, 2% de ágar lavado e 0,5% de uma das seguintes fontes de carbono (BARNETT et al., 1990; WICKERHAM, 1951): glicose (C1), galactose (C2), sorbose (C3), glucosamina (C4), ribose (C5), xilose (C6), L-arabinose (C7), D-arabinose (C8), ramnose (C9), maltose (C11), trealose (C12), α -metil-D-glucoside (C13), celobiose (C14), salicina (C15), arbutina (C16), melibiose (C17), lactose (C18), melezitose (C20), inulina (C21), amido (C22), glicerol (C23), eritritol (C24), ribitol (C25), xilitol (C26), D-glucitol (C28), D-manitol (C29), galactitol (C30), xilitol, mio-inositol (C31). O teste de assimilação de rafinose (C19) requer utilização de 1% dessa fonte de carbono.

A inoculação foi realizada utilizando a técnica de “replica-plate” que consiste na inoculação simultânea de 32 estirpes em placas com o auxílio de um multi-inoculador de aço inoxidável estéril (figura 6).

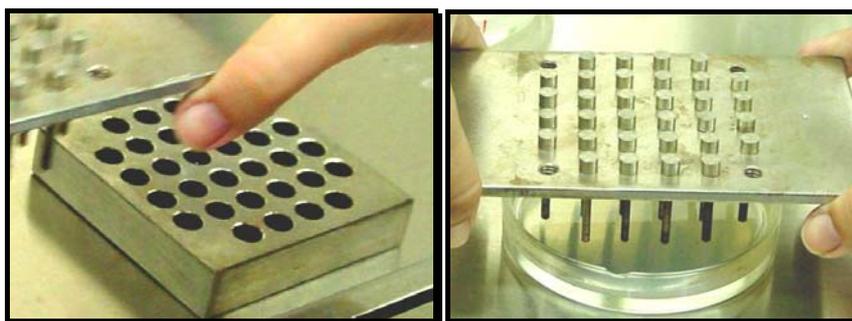


Figura 6: A) Base do multi-inoculador com 32 poços. B) carimbo do multinoculador com 32 pinos flutuantes



Figura 7: Aspecto da placa após o crescimento das colônias: à esquerda, o cultivo em glicose 0,5% e à direita o controle negativo, sem fonte de carbono.

As leituras foram realizadas após uma, duas e três semanas e os resultados foram atribuídos de acordo com a tabela 3.

Tabela 3: Leitura de resultados dos testes de assimilação

Resultado	Escala de Wickerham	Significado
0	0	ausência de crescimento (similar ao controle negativo)
0.5	1+	Crescimento fraco
1	2+ ou 3+	crescimento confluyente (2) ou crescimento forte, colônias grandes e densas (3)

Foram consideradas positivas as amostras nas quais for observado crescimento 2+ ou 3+ após a terceira leitura.

7.1.2. Assimilação de fontes de carbono em tubos (13 x 100mm)

- ↳ Lactato (C38), succinato (C39) e citrato (C40): DIFCO™ YNB 1X, fonte de carbono (0,5%) e a água destilada. A esterilização foi realizada em autoclave (121°C/10 min).
- ↳ Etanol (C42) e metanol (C41): somente o YNB DIFCO™ 1X (0,7%) e a água destilada foram esterilizados em autoclave (121°C/10 min), formando uma base para o meio de cultivo. Após a inoculação da estirpe, foi acrescentado 0,01 mL de etanol absoluto ou metanol e este procedimento foi repetido semanalmente até o final do experimento.
- ↳ Sacarose (C10): a base do meio de cultivo foi preparada conforme descrito acima e posteriormente foram acrescentados 0,25 mL de uma solução de sacarose (6%) esterilizada por filtração (em membrana Millipore esterilizante com poros de 0,22 µm de diâmetro).

Todos os tubos foram inoculados com 10 µL da estirpe cultivada em meio de esgotamento por 5 a 7 dias. As leituras foram realizadas com 1, 2 e 3 semanas. O grau de crescimento é acessado visualmente. Os tubos foram agitados em vórtex para homogeneizar as células de leveduras e colocados contra um cartão branco no qual foram desenhadas com tinta preta 3 linhas de 0.75 mm de espessura com 5 mm de distância entre elas.

Foram atribuídos: resultado 3+ quando as linhas foram completamente obscurecidas; 2+ quando as linhas apareceram como bandas difusas; +1 quando as linhas forem distinguíveis entre si e zero quando não for detectado nenhum crescimento (escala de Wickerham, figura 8). Os resultados 2+ e 3+ são considerados positivos e os demais são considerados negativos.

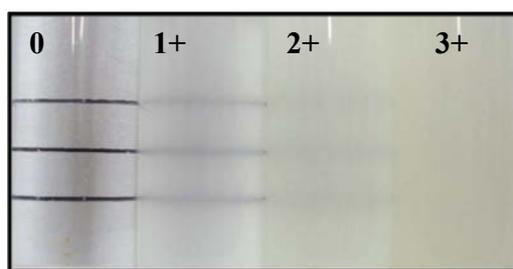


Figura 8: Escala de Wickerham. Os números indicam os valores atribuídos à leitura dos tubos. Os dados das tabelas de assimilação mostram a escala indicada na tabela 3

7.2 Utilização de nitrato como fonte de nitrogênio

Esse teste foi realizado utilizando tubos (13x100 mm) contendo 2,5 mL meio de cultivo composto por Difco™ Yeast Carbon Base 1X (1,17%), KNO_3 (0,078%) e água destilada (WICKERHAM, 1951). Esse meio foi esterilizado por autoclavação (121°C/10 min).

A inoculação de cada tubo foi realizada utilizando uma colônia de levedura crescida em ágar YGP por 72 h, a temperatura ambiente. Nesse caso, o próprio meio de cultivo é usado como meio de esgotamento, visto que se a estirpe não utilizar o nitrato como fonte de nitrogênio, estará utilizando suas reservas nutricionais nos primeiros dias de crescimento.

A levedura permaneceu nesse primeiro tubo por uma semana e, passado esse período, os tubos nos quais o resultado foi considerado positivo serviram de inóculo (10 μL) para um segundo tubo de meio de assimilação de nitrato. Esse segundo tubo é uma garantia de que não ocorreram resultados falso positivos.

As leituras do segundo tubo foram realizadas com uma, duas e três semanas. Os resultados foram medidos de acordo com a escala de Wickerham.

7.3 Fermentação de glicose

Esse teste foi realizado em tubos de ensaio (13 x 100 mm) contendo tubos de Durham invertidos. O meio de cultivo utilizado era composto de peptona (0,75%), glicose (2%), extrato de levedura (0,45%) e esterilizado por autoclavação (121°C/10 min) (WICKERHAM, 1951).

As leituras foram realizadas diariamente durante os sete dias posteriores à inoculação e posteriormente com 14 e 21 dias. Foram consideradas positivas aquelas amostras nas quais foi detectada a acumulação de gás no interior dos tubos de Durham. Quando o tubo de Durham está completamente cheio o resultado é considerado +3; se preencher até 2/3 terços do tubo o resultado é + 2; se preencher até 1/3 do tubo o resultado é +1; se não há nenhuma produção de gás o resultado é negativo (figura 9). Um outro fator a ser considerado no resultado é o número de dias que a levedura leva para fermentar a glicose .



Figura 9: Leitura de tubos de fermentação de glicose. De acordo com a escala de Wickerham o tubo 1 apresentou resultado +1; o tubo 2 é considerado negativo (0); os tubos 3 e 4 apresentam resultado positivo (+3).

7.4 Teste de Diazonium Blue B

No teste de DBB foi empregado o método descrito em HAGLER e AHEARN (1981). Para tal, uma colônia de levedura foi colocada em um tubo do tipo Eppendorf. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de KOH (0,05M). O tubo foi mantido em água fervente por 10 minutos e, em seguida, centrifugado. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1,5 mL de etanol, agitando manualmente a mistura. Em seguida o tubo foi novamente centrifugado por 1 min e então retirou-se o etanol. Foi adicionado sobre o “pellet” algumas gotas do reagente DBB (15 mg DBB diluído em 15 mL de tampão TRIS 0,1 M pH 7,0) em banho de gelo. As linhagens que apresentaram coloração vermelha/vinho foram consideradas positivas e relacionadas à classe dos Basidiomicetos; as demais, consideradas negativas e relacionadas à classe dos Ascomicetos.

7.5 Teste de tolerância a altas concentrações de cloreto de sódio

Esse teste é utilizado para avaliar a capacidade de crescimento da levedura frente a condições de pressão osmótica elevada. Para tal, foi utilizado o meio YGP contendo NaCl (10% e 15%) conforme descrito por HAGLER (1978). A inoculação foi feita pela técnica de “replica-plate” e as placas incubadas em estufa a $22\pm 3^{\circ}\text{C}$. As leituras realizadas após 1, 2 e 3 semanas. Foram consideradas positivas as amostras nas quais houve crescimento de colônias durante as três semanas de incubação.

7.6 Teste de tolerância a cicloheximida

A ciclohexamida é um antifúngico produzido por *Streptomyces griseus*. Algumas leveduras são extremamente sensíveis enquanto outras são completamente resistentes. Esses testes foram realizados utilizando um meio de cultivo contendo DIFCO™ YNB (0,7%), agar (2%), glicose (0,5%) e ciclohexamida nas concentrações de 0,1 e 0,01%.

A inoculação foi feita pela técnica de “replica-plate” e as placas incubadas em estufa a $22\pm 3^{\circ}\text{C}$. As amostras foram lidas durante 3 semanas e consideradas positivas quando foi possível detectar o crescimento de colônias após a terceira leitura.

7.7 Formação do amido

Para este teste foi utilizada a placa de assimilação de glicose após a terceira leitura (3 semanas após a inoculação). Para a detecção de leveduras formadoras desse polímero adicionou-se o corante lugol (iodo 0,3%, iodeto de potássio 1,5% e água destilada) a placa e após 24 horas o iodo foi retirado. As colônias com coloração azulada ou com um halo azul ao redor da colônia foram consideradas positivas (figura 10).



Figura 10: Leitura do teste de síntese de compostos amilóides após 24 horas. As colônias azuis são consideradas positivas.

7.8 Crescimento em diferentes temperaturas 37, 40 e 42°C

Antes da realização dos testes de crescimento em altas temperaturas, o banho maria (Julabo SW 20C) foi ajustado (usando um termômetro com a calibração confirmada contra um banho de gelo fundente) até atingir a temperatura desejada ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e assim mantido por um dia antes da incubação das amostras.

Esses testes foram realizados utilizando o caldo YGP e a inoculação foi feita com o auxílio de uma alça de inoculação contendo uma colônia de levedura crescida em Agar YGP por 48 h.

As leituras foram realizadas após 24 h, 48 h, 72 h de incubação, checando-se diariamente a temperatura do banho-maria com termômetro com a calibração confirmada. Os tubos que, segundo escala de Wickerham, apresentarem turvação +3 e +2 foram considerados positivos.

8. Identificação de leveduras

Após a obtenção dos dados morfológicos e bioquímicos, as leveduras foram identificadas de acordo com as chaves de KURTZMAN e FELL (1998) e BARNETT (1990). Além disso, os dados foram comparados com dados de estirpes padrão da coleção de culturas CBS. O “software” que permite essa comparação está disponível gratuitamente na página da CBS na rede mundial de computadores (<http://www.cbs.knaw.nl/yeast/BioloMICSID.aspx>).

9. Caracterização molecular

9.1 Extração de DNA de leveduras

As linhagens foram cultivadas em 3 mL de caldo YGP à 22±3°C (em estufa) por 2 a 4 dias. As células foram coletadas após centrifugação (Microcentrífuga refrigerada microprocessada 14000 DR da CIENTEC - 5000 rpm, 3 min), utilizando-se tubos para microcentrífuga com capacidade de 1,5 mL. O precipitado foi ressuspensionado e homogeneizado em 500 µL de tampão de extração (0,15 M de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA, 2% de SDS, pH 8,0) e incubado a 65°C por 1 h. Então foram adicionados 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizado cuidadosamente e centrifugado a 12000 rpm por 8 min e a fase aquosa superior foi transferida para novo tubo de microcentrífuga (1,5 mL), acrescentando-se igual volume de isopropanol (cerca de 400 µL) seguido de homogeneização. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 5 min e, após este período, centrifugados (12.000 rpm; 15 min; 5° C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 50 µL de etanol frio (70%) e centrifugado a 14000 rpm por 10 min. O etanol foi descartado e os tubos colocados para secar sobre papel toalha. Após a completa evaporação dos resíduos do etanol, o DNA foi ressuspensionado em 50 µL de TE (100 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM de EDTA, pH 8,0) e estocado à -4° C. A qualidade e quantidade do DNA obtidas foram analisadas após eletroforese em gel de ágarose (1,0 %; 90 V; 30 min), corado com brometo de etídio, visualizado em luz UV e fotografado usando filtros vermelhos e UV (CABRAL, 2009).

Em alguns casos foi necessária uma etapa adicional para romper a parede celular. Essa etapa foi particularmente importante na extração de DNA das estirpes de basidiomicetos. Antes da incubação das células por 1 h, foi adicionado 0.1 g de pérolas de vidro estéreis ao pellet e 0,5 mL tampão de extração. Os tubos foram então agitados (Fast Prep® TM Modelo FP120 da Bio 101 Thermo Electron Corporation, USA), com velocidade de 4 m/s, por 10 segundos.

9.2 Amplificação da Região D1/D2 do 26S rDNA por reação em cadeia da polimerase (PCR)

A região D1/D2 do rDNA 26S foi amplificada por PCR, utilizando-se os iniciadores NL1 (5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3') e NL4 (5' GGT

CCG TGT TTC AAG ACG G 3') (KURTZMAN e ROBNETT, 1998). A seguinte mistura de reação (Kit Gibco BRL) foi utilizada: 38,0 µL de água milli-Q esterilizada; 5,0 µL de tampão de amplificação 10X com MgCl₂ (concentração final 1,5 mM); 2,5 µL de MgCl₂; 1,0 µL de dNTP 10 mM; 0,5 µL de Taq DNA polimerase (2,5U); 1,0 µL de cada iniciador: (concentração inicial de 20 pmol/µL); 1 µL do DNA alvo (100 a 200 ng). O programa de ciclagem utilizado foi uma desnaturação inicial, um ciclo de 94°C/3 min, 52°C/30 seg. e 72°C/30 seg; 35 ciclos de 94°C/1 min, 52°C/30 seg e 72°C/30 seg; com uma extensão final de 72°C/10 min.

Os produtos de PCR foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1,0% (90 v/30 min) e corados com brometo de etídio, visualizados em luz UV e fotografados. O tamanho desses fragmentos foi avaliados através de comparação com um marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Gibco BRL).

9.3 Amplificação da região intergênica (ITS) por reação em cadeia da polimerase

A região ITS das linhagens foram amplificadas por PCR, utilizando-se os iniciadores ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (FELL et al., 2000). O programa de ciclagem utilizado foi uma desnaturação inicial a 95 °C/3 min; 30 ciclos de 95°C/30seg, 57°C/30 seg e 73°C/50 seg; com uma extensão final de 73°C/5 min, 4°C/5 min.

Os produtos de PCR foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1,0% (90 v/30 min) e corados com brometo de etídio, visualizados em luz UV e fotografados. O tamanho desses fragmentos foi avaliado através de comparação com um marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Gibco BRL).

9.4 Purificação do produto de PCR

Os fragmentos de DNA amplificado por PCR foram purificados utilizando o "kit" de purificação GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a purificação o DNA foi quantificado em agarose 1,0% (90v/45 min), utilizando-se o marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

9.5 Reação de sequenciamento da Região D1/D2 do 26S rDNA

Após esta etapa, as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento, utilizando o DNA Sequencing Kit, Big DyeTM Termination Cycle Sequencing, Ready Reaction (ABI PRISM), seguindo recomendações do fabricante.

9.6 Precipitação da reação de sequenciamento com isopropanol

Após a ciclagem, o DNA foi precipitado adicionando-se 80 µL de isopropanol 75%, sendo então incubado à temperatura ambiente por 15 min, sendo os tubos submetidos a centrifugação (13000 rpm/ 25 min/4°C). O sobrenadante foi descartado, sendo adicionado 250 µL de etanol 70%, o conteúdo dos tubos foi homogeneizado em agitador mecânico por 10 segundos e centrifugado a 13000 rpm/ 5 min. O sobrenadante foi removido com micropipeta e o purificado lavado novamente com etanol 70%, repetindo o procedimento anterior. Com a remoção do sobrenadante, o “pellet” foi ressuspendido em 25 µL de TSR (Applied Biosystems), sendo as amostras aquecidas à 95°C/2 min para solubilização do “pellet” e desnaturação das fitas molde marcadas, e logo colocadas em banho de gelo por 1 min, para que a reação fosse interrompida. Em seguida as amostras foram transferidas para o 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), onde a seqüência alvo foi analisada.

9.7. Análise da seqüências de rDNA utilizando ferramenta Blast

As seqüências de rDNA obtidas foram visualizadas e editadas utilizando softwares livres de Bioinformática tais como o Bioedit 7.09 (disponível na página Bio-Soft Net: <http://en.bio-soft.net/format/BioEdit.html>) e Chromas Lite 2.01 (disponível na página Softpedia: <http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Chromas-Lite.shtml>). Esses programas permitem a conversão das seqüências para o formato Fasta (.fas) e, com esse tipo de arquivo, foi possível comparar as seqüências obtidas com seqüências de culturas depositadas em bancos de dados especializados, via internet. A ferramenta utilizada realizar para tal comparação foi o Nucleotide BLAST, disponível gratuitamente na página do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM>

=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DE
 FAULTS=on&LINK_LOC=blasthome).

9.8. Análise da sequências de rDNA utilizando sequências tipo

Após a análise utilizando o Nucleotide BLAST, as sequências foram alinhadas e comparadas com sequências de estirpes tipo para confirmar a identificação molecular. O número de acesso dessas estirpes padrão no Gene Bank está relacionado na tabela 4. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado com programa Clustal W, ferramenta disponível no programa BIOEDIT (HALL, 1999).

Tabela 4: Tabelas 4: Culturas tipo utilizadas como padrões para identificação molecular e número de acesso no GeneBank da sequência da região D1/D2 do rDNA

Espécie	Número na coleção de culturas	Número de acesso no Gen Bank (D1/D2)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	DBVPG 4828	EU287881.1
<i>Bullera sinensis</i>	CBS 7238 ^T	AF189884
<i>Candida albicans</i>	CBS 562 ^T	U45776.1
<i>Candida apicola</i>	CBS 2868 ^T	U45703.1
<i>Candida intermedia</i>	CBS 572 ^T	U44809
<i>Candida leandrae</i>	CBS 9745 ^T	AY449659.1
<i>Candida pseudointermedia</i>	CBS 6918 ^T	U44816
<i>Candida saopaulonensis</i>	CBS 10.001 ^T	AY695348
<i>Candida sergipensis</i>	CBS9567 ^T	AF397405.1
<i>Candida restingae</i>	CBS 8493 ^T	AF059667.1
<i>Candida sorbophila</i>	CBS 6739 ^T	U45852
<i>Cryptococcus flavescens</i>	CBS 942 ^T	AB035042
<i>Cryptococcus flavus</i>	CBS 331 ^T	AF075497
<i>Cryptococcus laurentii</i>	CBS 139 ^T	AF075469
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	CBS 9606 ^T	AF472625.1
<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	CBS 10406 ^T	AM262324.1
<i>Eballistra oryzae</i>	BAUER et al., 2001	AF229353.1
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	CBS 5833 ^T	U45736.1
<i>Pichia guilliermondii</i> (<i>C. guilliermondii</i>)	CBS 2030 ^T	U45709
<i>Pseudozyma aphidis</i>	CBS 517.83 ^T	AJ235303
<i>Pseudozyma fusiformata</i>	CBS 6951 ^T	AJ235304
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	WS 6.4 ^T	DQ008953.1
<i>Pseudozyma prolifica</i>	CBS 319.87 ^T	AF294700.1
<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	CBS 6566 ^T	AF444492.1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CBS 316 ^T	AF070432
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 1171 ^T	U44806
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	CBS 491 ^T	AF189977
<i>Starmerella meliponinorum</i> (<i>C. etchellsii</i>)	UWO (PS) 00-22.1	AF313354.1
<i>Tremella globispora</i>	CBS 6972 ^A	AF189869
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	CBS 732 ^T	U72163

9.9. Construção de árvore filogenética

Após o alinhamento das seqüências, as árvores filogenéticas foram construídas com o programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007). A distância filogenética foi inferida e corrigida de acordo com o modelo Kimura 2 parâmetros (KIMURA, 1980). A topologia da árvore foi construída usando Neighbour-Joining (SAITOU e NEI, 1987), com análise de Bootstrap com 1000 repetições.

10. Detecção da atividade “killer”

A atividade micocinogênica testada em ágar YM acrescido de 0,003% de azul de metileno, tamponado a um pH 4,2 com tampão citrato (0,05 M). As estirpes foram confrontadas com oito estirpes alvo de leveduras padrão pertencentes à Coleção de Culturas de Leveduras do IMPPG/UFRJ (Tabela 5), inoculadas de modo a obter um crescimento conflente.

Depois de crescidas em ágar YM (26°C/48 h), as leveduras alvo foram diluídas em água destilada estéril até uma concentração de 4×10^5 células/mL. As leveduras alvo (100 µl) foram espalhadas, separadamente, na superfície do meio com “swab” estéril. Já as estirpes testadas foram crescidas em caldo YM (26°C/48 h) e inoculadas pela técnica de “replica-plate”. As placas foram, então, incubadas de 48 à 72 h em estufa a 26°C. As leveduras foram consideradas micocinogênicas quando produziram uma zona de inibição com nenhum crescimento e uma zona azul adjacente indicando a morte celular da estirpe sensível (ABRANCHES et al., 1998). Quando só foi possível verificar a zona de inibição as leveduras foram classificadas como com capacidade de inibição.

Tabela 5: Estirpes sensíveis (alvo) utilizadas no teste de detecção do fenótipo “killer”

Espécie	Nº na coleção do IMPPG-UFRJ	Nº na coleção de origem
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	51707 ^T	NRRL Y-2510
<i>Candida tropicalis</i>	51505 ^T	ATCC 750
<i>Candida krusei</i>	51913	IMPPG-UFRJ
<i>Candida glabrata</i>	50083	UWO Canadá Y55
<i>Candida tropicalis</i>	50736	IMPPG-UFRJ
<i>Williopsis saturnus</i>	51700 ^T	NRRL Y-17396
<i>Metschnikowia lunata</i>	50496 ^T	UCD 77-62
<i>Clavispora lusitanae</i>	50342 ^T	UCD 61-4

11. Triagem para detecção de atividade queratinolítica

11.1. Obtenção do substrato queratina

As penas brancas e a queratina utilizadas nos experimentos subseqüentes foram gentilmente doadas pelo Laboratório Proteases de Microrganismos do IMPPG-UFRJ. As penas brancas de galinha, utilizadas para produção de meio de cultivo e para obtenção de queratina foram lavadas com adição de com detergente e delipidação sob agitação com clorofórmio/metanol (1:1 v/v) à temperatura ambiente (300 rpm/1 hora).

A queratina foi extraída a 100 °C com dimetil sulfóxido (DMSO), de acordo com a metodologia descrita por WARZKIEWICZ, LOBAREWSKI, & WOLSKI (1987) com algumas modificações. A queratina solubilizada foi precipitada com dois volumes de acetona gelada e a mistura incubada a 4 °C por 48 horas, então a reação foi centrifugada a 700 x g por 15 minutos. Em seguida, a queratina permaneceu sob refrigeração a 4 °C para sua completa secagem, sendo macerada logo após.

11.2. Detecção de atividade queratinolítica

O meio de cultura utilizado nesse teste foi preparado homogeneizando a queratina em salina (NaCl 0.85%) por 1 h sob agitação (300 rpm). Posteriormente essa solução foi centrifugada, em tubos plásticos, com tampa de rosca, do tipo Falcon (15 mL), a 3000 rpm por 15 min. O resíduo de queratina foi descartado e ao sobrenadante, acrescentou-se o agar e o extrato de levedura. A esterilização foi feita em autoclave (15 min/121°C).

A inoculação das amostras foi feita com um multi inoculador, pela técnica de “réplica-plate”. As placas foram então incubadas durante 21 dias e, após esse período, coradas com o corante Comassie Blue R-250 [5 mL de solução estoque (Comassie blue 2%); 4 mL de ácido acético; 20 mL de metanol e 11 mL de água destilada] durante 1 hora.

A leitura das placas foi feita através da detecção de um halo incolor ao redor da colônia. O Comassie Blue cora proteínas; os halos ao redor das colônias mostram que houve degradação da queratina por microrganismos.

As estirpes que apresentaram resultado positivo foram cultivadas em meio tampão ácido cítrico pH 5,5 com penas brancas de galinha 1% por 6 dias a 37°C. Após

crescimento as células foram retiradas por centrifugação a 2800 x g durante 15 minutos. O extrato enzimático foi obtido concentrando 20 vezes em membrana de diálise com limite de exclusão de 9000 Da contra polietilenoglicol 4000.

11.3 Zimografia com gelatina e queratina

Aos extratos enzimáticos concentrados (seção 10) foi adicionado o tampão de amostra para peptidase para SDS-PAGE (tampão Tris-HCl 0,32M, pH 6,8; glicerol 48%v/v; SDS 8% p/v e azul de bromofenol 0,06% p/v) na proporção 9:1 (90 µL de amostra para 10 µL de tampão da amostra para peptidase).

As amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida a 12,5% contendo 1% (p/v) de queratina. Para determinação do peso molecular foram utilizados padrões (Sigma) de (fosforilase B), 67 kDa (soro albumina bovina), 43 kDa (ovoalbumina), 30 kDa (anidrase carbônica), 20,1 kDa (inibidor de tripsina de soja) e 14,4 kDa (α -lactoalbumina). A corrida foi realizada a 170 V por 3 horas a 4 °C. Após a corrida, os géis foram lavados com Triton X-100 2,5% (v/v) duas vezes por 15 minutos sob agitação para a remoção do SDS. Em seguida, os géis foram incubados por 48 h a 37 °C em tampão ácido cítrico pH 5,0.

Para detecção da atividade proteolítica, os géis foram corados “overnight” com Comassie blue R-250 (preparado como descrito no item 5) e descorados com a solução metanol: ácido acético: água (50:10:40 v/v/v) sob agitação até o aparecimento de bandas de degradação (HEUSSEN e DOWDLE, 1980).

RESULTADOS

1. Identificação polifásica de leveduras endofíticas

Após duas coletas foram obtidas 226 estirpes de leveduras endofíticas, de quarenta e sete espécies. Foram detectadas vinte e seis espécies associadas à amostras de milho, quatorze à cana de açúcar, onze à arroz, quinze à alface, dezenove à abacaxi, duas à mandioca, duas à café e uma à limão (tabela 7). Diversas espécies foram isoladas de mais de um meio de enriquecimento: cinco espécies foram isoladas em meio BIL G, cinco em BIL E, dezessete em BIL G, trinta e duas em BIL XL, dezenove em BIL XLO e vinte e uma em BIL Y. Os resultados dos testes fenotípicos para identificação de leveduras estão na tabela 18 (em anexo).

Setenta e seis estirpes de leveduras endofíticas foram identificadas após sequenciamento da região D1/D2 de rDNA. A comparação de estirpes padrão com sequências das estirpes endofíticas se encontra na tabela 6. Para a nomenclatura de fungos adiciona-se o prefixo *aff.*, uma abreviação do termo em latim *afez*, ao descritor da espécie para indicar afinidade do organismo identificado com a espécie conhecida. Este termo indica que o organismo é similar a espécie denominada, mas diferente o suficiente para ser considerado da mesma espécie.

Tabela 6: Similaridade entre as sequências da região de D1/D2 de leveduras endofíticas e leveduras tipo. As culturas com similaridade de 99% (ou maior) com a espécie tipo foram consideradas da mesma espécie. Espécies com similaridade superior a 96% e inferior a 99% foram consideradas espécies relacionadas (*aff.*). As espécies indicadas com um * foram identificadas apenas através de sequenciamento da região D1/D2 do rDNA

Código do isolado	Identificação	Nº de bases idênticas/ nº de bases comparadas	Percentual de similaridade
4L3XLa	<i>Pseudozyma aphidis</i>	522/522	100%
2L3XL	<i>Pseudozyma aphidis</i>	501/501	100%
1L3XL	<i>Pseudozyma aphidis</i>	511/511	100%
4AL5XL-XL	<i>Pseudozyma aphidis</i>	482/482	100%
1AR1XLO-XL	<i>Pseudozyma aff. fusiformata</i>	437/448	97.5%
1CA1XLa	<i>Pseudozyma aff. profilica</i>	420/426	98.6%
1MI5Ga	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	567/567	100%
1C1XL	<i>Pseudozyma sp.</i>	436/459	95%
4AB4Y	<i>Tremella aff. globispora</i>	396/412	96.1%

Código do isolado	Identificação	Nº de bases idênticas/ nº de bases comparadas	Percentual de similaridade
1AL4G*	<i>Bullera sinensis</i>	463/463	100%
1AB5Gb	<i>Rhodospidium paludigenum</i>	440/442	99.5%
2AB5G*	<i>Rhodospidium paludigenum</i>	475/475	100%
AR2XLO-XL	<i>Rhodospidium paludigenum</i>	550/550	100%
MI4XLOb	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	585/587	99.6%
1AB1XLO-XL	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	509/509	100%
2AB3Ya*	<i>Rhodotorula aff. mucilaginosa</i>	465/475	97.9%
1CA2G	<i>Rhodotorula aff. mucilaginosa</i>	434/441	98.4%
2CA2G	<i>Rhodotorula aff. mucilaginosa</i>	455/462	98.5%
AB3Y	<i>Cryptococcus flavus</i>	505/507	99.6%
4AB3XL-XL	<i>Cryptococcus flavus</i>	515/517	99.6%
1AB3XL-XL	<i>Cryptococcus flavus</i>	532/534	99.6%
1AL3XL	<i>Cryptococcus flavus</i>	508/524	97%
4AL3XL	<i>Cryptococcus flavus</i>	531/534	99.4%
4MI4XL-XL	<i>Cryptococcus flavus</i>	506/507	99.8%
1MI4Y	<i>Cryptococcus flavescens</i>	468/468	100%
4MI7XL-XL	<i>Cryptococcus flavescens</i>	491/491	100%
4MI5Y*	<i>Cryptococcus flavescens</i>	532/533	99.8%
1MI5Y	<i>Cryptococcus flavescens</i>	522/522	100%
MI8XLOa	<i>Cryptococcus flavescens</i>	532/532	100%
1MI8XLOa	<i>Cryptococcus flavescens</i>	501/501	100%
CA1XLO-XL	<i>Cryptococcus flavescens</i>	503/503	100%
2AB1XL-XL	<i>Cryptococcus laurentii</i>	460/461	99.8%
AB1Yb	<i>Cryptococcus laurentii</i>	469/471	99.6%
1AB1XL-XL	<i>Cryptococcus laurentii</i>	504/505	99.8%
4AB1XL-XL	<i>Cryptococcus laurentii</i>	487/488	99.8%
CA3XLO-XLb	<i>Cryptococcus laurentii</i>	485/486	99.8%
1MI7XLOb	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	517/517	100%
4C1G	<i>Cryptococcus aff. nemorosus</i>	503/510	98.6%
2CA2XL-Xla*	<i>Cryptococcus nemorosus</i>	450/451	99.7%
4AB6XL	<i>Aureobasidium aff. pullulans</i>	340/347	97.9%
2AB6XL-XL	<i>Aureobasidium aff. pullulans</i>	407/422	96.4%
1MI7E	<i>Candida etchellsii</i>	380/380	100%
2CA1XL-XLb	<i>Candida guilliermondii</i>	497/499	99.6%
4MI4Yb	<i>Candida guilliermondii</i>	460/462	99.6%
1MI8Ya	<i>Candida guilliermondii</i>	486/488	99.6%
2AL6Ya	<i>Candida guilliermondii</i>	524/526	99.6%
4AL5Y	<i>Candida guilliermondii</i>	482/485	99.4%
1AB5Y	<i>Candida guilliermondii</i>	525/530	99.1%
2AR2Y	<i>Candida pseudointermedia</i>	391/392	99.7%
2M13Y	<i>Candida pseudointermedia</i>	391/392	99.7%
MI3E	<i>Candida pseudointermedia</i>	448/450	99.5%
1MI3B	<i>Candida pseudointermedia</i>	443/445	99.5%
1MI3Ya	<i>Candida pseudointermedia</i>	443/445	99.5%
1MI3XL	<i>Candida pseudointermedia</i>	443/445	99.5%
2MI3XL	<i>Candida pseudointermedia</i>	441/443	99.5%

Código do isolado	Identificação	Nº de bases idênticas/ nº de bases comparadas	Percentual de similaridade
2MI3XL-XL	<i>Candida pseudointermedia</i>	448/450	99.5%
2MI3G	<i>Candida pseudointermedia</i>	443/445	99.5%
4MI3XL-XL	<i>Candida pseudointermedia</i>	418/420	99.5%
4MI6XL	<i>Candida pseudointermedia</i>	391/392	99.7%
2MI9Y	<i>Candida pseudointermedia</i>	391/392	99.7%
4MI9Y	<i>Candida pseudointermedia</i>	391/392	99.7%
2AR3Y	<i>Candida pseudointermedia</i>	496/499	99.4%
1MI3Ga*	<i>Candida pseudointermedia</i>	445/448	99.3%
2AL4Ga	<i>Candida saopaulonensis</i>	416/417	99.7%
1AR2Y	<i>Candida saopaulonensis</i>	417/418	99.7%
4MI3Ga	<i>Candida saopaulonensis</i>	418/419	99.7%
1MI7G	<i>Candida saopaulonensis</i>	419/420	99.7%
1MI7XLOa	<i>Candida saopaulonensis</i>	418/419	99.7%
MI7XLO-XLb	<i>Candida saopaulonensis</i>	419/420	99.7%
2MI8XL	<i>Candida saopaulonensis</i>	418/419	99.7%
2MI8XL-XLc	<i>Candida saopaulonensis</i>	423/426	99.3%
1MI8XLb	<i>Candida saopaulonensis</i>	250/252	99.2%
4MI8XL	<i>Candida saopaulonensis</i>	386/387	99.7%
1MI3Eb	<i>Candida aff. leandrae</i>	414/423	97.8%
CA1XLO	<i>Candida</i> sp. 1 – <i>Candida aff. sorbophila</i>	410/488	84.1%
1CA2Yb	<i>Candida</i> sp. 1 – <i>Candida aff. sorbophila</i>	439/522	84%

2. Distribuição de espécies de leveduras endofíticas por planta

A frequência de isolamento de espécies de leveduras endofíticas a partir de amostras de folhas de abacaxi, milho, arroz, cana de açúcar, alface, mandioca, café e limão encontra-se na tabela 7.

Tabela 7: Frequência de espécies de leveduras endofíticas por planta por folha - 3 amostras de arroz (AR), cana de açúcar (CA), mandioca (MA), café (C) e limão (L), 6 amostras de alface (AL) e abacaxi (AB) e 7 amostras de milho (MI). As espécies marcadas com um * tiveram suas identificações confirmadas por seqüenciamento da região D1/D2 do rDNA. As espécies com um ? não possuem todas as características fenotípicas idênticas a descrição padrão da espécie.

Espécie	MI	CA	AR	AL	AB	MA	C	L	Total
N=	7	3	3	6	6	3	3	3	34
<i>Candida etchellsii</i> *	2	1	1						4
<i>Candida famata</i> ?			1	1	1				3
<i>Candida guilliermondii</i> *	2			2	2				6
<i>Candida intermedia</i> *					1				3
<i>Candida pseudointermedia</i> *	3		2						5

Espécie	MI	CA	AR	AL	AB	MA	C	L	Total
N=	7	3	3	6	6	3	3	3	34
<i>Candida saopaulonensis</i> *	4		1	1					6
<i>Candida rugosa</i> ?		1							1
<i>Candida sake</i> ?	3								3
<i>Candida sp. nova 1</i> ?	1	2							3
<i>Candida aff. leandrae</i> *	1								1
<i>Candida sorbosa</i> ?			1						1
<i>Candida tropicalis</i> ?	2			1					3
<i>Cryptococcus aerius</i> ?	1	2							3
<i>Cryptococcus albidus</i>	1				1				2
<i>Cryptococcus daszewskae</i> ?				2					2
<i>Cryptococcus flavescens</i> *	4	1	2						7
<i>Cryptococcus flavus</i> *	1			3	2				6
<i>Cryptococcus aff. flavus</i>				1					1
<i>Cryptococcus flavus</i> ?		1							1
<i>Cryptococcus laurentii</i> *	3			1	1				5
<i>Cryptococcus perniciosus</i> ?		1							1
<i>Cryptococcus laurentii</i> ?	2	1							3
<i>Cryptococcus nemorosus</i> *		1							1
<i>Cryptococcus podzolicus</i> ?					1				1
<i>Cryptococcus rajasthanensis</i> *	1								1
<i>Cryptococcus spp.</i>	2	2		2	3				9
<i>Bullera sinensis</i> *				1					1
<i>Farysizyma itaipuensis</i>	1								1
<i>Fibulobasidium inconspicuum</i>						1			1
<i>Pseudozyma aphidis</i> *				1				1	2
<i>Pseudozyma aff. fusiformata</i> *			1						1
<i>Pseudozyma hubeiensis</i> *	1								1
<i>Pseudozyma aff. profilica</i> *		1							1
<i>Pseudozyma sp. ?</i>					1				1
<i>Pseudozyma sp. *</i>				2			1		3
<i>Tremella aff. globispora</i> *					1				1
<i>Rhodosporidium paludigenum</i> *			1		1				2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>					1				1
<i>R. aff. mucilaganosa</i> *		1			1				2
<i>Rhodotorula glutinis</i>						1			1
<i>Rhodotorula spp.</i>	1	1			2				4
<i>Sporidiobolus pararoseus</i> *	1								1
<i>Cryptococcus spp. rosa</i>	2				2				4
<i>Trichosporon caseorum</i> ?	2								2
<i>Trichosporon dulciturum</i> ?					1				1
<i>Eballistra aff. oryzae</i>			1						1
<i>Aureobasidium pullulans</i>				1	1				1
<i>Prothoteca wickerhamii</i>					1				1
Levedura não identificada		2		1	1		0		3
Nº de espécies por planta	26	14	11	15	19	2	2	1	

Em amostras de mandioca, limão e café foi possível recuperar menos de 1 espécie de levedura endofítica por amostra coletada (respectivamente 0.6% para as duas primeiras e 0.3% para a última), sendo todas as leveduras da classe Basidiomycetes.

Em amostras de abacaxi, foi possível isolar aproximadamente quatro espécies por amostra, em amostras de alface três espécies por amostra, em amostras de cana de açúcar seis espécies por planta. Para essas três plantas, a maioria das espécies foi de basidiomicetos (82%, 72%, 75% respectivamente). Em amostras de milho foi possível isolar aproximadamente seis espécies por planta e, em amostras de arroz, quatro espécies por planta. Para estas duas plantas, os ascomicetos representaram aproximadamente metade das leveduras isoladas (respectivamente 46.5% e 58.3%).

3. Distribuição de espécies de leveduras endofíticas por meio de enriquecimento

A frequência de leveduras endofíticas por meio de enriquecimento encontra-se na tabela 8. A tabela 9 mostra o número de espécies detectadas por planta e por meio de enriquecimento.

Tabela 8: Frequência de espécies de leveduras endofíticas por meio de enriquecimento

Espécie	Meios de enriquecimento						Total
	B	E	G	XL	XLO	Y	
<i>Candida etchellsii</i> *		3	2	3		3	11
<i>Candida famata</i> ?						3	3
<i>Candida guilliermondii</i> *				2		5	7
<i>Candida intermedia</i> *			2			1	3
<i>Candida pseudointermedia</i> *	1	1	1	2	2	3	10
<i>Candida saopaulonensis</i> *			3	2	2	3	10
<i>Candida rugosa</i> ?				1			1
<i>Candida sake</i> ?			1	1	1		3
<i>Candida sp. nova</i> 1?				1	1		2
<i>Candida aff. leandrae</i> *		1					1
<i>Candida sorbosa</i> ?						1	1
<i>Candida tropicalis</i> ?			1	1		2	4
<i>Cryptococcus aerius</i> ?				3	3	1	7
<i>Cryptococcus albidus</i>				1	2		3
<i>Cryptococcus daszewskae</i> ?				2	1		3
<i>Cryptococcus flavescens</i> *				4	3	3	10
<i>Cryptococcus flavus</i> *			2	6		2	10
<i>Cryptococcus aff. flavus</i>					1		1
<i>Cryptococcus flavus</i> ?				1			1
<i>Cryptococcus laurentii</i> *			1	5	3	2	11
<i>Cryptococcus perniciosus</i> ?				1			1

Espécie	Meios de enriquecimento						Total
	B	E	G	XL	XLO	Y	
<i>Cryptococcus laurentii</i> ?			1	6	3	2	12
<i>Cryptococcus nemorosus</i> *			1	1			2
<i>Cryptococcus podzolicus</i> ?						1	1
<i>Cryptococcus rajasthanensis</i> *				1			1
<i>Cryptococcus</i> spp.	2		3	4	4		13
<i>Bullera sinensis</i> *			1				1
<i>Farysizyma itaipuensis</i>			1	1			2
<i>Fibulobasidium inconspicuum</i>	1						1
<i>Pseudozyma aphidis</i> *				3			3
<i>Pseudozyma aff. fusiformata</i> *					2		2
<i>Pseudozyma hubeiensis</i> *			1				1
<i>Pseudozyma aff. profilica</i> *				1			1
<i>Pseudozyma</i> sp. ?				1			1
<i>Pseudozyma</i> sp. *				2	2	1	5
<i>Tremella aff. globispora</i> *						1	1
<i>Rhodosporidium paludigenum</i> *			1		1		2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>			1		2		3
<i>R. aff. muciliginosa</i> *						1	1
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1					1	2
<i>Rhodotorula</i> spp.			3	1			4
<i>Sporidiobolus pararoseus</i> *					1		1
<i>Cryptococcus spp. rosa</i>	1	1			2		4
<i>Trichosporon caseorum</i> ?				2			2
<i>Trichosporon dulciturum</i> ?				1			1
<i>Eballistra aff. oryzae</i>				1			1
<i>Aureobasidium pullulans</i>				2		1	3
<i>Prothoteka wickerhamii</i>				2		1	3
Levedura não identificada		1		3	1	1	6

BIL adicionado de: XL (xilose + lactose); XLO (xilose + lactose sob agitação); G (glicose); E (glicose + etanol); Y (glicose + 0,5% de extrato de levedura); B – mesma composição de G, com aproximadamente 85mL

Tabela 9: Número de espécies detectadas por planta e por meio de enriquecimento

Microcosmo	Plantas							
	AB	MI	AR	CA	AL	MA	C	LI
BIL XL	9	14	2	8	4	0	1	1
Somente em BIL XL	3	5	1	5	3	0	1	1
BIL XLO	2	11	2	5	4	0	0	0
Somente em BIL XLO	2	5	2	3	2	0	0	0
BIL G	7	9	0	2	4	0	1	0
Somente em BIL G	2	3	0	1	3	0	1	0
BIL Y	7	5	7	3	6	1	0	0
Somente em BIL Y	4	1	6	0	4	0	0	0
BIL B	2	1	0	0	1	2	0	0
Somente em BIL B	0	0	0	0	0	1	0	0
BIL E	1	3	0	0	0	0	0	0
Somente em BIL E	0	1	0	0	0	0	0	0

A utilização dos meios de enriquecimento BIL G e BIL Y, os quais diferem em sua composição apenas na concentração de extrato de levedura, mostrou a recuperação de espécies similares. Porém, utilizando BIL Y foram isoladas mais espécies de leveduras do clado *Nahoidea* e *Sporobodiales* (leveduras cor de rosa). O meio de cultivo BIL Y foi seletivo para espécies do clado *Debaryomyces* e do grupo *C. intermedia*. O meio de cultivo BIL E foi seletivo para poucas espécies de ascomicetos, porém isolou uma nova espécie de ascomiceto (1MI3Eb) e *C. etchelsii*. O meio de cultivo BIL XL foi seletivo para as espécies do gênero *Cryptococcus* e a utilização deste meio sob agitação (BIL XLO) não teve um grande impacto na recuperação de leveduras desse gênero. O meio de enriquecimento BIL B, por ter uma grande área de contato com o oxigênio, teve sua superfície coberta de fungos filamentosos. Isso impediu que muitas espécies de leveduras pudessem ser isoladas.

4. Leveduras endofíticas isoladas de folhas de abacaxi (*Ananas comosus*)

A partir das seis amostras de folhas de abacaxi, obtidas em duas coletas, foram isoladas três espécies de ascomicetos (*Candida famata*, *C. guilliermondii*, *C. intermedia*) e treze espécies de basidiomicetos (*Cryptococcus albidus*, *C. flavus*, *C. laurentii*, *C. podzolicus*, *Cryptococcus* spp., *Tremella* aff. *globispora*, *Cryptococcus* spp. rosa, *Pseudozyma* sp. ?, *R. paludigenum*, *R. mucilaginosa*, *R. aff. muciliginosa*, *Rhodotorula* spp., *T.dulcitum*). Além disso, foram isoladas leveduras pretas (*A. pullulans*, que teve sua identificação confirmada por sequenciamento) e uma espécie de alga (*P. wickerhamii*). A maioria das estirpes isoladas (aproximadamente 80%) foi de basidiomicetos e foi possível detectar aproximadamente quatro espécies de leveduras endofíticas por amostra coletada.

Em relação à utilização de diferentes meios de enriquecimento, a distribuição de espécies pode ser vista na tabela 10. A maioria das espécies encontradas (13 de um total de 18) foi detectada nos meios de enriquecimento contendo glicose como fonte de carbono. Porém a utilização de outros meios permitiu o isolamento de algumas espécies como *Pseudozyma* sp., *T. dulcitum*, *A. pullulans* as quais só foram detectadas no meio BIL XL e *R. mucilaginosa* e *C. albidus* que só foram detectadas no meio de enriquecimento BIL XLO.

Tabela 10: Distribuição das espécies de leveduras endofíticas isoladas de abacaxi por meio de enriquecimento.

Espécies	Enriquecimentos					
	XL	XLO	G	Y	B	E
<i>Pseudozyma</i> sp.	+					
<i>Tremella</i> aff. <i>globispora</i>				+		
<i>Rhodospiridium paludigenum</i>			+			
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		+				
<i>Rhodotorula</i> aff. <i>mucilaginosa</i>				+		
<i>Rhodotorula</i> sp.	+		+			
<i>Cryptococcus flavus</i>	+		+	+		
<i>Cryptococcus podzolicus</i>				+		
<i>Cryptococcus laurentii</i>	+		+	+		
<i>Cryptococcus albidus</i>		+				
<i>Cryptococcus</i> sp.	+		+		+	
<i>Cryptococcus</i> sp. <i>rosa</i>					+	+
<i>Trichosporon dulcitum</i>	+					
<i>Aureobasidium pullulans</i>	+					
<i>Candida guilliermondii</i>	+			+		
<i>Candida famata</i>				+		
<i>Candida intermedia</i>			+			

BIL adicionado de: XL (xilose + lactose); XLO (xilose + lactose sob agitação); G (glicose); E (glicose + etanol); Y (glicose + 0,5% de extrato de levedura); B – mesma composição de G, com aproximadamente 85mL

5. Leveduras endofíticas isoladas de folhas de plantas da família Poaceae

5.1. Leveduras endofíticas isoladas de folhas de milho (*Zea mays*)

A partir de sete amostras de folhas de milho, obtidas em duas coletas, foram obtidos nove espécies de ascomicetos (*C. etchellsii*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. sake*, *C. saopaulonensis*, *C. intermedia*, *C. pseudointermedia*, *Candida* aff. *leandrae*, *Candida* aff. *sorbophila*). Também foram isoladas treze espécies de basidiomicetos: *C. aerius*, *C. flavescens*, *C. flavus*, *C. laurentii*, *C. laurentii* ?, *C. albidus*, *C. rajasthanensis*, *Cryptococcus* spp., *P. hubeiensis*, *Cryptococcus* spp. *rosa*, *Rhodotorula* sp., *S. pararoseus* e *T. caseorum*.

Um isolado não pode ser identificado mesmo após seqüenciamento da região D1/D2. O isolado 1MI3Eb apresentou 97.8% de similaridade (414 bases idênticas em 423 bases comparadas na região D1/D2) com *C. leandrae* (CBS 9735^T) e 97,1% (410 bases idênticas em 422 bases comparadas na região D1/D2) de similaridade com *C. restingae* (CBS 8493^T). Essas duas espécies foram isoladas pela primeira vez de plantas tropicais, coletadas no Brasil (ROSA et al., 1999 e RUIVO et al., 2004).

O isolado 1MI8XL-Xla apresentou apenas 86% de similaridade com *C. sorbophila* (CBS 6739^T) e possui homologia de 100% com a seqüência da região D1/D2

de duas outras estirpes isoladas de cana de açúcar no decorrer desse trabalho (1CA2Yb e CA1XLO) (figura 11). Porém, apesar dessa similaridade filogenética, a cultura de milho difere quanto ao perfil assimilativo das culturas isoladas de cana de açúcar, em diversos testes.

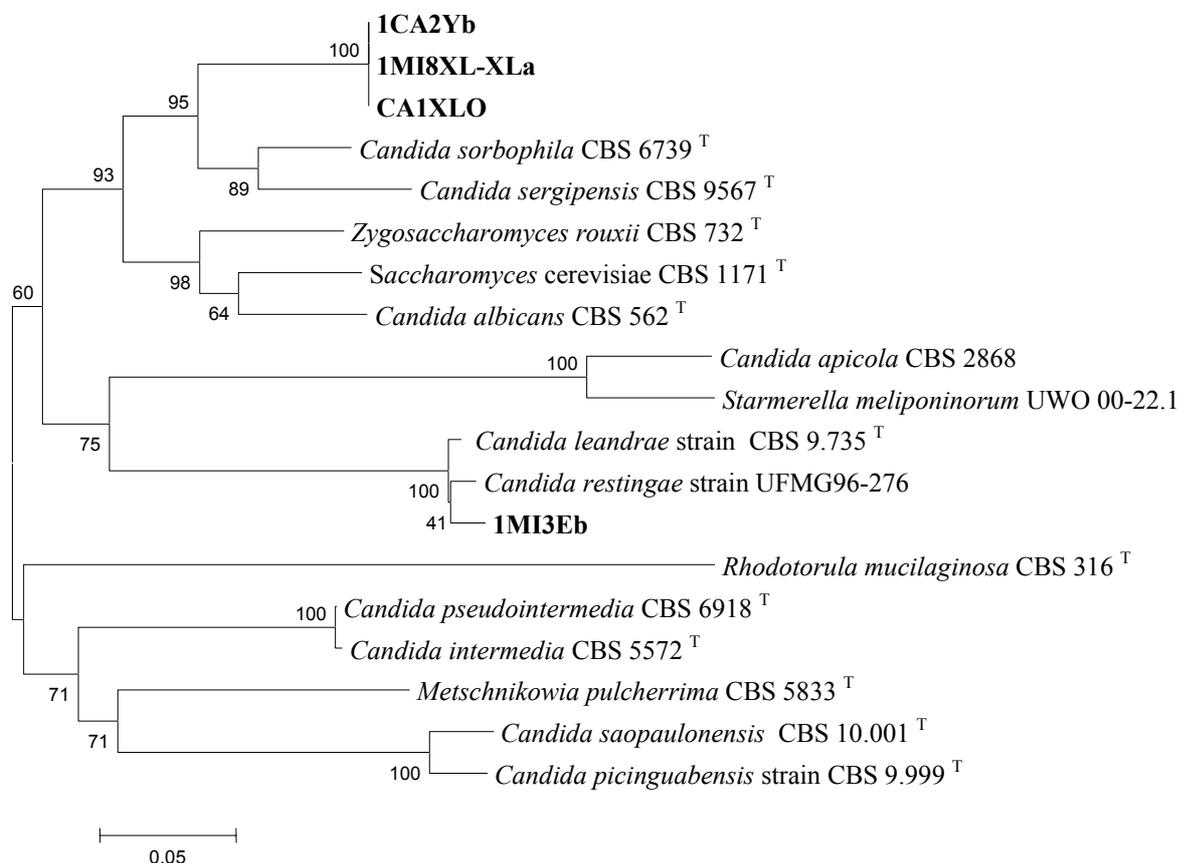


Figura 11: Árvore filogenética mostrando a relação evolucionária dos isolados 1CA2Yb, 1MI8XL-XLa, CA1XLO e 1MI3Eb com outras espécies de leveduras baseadas no alinhamento da subunidade D1/D2 da região 26S do rDNA. A árvore foi construída usando a distância corrigida de Kimura e MEGA v4 (TAMURA et al., 2007). Os números nos ramos indicam os valores de “bootstrap” em porcentagem, baseados em 1000 repetições. A barra de escala representa 0,05 substituições de nucleotídeos em cada posição.

A distribuição das espécies por meios de enriquecimento está na tabela 11. Dezenove das 24 espécies puderam ser detectadas em microcosmos contendo xilose/lactose como fonte de carbono, sendo que algumas espécies só foram isoladas a partir do meio de enriquecimento BIL XLO (*S. pararoseus*, *C. rajasthanensis*, *C. aerius* ?, *Cryptococcus* sp. e *Cryptococcus* sp. rosa) e outras só foram isoladas partir de BIL XL (*C. flavus*, *C. albidus*, *B. peninseticola* ?, *T. caseorum* ?, *Candida* sp.3 - provável espécie nova).

Candida sp. 2 - provável espécie nova (1MI3Eb) só foi isolada a partir do meio de enriquecimento BIL E. *Rhodotorula sp.*, *P. hubbeiensis* e *C.intermedia* só foram detectadas no meio de enriquecimento BIL G. *Candida guilliermondii* só foi detectada no meio de enriquecimento BIL Y.

Tabela 11: Distribuição das espécies de leveduras endofíticas isoladas de milho por meio de enriquecimento.

Espécies	Enriquecimentos					
	XL	XLO	G	Y	B	E
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>		+				
<i>Rhodotorula sp.</i>			+			
<i>Pseudozyma hubbeiensis</i>			+			
<i>Cryptococcus flavus</i>	+					
<i>Cryptococcus laurentii</i> ?	+	+				
<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	+		+		
<i>Cryptococcus albidus</i>	+					
<i>Cryptococcus aerius</i> ?		+				
<i>Cryptococcus flavescens</i>	+	+		+		
<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>		+				
<i>Farysizyma itaipuensis</i>	+		+			
<i>Bullera peninseticola</i> ?	+					
<i>Trichosporon caseorum</i> ?	+					
<i>Cryptococcus sp.</i>		+				
<i>Cryptococcus sp. rosa</i>		+				
<i>Candida etchellsii</i>	+		+			+
<i>Candida saopaulonensis</i>	+	+	+	+		
<i>Candida intermedia</i>			+			
<i>Candida pseudointermedia</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Candida guilliermondii</i>				+		
<i>Candida tropicalis</i>	+		+			
<i>Candida sake</i>	+	+	+			
<i>Candida sp.2</i> - provável espécie nova						+
<i>Candida sp.3</i> - provável espécie nova	+					

BIL adicionado de: XL (xilose + lactose); XLO (xilose + lactose sob agitação); G (glicose); E (glicose + etanol); Y (glicose + 0,5% de extrato de levedura); B – mesma composição de G, com aproximadamente 85mL

5.2. Leveduras endofíticas isoladas de folhas de arroz (*Oryza sativa*)

A partir de três amostras de folhas de arroz, obtidas em uma coleta, foram isoladas seis espécies de ascomicetos: *C. etchellsii*, *C. famata* ?, *C. saopaulonensis*, *C. intermedia*, *C. pseudointermedia* e *C. sorbosa* ?. Dentre os basidiomicetos, foram isoladas quatro espécies: *C. flavescens*, *Pseudozyma aff. fusiformata*, *R. paludigenum* e *Eballistra aff. oryzae*.

A partir de amostras de arroz, não foi possível detectar nenhuma espécie nos meios de enriquecimento BIL G, BIL B e BIL E (tabela 12). Seis das nove espécies detectadas foram isoladas apenas a partir do meio de enriquecimento contendo uma concentração mais elevada de extrato de levedura (BIL Y). Porém as espécies *Pseudozyma aff. fusiformata*, *E. oryzae* e *R. paludigenum* só foram detectadas em meio de enriquecimento contendo xilose/lactose como fonte de carbono.

Tabela 12: Distribuição das espécies de leveduras endofíticas isoladas de arroz por meio de enriquecimento.

Espécie	Enriquecimentos					
	XL	XLO	G	Y	B	E
<i>Pseudozyma aff. fusiformata</i>		+				
<i>Eballistra oryzae</i>	+					
<i>Rhodospodium paludigenum</i>		+				
<i>Cryptococcus flavescens</i>	+			+		
<i>Candida etchesii</i>				+		
<i>Candida pseudointermedia</i>				+		
<i>Candida intermedia</i>				+		
<i>Candida saopaulonensis</i>				+		
<i>Candida famata</i> ?				+		
<i>Candida sorbosa</i> ?				+		

BIL adicionado de: XL (xilose + lactose); XLO (xilose + lactose sob agitação); G (glicose); E (glicose + etanol); Y (glicose + 0,5% de extrato de levedura); B – mesma composição de G, com aproximadamente 85mL

5.3. Leveduras endofíticas isoladas de folhas de cana de açúcar (*Saccharum* spp.)

A partir de três amostras de folhas de cana de açúcar foram isoladas três espécies de ascomicetos: *C. etchellsii*, *Candida* sp. nova 1, *C. rugosa*. Duas culturas (1CA2Yb, CA1XLO), após sequenciamento da região D1/D2 e comparação com culturas tipo, não apresentam similaridade elevada com nenhuma estirpe padrão já descrita, porém possuem sequência 100% similar entre si e com a estirpe isolada de milho (figura 11).

Dentre os basidiomicetos, foram isoladas nove espécies: *C. aerius* ?, *C. flavescens*, *C. flavus* ?, *C. laurentii* ?, *C. nemorosus*, *C. perniciosus*, *Cryptococcus* sp., *Pseudozyma aff. profilica* e *Rhodotorula aff. mucilaginoso*.

Nenhuma espécie de levedura foi detectada nos meios de enriquecimento BIL B e BIL E (tabela 13). Onze das doze espécies detectadas foram isoladas a partir de meios de enriquecimento contendo xilose-lactose como fonte de carbono. Porém, *Rhodotorula aff. mucilaginoso* só foi isolada do meio de enriquecimento BIL G.

Tabela 13: Distribuição das espécies de leveduras endofíticas isoladas de cana de açúcar por meio de enriquecimento.

Espécie	Enriquecimentos					
	XL	XLO	G	Y	B	E
<i>Pseudozyma profilica</i>	+					
<i>Rhodotorula aff. mucilaginosa</i>			+			
<i>Cryptococcus laurentii</i> ?		+				
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	+					
<i>Cryptococcus perniciosus</i>	+					
<i>Cryptococcus flavescens</i>		+				
<i>Cryptococcus flavus</i> ?	+					
<i>Cryptococcus aeriis</i> ?	+	+		+		
<i>Cryptococcus</i> sp.	+	+				
<i>Candida</i> sp.1- provável espécie nova		+		+		
<i>Candida etchelsii</i>	+		+	+		
<i>Candida rugosa</i>	+					

BIL adicionado de: XL (xilose + lactose); XLO (xilose + lactose sob agitação); G (glicose); E (glicose + etanol); Y (glicose + 0,5% de extrato de levedura); B – mesma composição de G, com aproximadamente 85mL

6. Leveduras endofíticas isoladas de folhas de alface (*Lactuca sativa*)

A partir de seis amostras de folhas de alface foi possível isolar quatro espécies de ascomicetos: *C. tropicalis*, *C. famata* ?, *C. guilliermondii* e *C. saopaulonensis*. Além disso, uma espécie de levedura preta (*A. pullulans*) também foi detectada. Dentre os basidiomicetos, foram isoladas nove espécies: *C. daszewskae* ?, *C. laurentii*, *Cryptococcus* sp., *C. flavus*, *Cryptococcus aff. flavus*, *P. aphidis*, *Pseudozyma* sp. e *B. sinensis*.

Quanto à utilização de variados meios de enriquecimento, a distribuição das espécies pode ser vista na tabela 14. Nenhuma espécie pode ser isolada a partir do meio de enriquecimento BIL E. Espécies distintas foram isoladas utilizando meios contendo xilose/lactose e meios contendo glicose como fonte de carbono. *P. aphidis*, *C. daszewskae* ? e *C. laurentii* só foram isolados a partir do meio BIL XL. *Cryptococcus aff. flavus* só foi isolado a partir de BIL XLO. *B. sinensis* e *C. saopaulonensis* só foram isolados a partir de BIL G. *A. pullulans*, *C. tropicalis* ?, *C. guilliermondii* e *C. famata* só foram isoladas de meios de enriquecimento BIL Y. Nove das quatorze espécies detectadas foram isoladas a partir de meios de enriquecimento contendo glicose como fonte de carbono.

Tabela 14: Distribuição das espécies de leveduras endofíticas isoladas de alface por meio de enriquecimento.

Espécie	Enriquecimentos					
	XL	XLO	G	Y	B	E
<i>Pseudozyma aphidis</i>	+					
<i>Pseudozyma</i> sp.		+		+		
<i>Bullera sinensis</i>			+			
<i>Cryptococcus daszewskae</i> ?	+					
<i>Cryptococcus flavus</i>	+	+	+	+		
<i>Cryptococcus aff. flavus</i>		+				
<i>Cryptococcus</i> sp.			+		+	
<i>Cryptococcus laurentii</i>	+					
<i>Aureobasidium pullulans</i>				+		
<i>Candida tropicalis</i> ?				+		
<i>Candida famata</i>				+		
<i>Candida saopaulonensis</i>			+			
<i>Candida guilliermondii</i>				+		

XL – xilose + lactose; XLO – xilose + lactose com agitação; G – glicose; E – glicose + etanol; Y – glicose + 0,5% de extrato de levedura; B – mesma composição de G, com aproximadamente 85mL

7. Leveduras endofíticas isoladas de folhas de mandioca, café e limão.

Só foi possível isolar leveduras endofíticas de uma das três amostras de folhas de mandioca coletadas e estas foram identificadas como *F. inconspicuum* e *R. glutinis*. O uso de meios de enriquecimento contendo xilose e lactose como fonte de carbono não foi eficaz na recuperação de espécies de leveduras em amostras de mandioca. A espécie *F. inconspicuum* só foi isolada do meio BIL B; *R. glutinis* também isolada dos meios BIL B e BIL Y. Nesse caso, o maior volume de amostra do meio de enriquecimento BIL B (100mL) parece ter contribuído na detecção de leveduras que estavam presentes em menor concentração.

Só foi possível isolar leveduras endofíticas de duas das três amostras de folhas de café, as quais foram identificadas como *Pseudozyma* sp. (95% de similaridade com a sequência de *P. hubbeiensis*) e *C. nemorosus*. *Pseudozyma* sp. só foi detectada no meio de enriquecimento BIL XL e *C. nemorosus* só pode ser detectado no meio BIL G.

A partir de três amostras de folhas de limão coletadas, só foi possível isolar *P. aphidis* a partir do meio de enriquecimento BIL XL.

8. Presença de biótipos incomuns e possíveis espécies novas no interior das amostras de folhas

Diversas estirpes isoladas nesse trabalho não puderam ser identificadas até o nível de espécie, mesmo após o seqüenciamento da região D1/D2 de DNA ribossomal. Isso porque a similaridade entre o DNA dessas culturas e o DNA da estirpe tipo mais próxima foi inferior a 99%.

A partir de amostras de plantas da família Poaceae foi possível isolar *Pseudozyma aff. fusiformata* (1AR1XLO-XL), *Pseudozyma aff. profilica* (1CAIXLa), *Candida* sp. 1 (CA1XLO, 1CA2Yb, 1MIXL-XLa) e *Candida aff. leandreae* (1MI3Eb). A partir de amostras de abacaxi foram isoladas *Tremella aff. globispora* (4AB4Y), *Rhodotorula aff. mucilaginoso* (2AB3Ya) e *Aureobasidium aff. pullulans* (4AB6XL, 2AB6XL-XL). A partir de amostras de café foram isoladas *Pseudozyma* sp. (1C1XL) e *Cryptococcus aff. nemorosus* (4C1G).

Além disso, diversas espécies identificadas utilizando as características fenotípicas, não apresentam resultados iguais ao de nenhuma espécie já descrita. FONSECA e INÁCIO (2006), em uma revisão sobre leveduras de filoplano, citam a dificuldade encontrada por diversos estudiosos da área, em identificar essas leveduras tendo em vista que algumas espécies apresentam fenótipos muito heterogêneos.

9. Recuperação de leveduras endofíticas utilizando metodologia convencional de isolamento:

Utilizando a metodologia tradicional de isolamento de endofíticos (AZEVEDO, 1998; ARAÚJO, 2002) só foi possível isolar leveduras endofíticas a partir de uma das amostras de milho. A levedura detectada, um ascomiceto não identificado, parecia estar saindo de um vaso condutor da amostra de milho (figura 12). A partir das amostras de cana de açúcar, mandioca, limão, abacaxi, alface e arroz só foi possível detectar o aparecimento de fungos filamentosos endofíticos (figura 12).

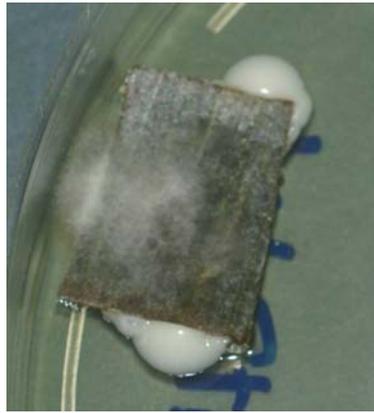


Figura 12: Levedura detectada pela metodologia tradicional de isolamento de microrganismos endofíticos em amostra de milho

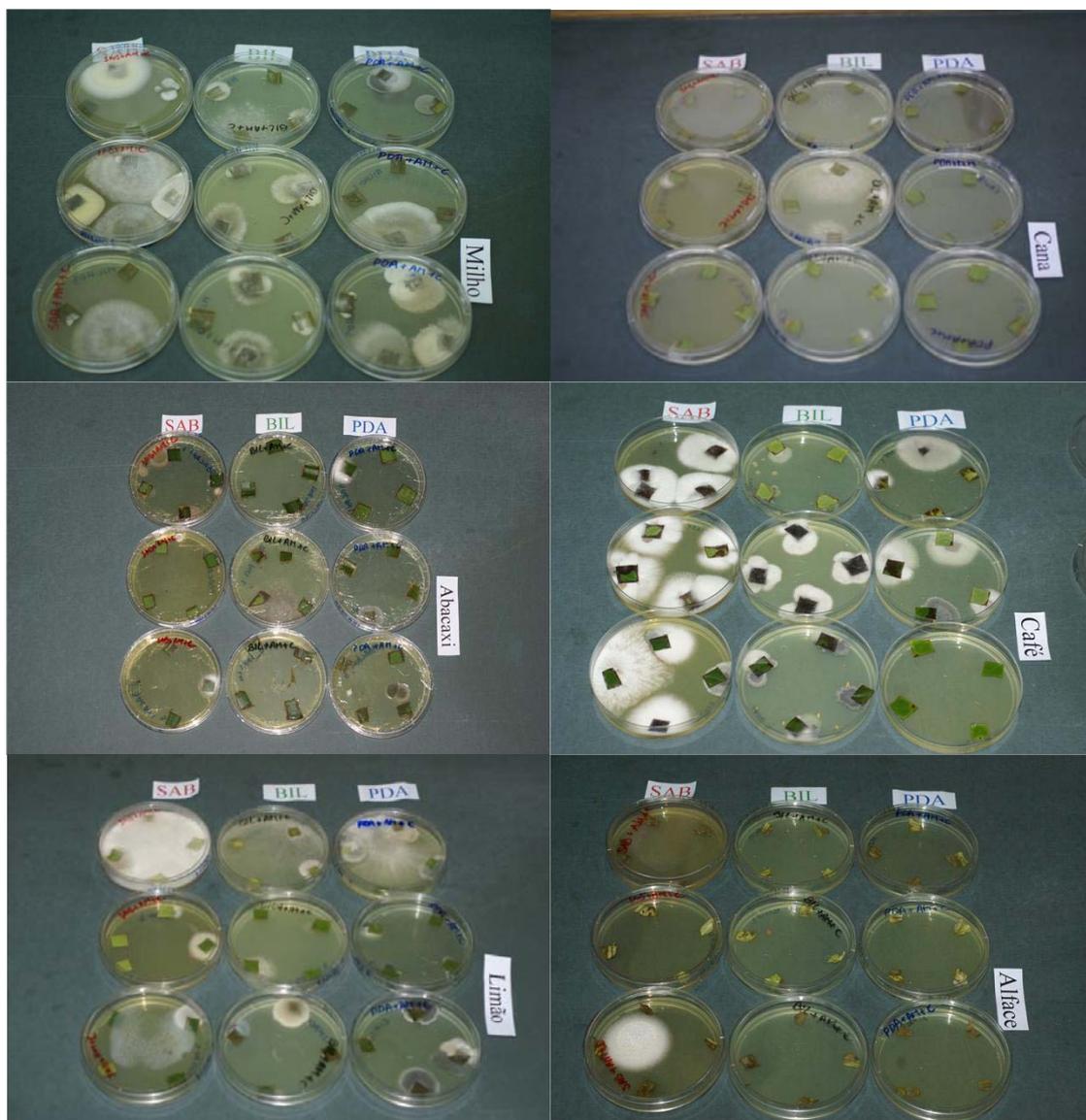


Figura 13: Detecção de microrganismos endofíticos em amostras de milho, cana de açúcar, abacaxi, café, limão e alface utilizando metodologia tradicional de isolamento (meios de cultivo: PDA, BIL com glicose e YGP)

A tabela 15 mostra a contagem de colônias de fungos filamentosos endofíticos detectados nesse experimento.

Tabela 15: Detecção de microrganismos endofíticos utilizando metodologia convencional. Para cada amostra foram testados 12 fragmentos de folha, em cada um dos meios de cultura (4 fragmentos por placa, 3 placas de cada meio, por amostra). Os números representam o número de colônias de fungo em cada amostra.

Planta	Amostras	Meios de cultivo utilizados		
		YGP (SAB)	BIL	PDA
Milho	Amostra A	8	9*	6*
	Amostra B	11	11	8
	Amostra C	11	11	10
Cana de açúcar	Amostra A	3	6	0
	Amostra B	3	7	0
	Amostra C	5	6	2
Abacaxi	Amostra A	3	0	3
	Amostra B	4	0	2
	Amostra C	2	1	2
Arroz	Amostra A	2	1	0
	Amostra B	5	2	2
	Amostra C	3	3	1
Alface	Amostra A	1	0	0
	Amostra B	0	0	0
	Amostra C	0	0	0
Café	Amostra A	11	10	7
	Amostra B	12	12	6
	Amostra C	12	10	8
Mandioca	Amostra A	2	2	0
	Amostra B	3	0	0
	Amostra C	5	3	1
Limão	Amostra A	7	5	8
	Amostra B	7	4	7
	Amostra C	5	5	8

* Além das colônias fúngicas foi possível detectar uma colônia de levedura

10. Isolamento de leveduras endofíticas com fenótipo “killer”

Dentre os 226 isolados de leveduras endofíticas testados, 15 estirpes (6,6%) apresentaram fenótipo “killer” e/ou inibitório (tabela 16), sendo três isoladas de amostras de arroz, uma isolada de abacaxi, quatro isoladas de alface e seis isoladas de milho. Essas culturas pertencem a dez diferentes espécies, sendo cinco delas da classe Ascomycota e cinco da classe Basidiomycota.

Dez destas foram capazes de eliminar mais de uma levedura alvo. Nenhuma estirpe testada foi capaz de eliminar os ascomicetos *W. saturnus* e *C. lusitanae*. Cinco estirpes não foram capazes de eliminar a levedura alvo padrão, *Candida glabrata*, o que é uma indicação de que, usar apenas uma levedura alvo, pode reduzir a chance de detecção do fenótipo “killer”. Importante ressaltar que a estirpe *C. guilliermondii* (2AL6Yb) foi capaz de inibir todas as leveduras alvo, exceto *C. glabrata*.

Tabela 16: Leveduras endofíticas que apresentaram fenótipo “killer” (+) ou inibitório (i).

Cultura	Identificação	Leveduras alvo				
		51707	51913	50083	50736	50496
AR1XLO	<i>Pseudozyma aff. fusiformata</i>	+	+	+	+	+
1AR3Ya	<i>Cryptococcus flavescens</i> ?			+		+
1AR1Yb	<i>Candida sorbosa</i> ?	+		+	i	
4AB4Gb	<i>Cryptococcus</i> sp.					+
1AL4Y	<i>Cryptococcus flavus</i> ?					+
2AL4Bb	<i>Cryptococcus</i> sp.					+
2AL5Y	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+				+
2AL6Yb	<i>Candida guilliermondii</i>	i	i		i	i
1MI8E	<i>Candida etchelsii</i> ?	+		+		
1MI9E	<i>Candida etchelsii</i> ?	i		+		
1MI7E	<i>Candida etchelsii</i> ?	+		+		
1MI7XLb	<i>Candida etchelsii</i> ?	i		+		
1MI3Gb	<i>Candida sake</i>	+		+		
1MI3Eb	<i>Candida aff. leandrae</i>	+		+		

51707: *R. mucilaginosa*; 51913: *C. parapsilosis*; 50083: *C. glabrata*; 50736: *C. tropicalis*; 50496: *M. lunata*

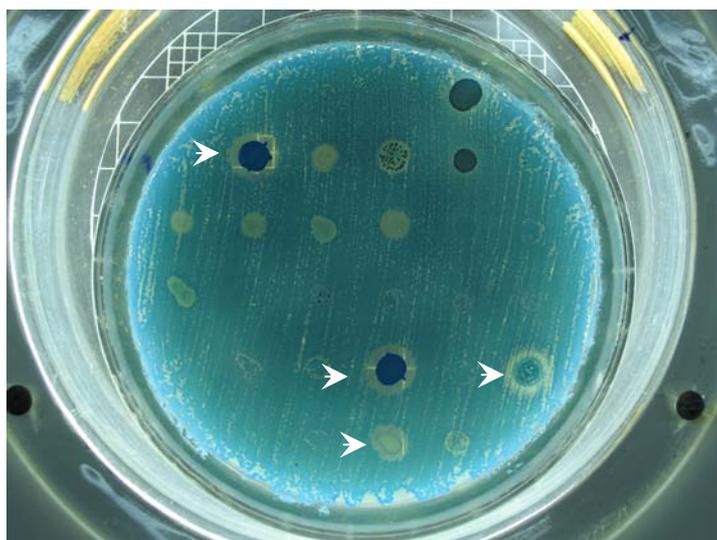


Figura 14: Detecção de leveduras com capacidade de inibição, indicadas pela seta branca.

11. Detecção de leveduras endofíticas queratinolíticas

Dentre os 226 isolados de leveduras endofíticas testados, onze culturas, de seis espécies, apresentaram resultado positivo na triagem para detecção de atividade queratinolítica (tabela 17, figura 15), sendo duas de cana de açúcar, cinco de milho, duas de arroz e duas de abacaxi. As zimografias mostram bandas de degradação de queratina, confirmando que essas leveduras possuem atividade queratinolítica (figura 16). A massa molecular destas enzimas ficou na faixa de 100 kDa.

Tabela 17: Leveduras endofíticas queratinolíticas

Cultura	Identificação
1CA1XLa	<i>Pseudozyma aff. prolifica</i>
CA3XLO-XLb	<i>Cryptococcus laurentii</i> ?
2MI6Y	<i>Cryptococcus laurentii</i>
2MI7XL-XL	<i>Cryptococcus laurentii</i>
2MI5XL-XL	<i>Cryptococcus flavescens</i> ?
2MI6XL-XL	<i>Cryptococcus albidus</i>
MI8XLOb	<i>Cryptococcus</i> sp.
2AR2Y	<i>Candida pseudointermedia</i>
2AR3Y	<i>Candida pseudointermedia</i>
4AB6XL	<i>Aureobasidium pullulans</i>
4AB6XL-XL	<i>Aureobasidium pullulans</i>

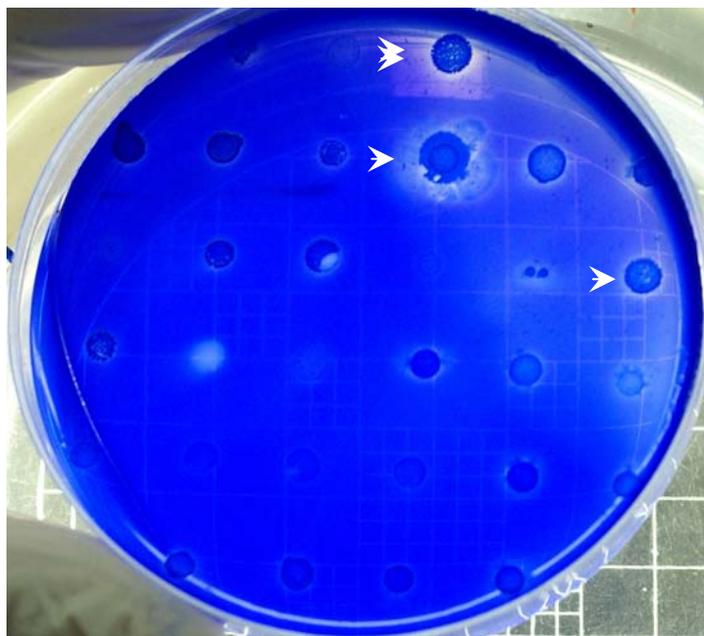


Figura 15: Leveduras em meio para detecção de atividade queratinolítica. As estirpes que apresentaram halo branco ao seu redor (indicadas com seta branca) foram consideradas positivas

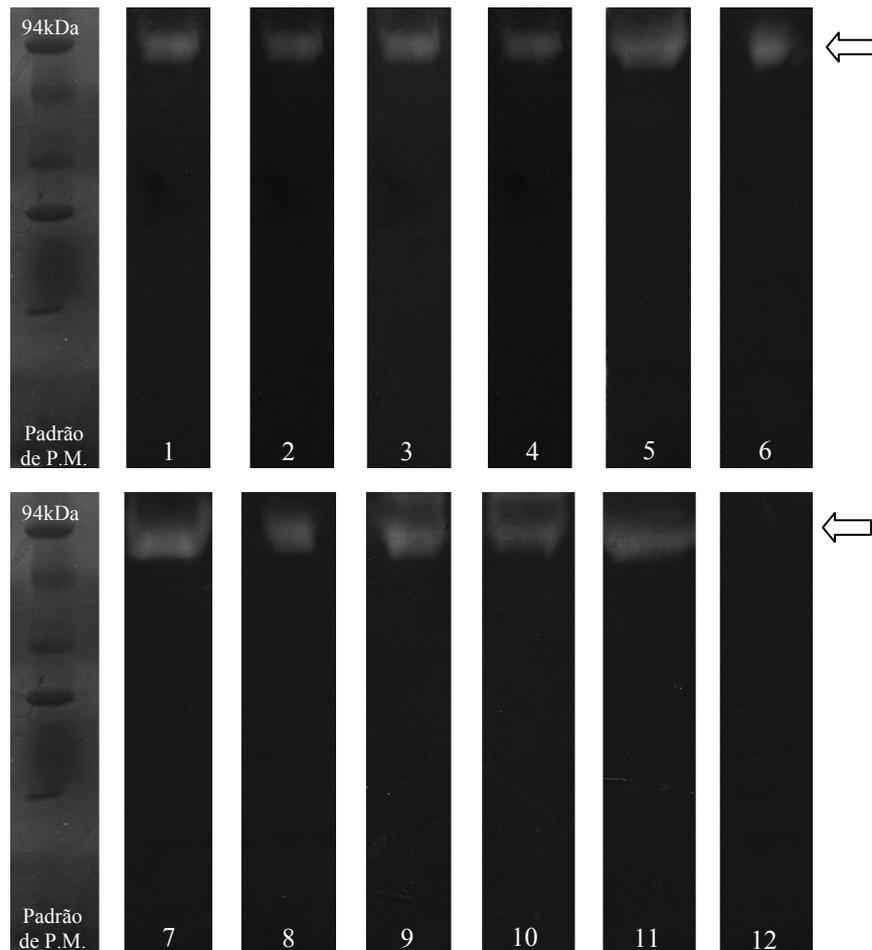


Figura 16: Zimografia de queratina. A coluna 1 corresponde ao isolado 2MI7XL-XL; a coluna 2 corresponde ao isolado 2MI6XL-XL; a coluna 3 corresponde ao isolado MI8XLOb; a coluna 4 corresponde ao isolado 2MI6Y; a coluna 5 corresponde ao isolado 2AR2Y, a coluna 6 corresponde ao isolado 2AR3Y; a coluna 7 corresponde ao isolado CA3XLO-XLb; a coluna 8 corresponde ao isolado 1CA1XLa; a coluna 9 corresponde ao isolado 4AB6XL; a coluna 10 corresponde ao isolado 4AB6XL-XL; a coluna 11 corresponde ao isolado 2MI5XL-XL; a coluna 12 é um controle negativo. A seta indica a posição da banda com atividade queratinolítica, bem como seu peso molecular aproximado em comparação com seu padrão de peso molecular.

DISCUSSÃO

1. Distribuição de leveduras endofíticas em folhas

As leveduras são descritas como importantes colonizadores da superfície das plantas desde a década de 60 (LAST e PRICE, 1969; RUINEN, 1963) porém, pouco se conhece sobre as comunidades de leveduras presentes no interior dos tecidos vegetais. Esse fato motivou nosso grupo de pesquisa a testar adaptações na metodologia de isolamento de microrganismos endofíticos para estudar as populações de leveduras. Tais alterações são o uso de amostras trituradas, grandes volumes de inóculo e utilização de meios de enriquecimento (GARCIA, 2007). No presente trabalho, essas adaptações foram testadas em folhas de diversas plantas.

Para todas as plantas utilizadas neste estudo, exceto arroz, a maioria das espécies de leveduras endofíticas pertence à Classe Basidiomycota. Houve uma clara predominância de espécies do gênero *Cryptococcus* e gêneros relacionados a este. Além destes gêneros, estão presentes leveduras produtoras de pigmentos carotenóides (*Rhodotorula* e *Rhodosporidium*) e do gênero *Pseudozyma*. Esses gêneros de basidiomicetos são muito comuns nas superfícies vivas de vegetais (fitobiontes) e também em vegetais em decomposição (saprobiontes) (RIBEIRO, 2009). SILVA (2003) mostrou dados semelhantes ao estudar a diversidade de leveduras associadas ao filoplano de diversas plantas de ecossistemas do tipo mediterrâneo, tendo em vista que cerca de 90% dos seus isolados são de afinidade basidiomicética. Vale ressaltar que, no presente estudo, foi possível verificar uma alta incidência de basidiomicetos mesmo utilizando diversos meios de enriquecimento que favorecem o crescimento de leveduras fermentativas de afinidade ascomicética.

Em alguns casos, leveduras ascomicéticas como *D. hansenii*, também são relatadas como importantes colonizadores do filoplano. MIDDELHOVEN (1997), ao estudar diversas plantas de climas áridos, verificou que aproximadamente metade dos isolados correspondia a essa espécie. Muitos ascomicetos possuem capacidade de fermentar carboidratos e um perfil de assimilação de fontes de carbono restrito em contraste com os basidiomicetos que assimilam muitas fontes de carbono e, geralmente, não fermentam. Essas características fazem com que leveduras ascomicéticas estejam comumente associadas à ambientes com grande concentração de açúcares simples

disponíveis tais como os frutos maduros. No presente trabalho, diversos meios de enriquecimento utilizados continham glicose como fonte de carbono, favorecendo o crescimento de ascomicetos. Dentre os ascomicetos isolados nesse trabalho, vale destacar a presença de leveduras como *C. intermedia*, *C. pseudointermedia*, *C. saopaulonensis*, *C. guilliermondii* e *C. famata* (anamorfo de *D. hansenii*). Tais espécies já foram descritas colonizando a superfície de plantas tais como bromélias, cana de açúcar, mamão papaia (RIBEIRO, 2009; STRINGINI et al., 2008; AZEREDO et al., 1998).

Grande parte das leveduras isoladas, tanto ascomicetos quanto basidiomicetos, possui um amplo espectro enzimático, sendo capaz de assimilar a maioria das fontes de carbono testadas. Essa característica é importante para leveduras do filoplano tendo em vista que estas podem passar por períodos de carência de nutrientes. Além disso, neste habitat existem diversas fontes de carbono presentes em baixas concentrações. SILVA (2003) destaca que a maioria das leveduras de filoplano é capaz de utilizar açúcares de baixo peso molecular, como a maltose e celobiose, polissacarídeos de reserva como a inulina e o amido e também compostos aromáticos, presentes na maioria das plantas.

É curioso verificar que as espécies de ascomicetos predominantes nesse trabalho aparecem nas chaves de BARNETT, PAYNE e YARROW (1993) junto com os gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula* e espécies similares, que são basidiomicetos e que também são comuns na filosfera. Isso mostra a grande similaridade fenotípica que existe dentre as leveduras prevalentes nesses habitats, apesar de estarem em grupos filogeneticamente distintos.

Avaliando os dados disponíveis na literatura nota-se uma grande similaridade entre a comunidade de leveduras do filoplano e a comunidade de leveduras endofíticas. ISAEVA e colaboradores (2008) também citam que as espécies do filoplano são as mesmas encontradas no interior dos tecidos vegetais. Esses dados sugerem algumas espécies da superfície do vegetal penetram no interior dos tecidos e lá se estabelecem, ainda que temporariamente. GARCIA (2007) mostrou, por exemplo, elevada incidência de leveduras endofíticas em *N. cruenta* durante a estação chuvosa e baixa incidência destes organismos durante a estação seca, principalmente os ascomicetos. Isso evidencia o aspecto sazonal da presença de leveduras no interior dos tecidos vegetais.

RUINEN (1966), baseado em estudos de microscopia, mostrou que as espécies de *Cryptococcus* e *Rhodotorula* isoladas do filoplano de diversas espécies de plantas tropicais eram capazes de degradar a cutícula das folhas para acessar nutrientes. Essa

pode ser uma porta de entrada desses microrganismos nos tecidos vegetais; outras possibilidades são as injúrias causadas por insetos e as aberturas naturais das plantas, como estômatos e tricomas. Essas estruturas são numerosas e grandes o suficiente para permitir a passagem de leveduras e normalmente estão abertas em condições de umidade atmosférica alta (STERN, 1994).

O interior dos vegetais parece ser um habitat muito favorável tendo em vista que esses microrganismos estão mais protegidos de condições adversas como a exposição direta a radiação solar, variações de temperatura, umidade e a competição por nutrientes é menor (SAKIYAMA, 2001). Além disso, quando o microrganismo é capaz de resistir aos mecanismos de defesa da planta e coloniza os vasos condutores, tem acesso ininterrupto aos carboidratos produzidos pela planta.

A presença de leveduras da superfície de abacaxi já havia sido detectada por ROBBS, HAGLER e MENDONÇA-HAGLER (1989) utilizando amostras de folhas, solos e frutos (maduros e imaturos) coletadas em Araruama (Rio de Janeiro). Neste trabalho, as espécies de basidiomicetos foram prevalentes em amostras de folhas, sendo detectadas oito espécies do gênero *Cryptococcus*, cinco espécies do gênero *Rhodotorula* além de *S. pararoseus* e *T. cutaneum* (ROBBS, HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1989). Diversas espécies encontradas naquele estudo em superfície de folhas de abacaxi foram detectadas como endofíticas no presente trabalho: *C. albidus*, *C. flavus*, *C. laurentii*, *Rhodotorula* sp., *C. guilliermondii*. A presença destas espécies na superfície pode ser um indício de que estas migraram para o interior das folhas. Os dados de GARCIA (2007) mostram uma grande semelhança entre a comunidade de leveduras epifíticas e leveduras endofíticas em *N. cruenta* e a autora sugere que a entrada desses organismos pode ocorrer através dos tricomas.

A presença de leveduras endofíticas em plantas da família Bromeliaceae já havia sido detectada por LANDELL, MAUTONE e VALENTE (2006). Estes autores fizeram a trituração do tecido vegetal e semearam as diluições 10^{-1} e 10^{-2} , pela técnica de espalhamento em placa, em meio de cultivo YM. Porém, neste trabalho, poucos isolados puderam detectados. Posteriormente nosso grupo de pesquisa verificou a presença de diversos gêneros de leveduras endofíticas (GARCIA, 2007) em *N. cruenta*, bem como a influência da estação seca e da estação chuvosa no isolamento destes organismos.

Espécies de *Rhodotorula* e *D. hansenii*, *C. albidus* detectadas como endofíticas em abacaxi, também foram detectadas no interior de amostras de folhas das bromélias

Vrisea procera e *Tillandsia gardneri* (LANDELL, MAUTONE e VALENTE, 2006). GARCIA (2007) detectou, em *N. cruenta*, diversas espécies que foram detectadas como endofíticas em folhas de abacaxi no presente estudo: estirpes do gênero *Cryptococcus*, *Tremella* e *Trichosporon*, *R. mucilaginosa*, *Rhodotorula* sp., *C. guilliermondii* e *D. occidentalis*. Esses dados sugerem que pode haver uma similaridade entre a microbiota de leveduras em plantas de uma mesma família botânica, mesmo quando os trabalhos utilizam amostras coletadas em locais com climas diferentes e quando as metodologias de isolamento empregadas são diferentes.

C. guilliermondii, que nesse trabalho foi isolada em abacaxi e em amostras de milho e alface, já havia sido detectada no interior de rizomas de *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, uma tradicional erva medicinal chinesa (LI et al., 2008). Essa espécie foi o ascomiceto prevalente na superfície de folhas de abacaxi (ROBBS, HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1989). *P. guilliermondii* é fenotipicamente similar aos grupos *C. intermedia* e *D. hansenii*, os ascomicetos prevalentes no presente estudo.

A. pullulans, que foi detectado em uma das amostras de abacaxi, já foi descrito como endofítico em plantas de outras famílias botânicas. SURYANARAYANAN, WITTLINGER e FAETH (2005) mostraram que essa espécie é a levedura endofítica prevalente em diversas espécies de cactos. A produção de melanina por essa espécie é uma vantagem que auxilia a presença desta levedura no filoplano. Isso porque a presença de melanina e pigmentos similares protege contra as radiações ionizantes (WANG e CASADEVALL, 1994). A presença de celulasas em diversas estirpes de *Aureobasidium* isoladas de plantas tropicais (KUDANGA e MWENJE, 2005) pode auxiliar na penetração desses microrganismos no interior dos tecidos vegetais.

Desde 1987, WHITE Jr. verificou que os fungos endofíticos estavam presentes em 22 espécies de plantas da família Poaceae (gramíneas). No presente trabalho, foi possível detectar 33 espécies de leveduras endofíticas associadas a plantas da Família Poaceae (milho, cana de açúcar e arroz), sendo 12 espécies de ascomicetos e 21 espécies de basidiomicetos. Dentre os ascomicetos, sete espécies do gênero *Candida* foram detectadas em duas ou mais plantas (*C. etchellsii*, *C. guilliermondii*, *C. saopaulonensis*, *C. intermedia*, *C. pseudointermedia*, *C. sorbosa*, *Candida* sp. nova 1). Essas espécies possuem um perfil assimilativo muito semelhante apesar de estarem em clados diferentes. A única exceção é *C. etchellsii* que possui um perfil assimilativo mais restrito.

As espécies *C. intermedia* e *C. pseudointermedia* possuem perfil de assimilação de carboidratos muito semelhantes, diferindo apenas quanto a assimilação de lactose (positiva para *C. intermedia* e negativa para *C. pseudointermedia*) e de ribose (positiva para *C. pseudointermedia* e negativa para *C. intermedia*) (KURTZMAN e FELL, 1998). Suas sequências de D1/D2 de rDNA diferem apenas em três bases, sendo consideradas espécies irmãs (KURTZMAN e ROBNETT, 1998). Neste trabalho diversas estirpes foram identificadas como *C. pseudointermedia*, após seqüenciamento da região D1/D2 de rDNA (figura 17). Porém é curioso notar que todas estas estirpes foram capazes de assimilar a lactose e, a maioria delas, não foi capaz de assimilar a ribose. Isso mostra uma divergência quanto a identificação molecular e a identificação convencional. Cabe questionar se essas espécies não são uma única espécie, com perfil de assimilação variável para assimilação de ribose e lactose.

C. saopaulonensis, que neste trabalho foi isolada de uma amostra de arroz, de três amostras de milho e também de alface, foi originalmente descrita após seu isolamento a partir amostras de água associada às brácteas de *Heliconia vellosiana*, uma angiosperma endêmica da Mata Atlântica (RUIVO et al., 2006). No trabalho de RUIVO e colaboradores só foram detectados duas estirpes dessa espécie. As culturas classificadas como *C. saopaulonensis* no presente trabalho foram identificadas através de seqüenciamento da região D1/D2, apresentando mais de 99% de similaridade com a estirpe tipo desta espécie (figura 17). Porém, algumas estirpes apresentaram diferenças fenotípicas na assimilação de alguns carboidratos, mostrando capacidade de assimilar um número maior de fontes de carbono. Essa adaptação sugere que o perfil assimilativo da espécie é mais variável do que o descrito em 2006. As características verificadas no presente trabalho são uma vantagem para o crescimento dessa espécie no filoplano, tendo em vista que nesse habitat podem ser detectados diversos açúcares em baixas concentrações (SILVA, 2003).

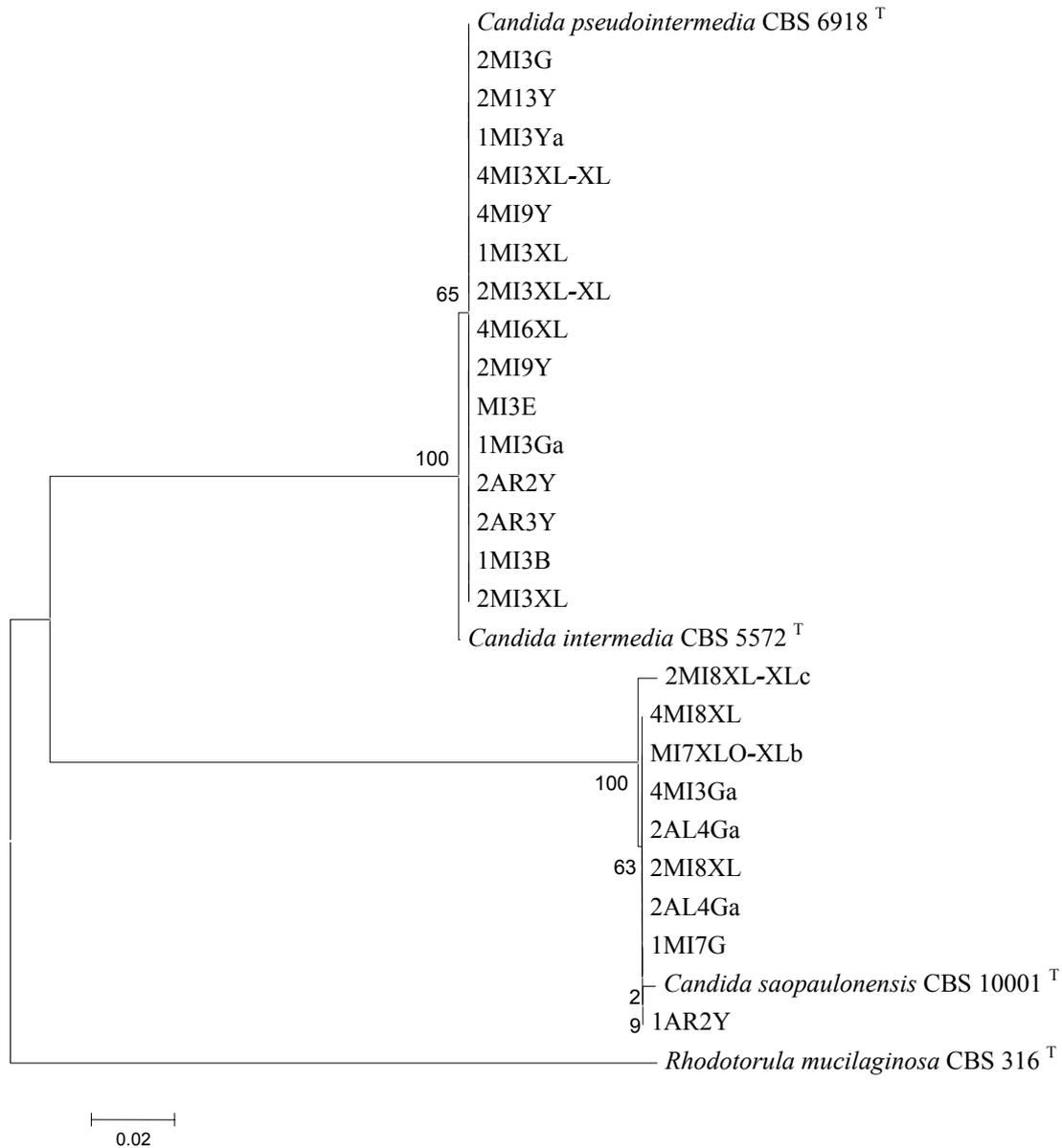


Figura 17: Árvore filogenética mostrando a relação evolucionária dos isolados 2MI3G, 2M13Y, 1MI3Ya, 4MI3XL-XL, 4MI9Y, 1MI3XL, 2MI3XL-XL, 4MI6XL, 2MI9Y, MI3E, 1MI3Ga, 2AR2Y, 2AR3Y, 1MI3B, 2MI3XL, 2MI8XL-XLc, 4MI8XL, MI7XLO-XLb, 4MI3Ga, 2AL4Ga, 2MI8XL, 2AL4Ga, 1MI7G, 1AR2Y com as espécies tipo de *Candida pseudointermedia* (CBS 6918^T), *Candida intermedia* (CBS 5572^T), *Candida saopaulonensis* (CBS 10001^T) e *Rhodotorula mucilaginosa* CBS 316^T baseadas no alinhamento da subunidade D1/D2 da região 26S do rDNA. A árvore foi construída usando a distância corrigida de Kimura e MEGA v4 (TAMURA et al., 2007). Os números nos ramos indicam os valores de “bootstrap” em porcentagem, baseados em 1000 repetições. A barra de escala representa 0,02 substituições de nucleotídeos em cada posição.

Dentre os basidiomicetos, cinco espécies foram detectadas em duas ou mais plantas da família Poaceae (*C. aerius*, *C. flavescens*, *C. flavus*, *C. laurentii* e *Cryptococcus* spp.). Esses dados sugerem uma similaridade entre a microbiota dessas

plantas. As espécies de *Cryptococcus*, principalmente *C. laurentii*, já foram descritas como as leveduras que dominam o filoplano em gramíneas apesar de leveduras produtoras de pigmentos carotenóides serem prevalentes em trigo e cevada (FONSECA e INÁCIO, 2006). Estirpes do gênero *Cryptococcus*, encontradas em seis amostras de milho, duas amostras de arroz e três amostras de cana de açúcar, também foram detectadas por SAITO (2006) e LARRAN e colaboradores (2002) em amostras de trigo.

SAITO (2006) já havia tentado isolar leveduras endofíticas de amostras de trigo, um membro da família Poaceae. Porém, com a metodologia convencional de isolamento de microrganismos endofíticos, só foi possível detectar estirpes de duas espécies (*C. parapsilosis* e *C. albidus*), possivelmente por essas espécies serem prevalentes nas amostras.

AZEREDO e colaboradores (1998) isolaram leveduras da superfície de folhas e caule de cana de açúcar, bem como da rizosfera. As amostras foram coletadas no município de Campos, Rio de Janeiro. Diversas espécies encontradas neste trabalho também foram detectadas como endofíticas de folhas de cana de açúcar. Dentre elas, espécies dos gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula* e *C. guilliermondii*. AZEREDO e colaboradores também detectaram uma estirpe de *Rhodospodium* em folhas de cana e neste trabalho foi detectado *R. paludigenum* em amostras de arroz.

RIBEIRO (2009) isolou leveduras do filoplano, raiz e solo de cana de açúcar cultivada na Fazendinha EMBRAPA, o mesmo local de coleta utilizado no presente trabalho. A partir de amostras de folha, RIBEIRO isolou diversas espécies relacionadas às espécies que foram detectadas no interior da folha no presente trabalho tais como espécies dos gêneros *Pseudozyma* e *Rhodotorula* além de *C. laurentii*, *C. nemorosus*, *C. flavescens* e *C. flavus*. Essa similaridade na microbiota detectada por RIBEIRO e a detectada neste trabalho está relacionada ao fato do local de coleta ser o mesmo. A comparação entre as populações detectadas é um indício de que leveduras do filoplano podem ter penetrado na folha e se estabelecido como endofíticas. BALDINI (1997) mostra que ocorre colonização bacteriana das cavidades subestomáticas em folhas de cana de açúcar, indicando a entrada de bactérias via estômato; GAI e colaboradores (2009) também mostram a presença de leveduras em estômatos de plantas do gênero *Citrus*. Esses dados indicam que os estômatos podem ser uma importante porta de entrada para microrganismos no interior dos tecidos vegetais.

No presente estudo, as maiores taxas de colonização de leveduras endofíticas foram detectadas em plantas da família Poaceae. Algumas plantas desta família, tais

como o capim limão (*Cymbopogon citratus*), produzem compostos antimicrobianos que inibem o crescimento de leveduras, tais como o citral (ABE et al., 2003). Porém, na literatura consultada, não foi possível encontrar relatos de compostos antimicrobianos similares nas plantas selecionadas para este estudo.

As plantas da família Poaceae possuem um sistema imune primitivo que age como primeira linha de defesa contra infecções por microrganismos. Essas plantas produzem peptídeos de baixo peso molecular, chamados defensinas, que atuam contra fungos e bactérias (DE PAULA et al., 2008). Porém, tendo em vista o grande número de trabalhos que mostram a presença de microrganismos endofíticos em plantas dessa família, as defensinas parecem não impedir a colonização por endofíticos. Como as defensinas são sintetizadas frente a processos infecciosos causados por bactérias e fungos patogênicos (LOBO, 2007); nos casos em que os endofíticos possuem uma relação simbiótica com seus hospedeiros não deve ocorrer a ativação dos mecanismos de defesa da planta.

A presença de diversos gêneros de fungos filamentosos endofíticos já havia sido detectada em amostras de alface e outras hortaliças coletadas no sudeste da Itália (D'AMICO, FRISULLO e CIRULLI, 2008). Porém esses autores não demonstraram a presença de leveduras endofíticas nessas amostras. No presente trabalho, treze espécies de leveduras foram detectadas em seis amostras de alface, sendo oito espécies de basidiomicetos e cinco espécies de ascomicetos. Dentre os basidiomicetos, foi possível detectar cinco espécies do gênero *Cryptococcus*. MAGNUSON, KING JR. e TOROK (1990) detectaram quatro espécies desse gênero na superfície de alface fresca. Duas delas (*C. flavus* e *C. laurentii*) também foram detectadas como endofíticas neste trabalho, sugerindo mais uma vez que espécies presentes na superfície da planta podem migrar para o interior dos tecidos vegetais. A estrutura frágil das folhas desta hortaliça pode ser facilmente danificada pela ação de insetos, podendo esta ser uma via de entrada para microrganismos do filoplano. Além disso, na época em que foram realizadas as coletas (meses com elevadas temperaturas), as hortaliças têm que ser constantemente irrigadas, nas raízes ou nas folhas. Com isso, os estômatos estão frequentemente abertos, sendo outra possível porta de entrada para as leveduras da superfície da planta.

A alface, por ser uma hortaliça consumida crua, pode ser uma fonte de contaminação de humanos por patógenos oportunistas. Espécies de *Cryptococcus* detectadas na superfície das folhas de alface fresca (MAGNUSON, KING JR. e

TOROK, 1990), são potencialmente patogênicas para indivíduos com imunidade diminuída tais como pacientes HIV positivos e transplantados (McCURDY e MORROW, 2003). Nas últimas décadas, a incidência de infecções causadas por “*Cryptococcus* não *neoformans*” vem aumentando e as espécies *C. laurentii* e *C. albidus* são as mais que apresentam maior número de casos (KHAWCHAROENPORN, APISARNTHANARAK e MUNDY, 2007). Além das estirpes de *Cryptococcus*, em amostras de alface foram detectados os ascomicetos *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* e *C. famata* que também são classificados como patógenos emergentes (HAZEN, 1995).

As menores taxas de colonização foram detectadas em arbustos (mandioca e café) e limão. Esse fato pode estar relacionado à presença de compostos antimicrobianos nas folhas dessas plantas, conforme analisado na seção três deste capítulo. A partir de três amostras de mandioca só foi possível isolar duas espécies de leveduras endofíticas, num total de quatro isolados, provenientes de uma só amostra. STRINGINI e colaboradores (2008) detectaram oito estirpes de leveduras (*Cryptococcus* sp., *P. fermentans* e *S. cerevisiae*) em duas amostras de um grama de mandioca, liquefeitas em meio de enriquecimento com alta concentração de açúcar (27%) e baixo pH (3.2).

A presença de fungos filamentosos endofíticos em folhas de café já havia sido demonstrada por SANTAMARÍA e BAYMAN (2003). Neste estudo, os autores verificaram que, apesar de estarem separadas por menos de 1 mm, a comunidade de fungos epifíticos difere daquela presente no interior dos tecidos vegetais. Além disso, a comunidade de fungos endofíticos era mais diversa do que aquela que habitava o filoplano. No presente trabalho, a partir de três amostras de café foram isoladas leveduras identificadas como *Pseudozyma* sp. e *C. nemorosus*.

A partir de três amostras de folhas de limão só foi possível recuperar estirpes de *P. aphidis*. A presença de substâncias antimicrobianas em folhas de limão pode ter influenciado na baixa recuperação de espécies de leveduras, conforme discutido na seção três deste capítulo. GAI e colaboradores (2009) detectaram uma baixa diversidade de leveduras endofíticas, apenas três espécies, associada a outras plantas do gênero *Citrus*. Contudo, diferente dos dados obtidos no presente trabalho, aqueles autores não encontraram o gênero *Pseudozyma*. Esse gênero de leveduras filamentosas é comumente isolado de amostras vegetais como folhas, flores e frutas, como saprófitas ou epifíticas (WEI et al., 2005). Recentemente, ABDEL-MOTTAL e colaboradores (2009) isolaram apenas espécies de *Pseudozyma* vivendo no interior dos tecidos

vegetais da planta medicinal *Hyoscyamus muticus*, que produz alcalóides e outros compostos com atividade antifúngica.

Associações específicas de espécies de leveduras endofíticas com determinada planta parecem ser um fenômeno raro, bem como já havia sido descrito para associações entre leveduras do filoplano e plantas. Em filoplano é possível citar a associação entre *Pichia cactophilla*, *P. heedii* e *P. amethionina* e tecidos senescentes de cactos (SILVA, 2003). Características da própria planta e do ambiente em que esta vive podem fazer essa seleção das espécies de leveduras associadas. No caso de cactos podemos citar que a presença de compostos antimicrobianos e o crescimento da planta em regiões quentes e secas selecionam os organismos que conseguem sobreviver a essas condições aparentemente hostis (PARÉ et al., 1996).

2. Metodologia utilizada na detecção de leveduras endofíticas

As modernas técnicas moleculares revelaram uma extensa diversidade microbiana previamente não detectada por métodos dependentes de cultivo seguidos da identificação fenotípica dos isolados. Apesar de cada vez mais utilizadas, as técnicas moleculares não substituem os métodos de cultivo, pois fornecem informação filogenética, mas não fornecem informações sobre as características morfológicas e fisiológicas dos microrganismos. Esforços para melhorar os métodos de cultivo permitem o acesso a esta biodiversidade ainda inexplorada, possibilitando o conhecimento de suas características fisiológicas e morfológicas possibilitando o seu aproveitamento biotecnológico e a compreensão de seu papel ecológico.

No presente trabalho foi possível detectar leveduras em todas as plantas testadas, apesar de poucos isolados terem sido isolados a partir de amostras de mandioca, café e limão. Um dos pontos chave para a recuperação de leveduras endofíticas foi a utilização do protocolo desenvolvido por GARCIA (2007) e testado anteriormente com amostras de bromélias. As técnicas tradicionalmente usadas para o isolamento de microrganismos endofíticos são mais propícias para o isolamento de fungos filamentosos e só permitem o crescimento das leveduras que estão nas bordas dos pedaços de folhas, tendo em vista que as leveduras são organismos imóveis. Possivelmente, por esta razão, na maioria dos trabalhos sobre endofíticos não é detectada a presença de leveduras ou são obtidos poucos isolados (CAO, YOU e ZHOU, 2002; PEREIRA, VIEIRA e AZEVEDO, 1999;

SALAZAR e de GARCÍA, 2005; TAYLOR, HYDE e JONES, 1999). Entretanto, no trabalho de GARCIA (2007) foram isoladas 22 espécies diferentes de leveduras endofíticas, de uma mesma espécie de bromélia (*Neoregelia cruenta*) coletada em uma pequena área de restinga em Barra de Marica, RJ. Porém esse estudo limitou-se a utilização de apenas uma planta e, com isso, não seria possível dizer que o método é eficaz na recuperação de leveduras de plantas de outras famílias botânicas. Com os resultados obtidos no presente estudo é possível afirmar que esse método é eficaz na detecção de leveduras em diferentes tipos de plantas tais como gramíneas, plantas hortenses e bromélias.

Utilizando a metodologia tradicional de isolamento de microrganismos endofíticos não seria possível avaliar a diversidade de leveduras endofíticas nas oito plantas testadas no presente estudo, pelo menos não com um pequeno número de amostras. SAITO (2006) tentou isolar leveduras endofíticas a partir de quatro plantas de distintas: trigo (família Poaceae), batata (família Solanaceae), soja (família Fabaceae), beterraba (família Amaranthaceae). A partir de amostras de trigo, batata e soja só foram isoladas duas espécies e em amostras de beterraba apenas uma espécie. Em todas as plantas testadas foi possível detectar *C. parapsilosis*; 60 das 64 estirpes detectadas foram identificadas como sendo desta espécie. Essa baixa diversidade provavelmente não reflete todas as espécies de leveduras associadas com estas plantas, porém a metodologia que utiliza pequenos fragmentos sobre meio de cultivo sólido permitiu isolar poucas estirpes. Outro fato curioso é que SAITO (2006) só isolou quatro estirpes de basidiomicetos.

No presente trabalho, com o uso de grandes amostras liquefeitas e inoculadas em diversos meios de enriquecimento (GARCIA, 2007), foi possível detectar aproximadamente 50 espécies de leveduras endofíticas, pertencentes a 15 gêneros diferentes. As maiores taxas de colonização foram detectadas em gramíneas, bromélia e planta hortense. Ao comparar a metodologia utilizada com a metodologia usualmente empregada no isolamento de endofíticos foi possível afirmar que a primeira é muito mais eficaz na recuperação de leveduras endofíticas, pelo menos para as amostras de gramíneas, alface e abacaxi. Para as outras plantas testadas (limão, café e mandioca), a presença de compostos antimicrobianos nas folhas pode ter influenciado na detecção de leveduras endofíticas, conforme discutido na seção três deste capítulo.

Um aspecto do protocolo utilizado é a liquefação da folha para a liberação das leveduras endofíticas do interior do tecido vegetal. Em trabalhos com bactérias

endofíticas, técnicas de trituração vem sendo utilizadas com essa finalidade e houve sucesso na recuperação de diferentes espécies a partir de amostras de girassol, soja e arroz (FORCHETTI et al., 2007, KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005; STOLTZFUS et al., 1997). A diferença pode ser notada, por exemplo, no trabalho de LARRAN et al. (2002), que teve como objetivo isolar bactérias e fungos endofíticos de trigo (*Triticum aestivum*). O tecido vegetal não foi macerado e, com isso, só foi possível obter 3 isolados de bactérias e 190 isolados de fungos filamentosos.

Porém, usar apenas a técnica de trituração não parece ser vantajoso na detecção de leveduras endofíticas. LANDELL, MAUTONE, e VALENTE (2006) utilizaram essa técnica para recuperar leveduras endofíticas em onze espécies de plantas da família Bromeliaceae. Esses autores só conseguiram isolar quatro espécies de leveduras, em duas espécies de bromélias. O insucesso na recuperação das leveduras endofíticas pode estar associado à grande interferência de fungos filamentosos tendo em vista a incubação em meio de cultivo sólido. Além disso, o tamanho do inóculo pode ter sido pequeno para recuperar as leveduras.

O ponto chave parece ser o tamanho dos fragmentos de tecido vegetal utilizados na recuperação. Na metodologia de GARCIA (2007), após a liquefação da amostra, algumas plantas se desintegram completamente e outras, de estrutura mais resistente como as bromélias, se reduzem a fragmentos muito pequenos. Com isso, a chance de liberar as leveduras do tecido vegetal é muito maior, se comparados com o uso de fragmentos maiores.

Recentemente, GAI e colaboradores (2009) isolaram *R. mucilaginosa*, *P. guilliermondii* e *C. flavescens* a partir de amostras de laranja (*Citrus sinensis*). A técnica de isolamento utilizada por esses pesquisadores pareceu ser mais eficaz que a técnica comumente utilizada, tendo em vista que eles cortaram o tecido vegetal em fragmentos menores (4-6 mm), o que aparentemente facilitou o isolamento de leveduras endofíticas. A vantagem destes pequenos fragmentos é que as leveduras podem acessar o meio de cultivo porém o tecido vegetal não é fragmentado suficiente para colocar os microrganismos com compostos tóxicos produzidos por algumas espécies de plantas.

Outros fatores parecem influenciar a recuperação de leveduras endofíticas: a presença de compostos antimicrobianos nas plantas escolhidas e a composição dos meios de enriquecimento utilizados. Esses assuntos serão discutidos nas seções seguintes.

3. Presença de compostos antimicrobianos nas plantas inibindo a detecção de leveduras endofíticas

As propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos pelas plantas como uma consequência do metabolismo secundário são reconhecidas empiricamente há séculos e foram comprovadas cientificamente apenas recentemente (DUARTE, 2006). CARVALHO (2007) verificou o efeito de ácidos orgânicos tais como o ácido tânico e o ácido benzóico no crescimento de leveduras. Dentre as plantas selecionadas para o presente estudo, a mandioca, o café e o limão produzem compostos com atividade antimicrobiana.

Em todas as partes da mandioca é possível detectar o ácido cianídrico, uma substância tóxica e potente inibidora da atividade de enzimas da cadeia respiratória. Nas folhas é que esta molécula está em concentrações mais elevadas (MELO, 2005) e a presença desta substância pode inibir a presença de leveduras endofíticas.

O café produz compostos fenólicos tais como o ácido clorogênico, o ácido cafeico e ácido protocatéico bem compostos nitrogenados tais como a cafeína e a trigonelina. A atividade antimicrobiana desses compostos já foi verificada sobre diversas bactérias (ALMEIDA, 2007; ANTONIO et al., 2010). Além disso, extratos de plantas da família Rubiaceae, são capazes de inibir o crescimento de diversas leveduras de importância clínica tais como *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans* (SCORZONI et al., 2007). VEGA e colaboradores (2010), ao avaliar a comunidade de fungos endofíticos usando amostras de *C. arabica* coletadas na Colômbia, Havaí, México e Porto Rico, detectaram estirpes de leveduras endofíticas do gênero *Sporobolomyces* em amostras de pedúnculo, coroa e do fruto de *C. arabica*. Porém, nenhuma levedura endofítica foi detectada em amostras de folha e esse fato pode estar relacionado à presença das substâncias citadas anteriormente.

VIUDA-MARTOS e colaboradores (2008) verificaram que os óleos essenciais de limão possuem compostos antimicrobianos tais como D-limoneno, linalool, citral e compostos fenólicos e que essas moléculas podem reduzir em até 100% o crescimento de fungos filamentosos como *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium chrysogenum*. KUNICKA-STYCZYN'SKA, SIKORA e KALEMBA (2009) verificaram a atividade antimicrobiana dessa planta contra *Candida* sp. e TAMPIERI e colaboradores (2005) mostraram esta atividade contra *C. albicans*. CONTE e colaboradores (2007) mostraram que o efeito antimicrobiano do limão, tanto

para células vegetativas quanto para esporos. A inibição de leveduras como *S. cerevisiae* e *Pichia subpelliculosa* foi verificada mesmo em baixas concentrações do extrato. Já *Candida lusitanae* (anamorfo de *Clavispora lusitanae*) foi capaz de resistir a concentrações superiores a 100 ppm, mostrando que a resistência aos compostos antimicrobianos varia entre as diferentes espécies.

Com isso, se a planta de escolha para o isolamento de leveduras endofíticas possuir compostos antimicrobianos em suas folhas, a etapa de liquefação de uma grande amostra do tecido vegetal pode não ser vantajosa. Essa etapa pode expor a comunidade de leveduras a altas concentrações desses compostos, tendo em vista que estes são liberados do interior das folhas. FLEET (1999) sugere que a trituração de tecidos vegetais (para análise microbiológica de alimentos ou estudo de endofíticos, por exemplo) pode não ser um procedimento inócua. Para este tipo de amostra, sugere-se o método por GAI e colaboradores (2009), que corta fragmentos muito pequenos do tecido vegetal estéril e coloca sobre a superfície de meio sólido. Com esse método, este grupo de pesquisas conseguiu detectar diversas espécies de leveduras endofíticas em laranjas, planta da família *Citrus*. A laranja também possui compostos antimicrobianos em suas folhas tais como os terpenos (D-limoneno, linalol, citral) e compostos fenólicos, os mesmos compostos presentes no limão (VIUDA-MARTOS et al., 2008). Porém, com esse método, GAI e colaboradores isolaram diversas leveduras endofíticas a partir de amostras de folhas de *Citrus* tendo em vista que a comunidade de leveduras não foi diretamente exposta a altas concentrações das substâncias tóxicas.

A partir dos dados obtidos neste trabalho e outros trabalhos com amostras contendo compostos antimicrobianos (GAI et al., 2009; ABDEL-MOTTAL et al., 2009; STRINGINI et al., 2008), detectaram-se principalmente espécies encapsuladas tais como *R. mucilaginosa*, *C. flavescens*, *C. nemorosus*, *P. aphidis*, *Pseudozyma* spp. A presença de cápsula polissacarídica parece ser um fator de resistência para tais compostos.

4. Utilização de diversos meios de enriquecimento para detecção de leveduras endofíticas

A utilização de variadas composições de meio de cultivo foi importante na detecção da diversidade de leveduras endofíticas (tabela 9). Mesmo no caso dos meios

de enriquecimento BIL XL e BIL XLO, que possuíam composição idêntica, somente o fato de mudar a aeração fez com que fosse captada uma maior diversidade, possivelmente por favorecer o crescimento de diferentes espécies. Algumas espécies só foram detectadas no meio BIL XLO (*Cryptococcus aff. flavus*, *H. luteola* ?, *S. pararoseus* e *Pseudozyma aff. fusiformata*) e outras apenas em BIL XL (*C. rugosa* ?, *C. flavus* ?, *C. perniciosus*, *C. rajasthanensis*, *P. aphidis*, *Pseudozyma aff. profilica*, *Pseudozyma sp* ?, *Trichosporon caseorum* ?, *T. dulcimum* ?, *Eballistra aff. oryzae*). Os meios de cultivo contendo xilose e lactose como fonte de carbono favoreceram o isolamento de basidiomicetos, em especial as espécies de *Cryptococcus*. Isso pode ser explicado, pois muitos basidiomicetos utilizam a xilose como fonte de carbono, sendo que alguns deles crescem melhor nesse açúcar que em glicose (WALKER, 1998). Além disso, muitos ascomicetos não utilizam a xilose. O mesmo vale para a lactose, utilizada por muitos basidiomicetos, mas pouco utilizada por espécies de ascomicetos (KURTZMAN e FELL, 1998; CARVALHO, 2007).

A partir do meio de enriquecimento BIL XL foi possível isolar a maioria das espécies de leveduras endofíticas em amostras de abacaxi, milho e cana de açúcar. Esse meio de cultivo permitiu o isolamento de leveduras endofíticas em todas as plantas testadas, exceto mandioca. O crescimento de fungos filamentosos na superfície desse meio foi menor do que aquele detectado nos meios contendo glicose como fonte de carbono, por isso recomendamos seu uso na detecção de leveduras associadas a plantas ou quaisquer amostras com altas concentrações de fungos filamentosos.

A partir do meio de enriquecimento BIL E só foi possível isolar leveduras endofíticas de milho e de abacaxi. Mesmo assim, esse meio de cultivo permitiu o isolamento de possíveis espécies novas de ascomicetos. Esse meio de cultivo é uma boa opção no isolamento de ascomicetos tendo em vista que a concentração de etanol utilizada inibe o crescimento de basidiomicetos, que parecem ser maioria nos tecidos vegetais. Além disso, o meio BIL E inibe o crescimento de fungos filamentosos. Porém, como muitas espécies de leveduras ascomicéticas não toleram concentrações tão elevadas de etanol, sugere-se uma possível adaptação na composição do meio de cultivo: reduzir a concentração do etanol para cerca de 2-4%. Possivelmente, essa concentração permitiria a captação de muitas espécies de ascomicetos, mas inibiria os basidiomicetos e os fungos filamentosos.

Os métodos de enriquecimento BIL G e BIL B possuem meio de cultivo com composições idênticas, com glicose como fonte de carbono, porém o volume de

inoculo, o volume de meio de cultivo e o formato de vidraria utilizada foram diferentes. BIL B possui uma grande área de contato entre o meio de cultivo e o oxigênio favoreceu o desenvolvimento de uma espessa capa de fungos filamentosos. Ao tentar isolar leveduras desses microcosmos, as placas contendo meio de cultivo eram rapidamente tomadas pelo crescimento de fungos filamentosos. Com isso, a partir do meio de enriquecimento BIL B, só foi possível isolar poucas espécies de leveduras a partir de amostras de abacaxi, milho, alface e mandioca. Somente a partir desse meio foi possível isolar *F. inconspicuum*. BIL B poderia ter rendido melhores resultados se fossem utilizados tubos profundos e com menor diâmetro, tendo em vista a maior facilidade para retirar a camada superficial de fungos filamentosos. Dessa forma, o crescimento de leveduras no fundo do enriquecimento, com reduzidos teores de oxigênio, seria favorecido.

A partir do meio de enriquecimento BIL G foi possível isolar diversas espécies das amostras de abacaxi, milho, cana, alface e café. Somente a partir desse meio foi possível isolar *B. sinensis* e *P. hubeiensis*. Apesar de ter apresentado bons resultados, o meio BIL Y, de composição similar, parece mais promissor para estudos futuros.

O meio de cultivo BIL Y possui a mesma composição de BIL G, exceto pela concentração de extrato de levedura, que era cinco vezes maior (0,1% para 0,5%). Essa fonte de aminoácidos fornece tanto o carbono necessário como a fonte de nitrogênio, favorecendo o crescimento de ascomicetos tendo em vista que esses organismos normalmente não são proteolíticos e crescem rapidamente em meios contendo fontes de nitrogênio orgânicas. Com isso, BIL Y permitiu a detecção do clado *Debaryomyces* e do grupo *C. intermedia*. Esse meio foi útil na detecção de leveduras de amostras de arroz e de alface. Vale destacar que, somente a partir desse meio foram isoladas *C. famata* ?, *C. sorbosa* ?, *C. podzolicus* ?, *Tremella aff. globispora* e *Rhodotorula aff. mucilaginoso*.

Com base nos resultados obtidos, é possível destacar o uso do meio de cultivo BIL XL para detecção de leveduras com afinidade basidiomicética, em especial as do gênero *Cryptococcus* e gêneros relacionados e o meio BIL Y para a detecção de leveduras de afinidade ascomicética. Uma sugestão para trabalhos futuros é a aplicação desses dois meios de cultivo e um número maior de amostras das plantas escolhidas. Outra estratégia pode ser o uso desses meios de enriquecimento combinado ao uso de meios de cultivo sólidos, com pequenos fragmentos da amostra de folhas estéreis (2-4mm de largura no máximo). Esta segunda opção pode ser muito útil na detecção de

leveduras endofíticas que contenham em amostras com compostos antimicrobianos, como é o caso das plantas medicinais.

Estudos realizados pelo nosso grupo já comprovaram que a técnica de enriquecimento é capaz de recuperar uma maior diversidade de espécies de leveduras quando comparada à técnica de espalhamento em placa (GARCIA, 2007; CARVALHO, 2007; FERNANDES, 2006; PINOTTI, 2003; ROCHA Jr., 2003). Isto ocorre devido à utilização de um inóculo maior e da menor interferência de fungos filamentosos. Além disso, a utilização de diferentes composições de meios é importante para a obtenção de diferentes espécies pela eliminação de espécies competidoras em algumas culturas. As leveduras são facilmente cultivadas em diversos meios de cultivo, porém, em culturas mistas, a competição se torna um importante fator que pode restringir a detecção de algumas espécies. Os meios de cultivo tradicionalmente utilizados, ricos em nutrientes, são condições artificiais criadas em laboratório e favorecem as espécies que crescem rapidamente. Com isso, é possível perder diversas espécies que são prevalentes em seus habitats naturais, mas não o são em meios de cultivo ricos em nutrientes pouco seletivos.

A inoculação em diversos meios de enriquecimento seguido de incubação durante várias semanas pode levar ao isolamento de espécies redundantes como, por exemplo, a detecção de diversos isolados de *C. pseudointermedia* em amostras de milho. Porém, deve-se considerar que diversas espécies foram isoladas apenas uma vez, portanto cada meio de cultivo possui o potencial de detectar uma ou mais populações raras. SILVA (2003) obteve resultados similares tendo em vista que 75% do número total de espécies foi isolado apenas uma vez ou ocorreram com baixa frequência. Esses dados mostram que, assim como as leveduras colonizadoras do filoplano, as comunidades de leveduras endofíticas são compostas por algumas espécies prevalentes, mais ou menos ubíquas, e muitas outras espécies isoladas em menor frequência.

Outro ponto positivo na detecção de isolados de uma mesma espécie é a detecção de características que são estirpe específica. Isso é importante em “screenings” que buscam a produção de alguma atividade específica, como a produção de enzimas, toxinas “killer” etc. Como exemplo, neste trabalho, cinco isolados de *A. pullulans* vieram da amostra 6 de abacaxi: apesar de terem vindo do mesmo meio de cultivo (BIL XL) e mesma amostra, somente dois foram capazes de produzir queratinases. O mesmo pode ser visto para *C. flavescens* isolados da amostra 5 de milho: apesar de terem sido isolados de BIL XL, o isolado 2MI5XL-XL foi capaz de produzir queratinases e o

isolado 4MI5XL-XL não. A produção do fenótipo “killer” também foi estirpe específica pois dentre os isolados de *P. fusiformata* (ARIXLO e 1ARIXLO-XL), vindos da mesma amostra e meio de cultivo, somente um foi capaz de produzir toxinas “killer”. Dentre os cinco isolados de *C. guilliermondii* da amostra 6 de alface, somente 1 foi capaz de produzir toxinas “killer”. No caso das toxinas “killer”, o fenótipo pode ser codificado por um plasmídeo, o que explica a produção ser estirpe específica (SCHMITT e BREINIG, 2006).

5. Detecção de atividade “killer” em leveduras endofíticas

A produção de toxinas é um caso claro de competição por interferência, um tipo de interação ecológica que envolve a supressão direta da população rival por meios outros que não a exaustão dos recursos comuns. A eliminação dos competidores significa tanto provocar a morte ou reduzir o “fitness” de estirpes sensíveis por meio do bloqueio de uma ou algumas reações bioquímicas vitais de suas vias metabólicas ou por fazer lesões na membrana celular (CZÁRÁN e HOEKSTRA, 2003; SCHMITT e BREINING, 2006). Esse fenômeno ocorre principalmente em condições de escassez de nutrientes. CZÁRÁN e HOESKSTRA (2003) sugerem que a co-existência de estirpes “killer”, sensíveis e resistentes pode ser explicada pela distribuição destas leveduras em metapopulações. Neste caso, o fenótipo “killer” poderia ser visto como um fenômeno restrito a habitats temporários, o que parece ser a situação das leveduras endofíticas (GARCIA, 2007).

Estudos de McCORMACK, WILDMAN e JEFFRIES (1994) mostraram que a capacidade de produzir substâncias antimicrobianas é muito comum em espécies de leveduras que habitam o filoplano tais como *A. pullulans*, *S. roseus*, *R. glutinis* e *C. phylloplanus*. Contudo, na literatura consultada, não foi possível detectar nenhum relato sobre a presença do fenótipo “killer” em leveduras endofíticas. Esse é um fato curioso tendo em vista que esse fenótipo é comum em leveduras que habitam o filoplano. No presente trabalho, essa atividade foi detectada em 11 espécies de leveduras endofíticas. Essa atividade foi detectada nas plantas com as maiores taxas de colonização por leveduras endofíticas: milho, arroz, abacaxi, alface.

A atividade antimicrobiana em *P. fusiformata* já havia sido descrita por GOLUBEV, KULAKOVSKAYA e GOLUBEVA (2001), porém o metabólito responsável por essa atividade não possui natureza protéica e sim glicolípídica. Esse

metabólito foi ativo contra mais de 80% das 280 leveduras alvo testadas. No presente trabalho, *P. fusiformata* (AR1XLO) foi capaz de eliminar cinco leveduras alvo testadas. Além disso, da amostra que essa levedura foi isolada (arroz 1), só foi possível isolar *C. sorbosa*?, levedura que também possui fenótipo “killer”. Essas espécies podem ter eliminado as outras populações de leveduras presentes nas amostras, sensíveis à ação das toxinas “killer”.

Diversas espécies do gênero *Cryptococcus* possuem o fenótipo “killer” (GOLUBEV, 2006). A produção dessas toxinas por *C. flavus* foi descrita por BUZZINI e MARTINI (2000), após a realização de um “screening” com leveduras isoladas de diversos habitats de florestas tropicais no Brasil.

MORAIS e colaboradores (1997) descreveram atividade “killer” em *C. sake* isolada de cachaçarias. Além disso, já houve relatos mencionando a atividade antimicrobiana que essa levedura exerce frente à fitopatógenos de maçãs e peras tais como *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus nigricans* (NUNES et al., 2005; VIÑAS et al., 1998). No presente trabalho, *C. sake* foi capaz de eliminar *C. glabrata* e *R. mucilaginosa*. As toxinas “killer” podem ser o mecanismo de atividade antimicrobiana frente aos fungos fitopatogênicos.

A atividade “killer” de estirpes de *A. pullulans* já havia sido anteriormente detectada por WANG e colaboradores (2008) que testaram leveduras de ambientes marinhos (água, sedimentos, algas, vísceras etc.). Essa espécie foi capaz de eliminar *Metchinikowia bicuspidata*, uma espécie patogênica para o caranguejo *Portunus trituberculatus*. No presente trabalho, essa espécie eliminou *R. mucilaginosa* e *M. lunata*.

HODGSON, BUTTON e WALKER (1995) mostraram a atividade da toxina de *L. mrakii* contra espécies de *Candida* de origem clínica e sugerem seu potencial como agente anti micótico. No presente trabalho, *C. sorbosa* (1AR1Yb) foi capaz de eliminar *R. mucilaginosa*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. *C. guillermondii* (2AL6Yb) foi capaz de eliminar *R. mucilaginosa*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *M. lunata*. Essas culturas são particularmente interessantes tendo em vista que eliminam microrganismos oportunistas. A atividade “killer” nessas espécies já havia sido descrita anteriormente (ABRANCHES et al., 1997; POLONELLI e MORACE, 1986).

Uma condição para a bioprospecção da atividade micocinogênica é a utilização de uma estirpe sensível durante os testes, entretanto, o número limitado de estirpes que vêm sendo utilizado para este fim, podem mascarar o número real de leveduras capazes

de inibir ou matar outras leveduras (CABRAL, 2009). FUENTEFRIA (2007) testou 595 isolados de leveduras quanto à presença do fenótipo “killer” e verificou que 48 (8%) deles eram capazes de produzir toxinas “killer”. Assim como indicado por CABRAL (2009), FUENTEFRIA atribui o baixo percentual ao uso de apenas duas estirpes sensíveis (*C. glabrata* e *C. neoformans*).

O número de estirpes com atividade “killer” no presente trabalho pode ser inferior ao número real de estirpes que possuem esse fenótipo. Isso porque, apesar da utilização de diversas estirpes sensíveis, não foram testadas variações nos meios de cultivo como a adição de cloreto de sódio, ou variações na faixa de pH utilizada.

A presença de microrganismos com atividade antimicrobiana, tais como as leveduras com fenótipo “killer”, pode ser bastante importante para o desenvolvimento de plantas em locais aonde não é realizada a aplicação de fungicidas, como é o caso da Fazendinha - EMBRAPA. Essa atividade pode proteger as plantas contra fitopatógenos como verificado por CABRAL e colaboradores (2009) que mostra a atividade de leveduras “killer” frente à *Moniliophthora perniciosa*, o agente causador da Vassoura-de-bruxa. As estirpes de leveduras endofíticas, isoladas no presente trabalho, que inibiram diferentes espécies de leveduras podem apresentar bons resultados na inibição de fungos fitopatogênicos. Além disso, somente a capacidade que os microrganismos endofíticos têm de colonizar os tecidos vegetais pode ser importante, tendo em vista que estes podem competir por espaço e nutrientes com os patógenos que penetrem no interior do tecido vegetal.

6. Detecção de atividade queratinolítica em leveduras endofíticas

A produção de proteases extracelulares é uma característica comum em leveduras basidiomicéticas isoladas em diversos habitats (ABRANCHES et al., 1997). “Screenings” para detecção de organismos proteolíticos mostraram essa característica em leveduras do gênero *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Endomycoopsis*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Yarrowia* (ABRANCHES et al., 1997). Apesar disso, na literatura consultada, não houve detecção de atividade queratinolítica em leveduras endofíticas. No presente trabalho, oito espécies apresentaram atividade queratinolítica. CARVALHO (2007) já havia detectado atividade queratinolítica em leveduras do gênero *Trichosporon* (*T. multisporum*, *T. coremiiforme*, *Trichosporon* sp.), *Candida* (*C.*

famata – like, *C. palmiophila*) e em *Geotrichum candidum*. Essas leveduras foram isoladas de solo de Mata Atlântica e de solo de um galinheiro doméstico enriquecidos com substratos ricos em queratina tais como unha, pelo e pena.

SILVA (2003) testou a habilidade de leveduras do filoplano em produzir enzimas extracelulares, dentre elas proteases, a partir de testes de degradação de caseína e gelatina. Diversas espécies de *Cryptococcus* foram descritas como proteolíticas, bem como espécies de *Pseudozyma* coincidindo com os dados de espécies endofíticas queratinolíticas detectadas no presente trabalho. Porém, SILVA não detectou atividade proteolítica para ascomicetos. DUARTE (2009) ao estudar queratinases de *C. parapsilosis* detectou uma enzima com peso molecular na faixa dos 100 kDa, resultado similar aquele detectado no presente este estudo com leveduras endofíticas.

Moléculas complexas, como queratinas, quitina, celulose e lignina que chegam ao solo com restos de plantas e carcaças de animais. Todas essas moléculas, ainda que resistentes à degradação, de fato não acumulam na natureza. Isso torna o solo um importante reservatório de microrganismos capazes de degradar moléculas complexas, dentre os quais se incluem os queratinolíticos (ABDEL-FATTAH, MOUBASHER, MAGHAZY, 1982). A queratina não está presente nos tecidos vegetais, de onde se poderia concluir que estes ambientes não seriam propícios à seleção de leveduras queratinolíticas. Entretanto, conforme já discutido anteriormente, as leveduras endofíticas colonizam os tecidos vegetais a partir de diversos substratos dentre os quais o solo onde estão fixadas as raízes das plantas. Desta forma, estirpes de leveduras queratinolíticas do solo podem ter penetrado no interior do vegetal através das raízes, alcançando as folhas das plantas.

As queratinases estão associadas a mecanismos de patogenicidade. Leveduras queratinolíticas são espécies com habilidade de invadir pele e mucosas podendo atingir inclusive os órgãos internos. Isso ocorre em casos de candidíase sistêmica, causada por *C. albicans* (TSUOBI et al., 1985). Outros estudos mostraram leveduras queratinolíticas associadas a casos de onicomicose, tais como *C. parapsilosis* e *R. mucilaginosa* (CUNHA et al., 2009; VERMELHO et al., 2010). Porém, vale ressaltar que, no presente trabalho, as espécies com atividade queratinolítica não são espécies patogênicas, o que pode ser importante para possíveis aplicações biotecnológicas.

Onze de 226 estirpes isoladas apresentaram atividade queratinolítica, o que seria uma proporção baixa, de aproximadamente 5%. Contudo, é curioso notar que essas estirpes são das espécies prevalentes, incluindo *C. intermedia*, um ascomiceto que

normalmente não é proteolítico. Com isso, a atividade proteolítica em leveduras endofíticas pode ter sido subestimada. Uma sugestão para recuperação de um maior número de isolados com essas características é a utilização de um meio de cultivo específico para esse fim. O meio BIL adicionado queratina extraída de penas de galinha poderia ser uma boa opção.

7. Detecção de espécies novas associadas a plantas

Neste trabalho foram isoladas diversas espécies que não apresentaram similaridade superior a 99% com a sequência de D1/D2 de rDNA de nenhuma espécie conhecida. Isso sugere a presença de espécies novas de ascomicetos como *Candida aff. sorbophila* em cana de açúcar, *Candida aff. leandrae* em milho e *Aureobasidium aff. pullulans* em abacaxi. Esse fato foi ainda mais frequente dentre os basidiomicetos: *Pseudozyma aff. fusiformata* em arroz, *Pseudozyma aff. profilica* em cana, *Pseudozyma* sp. em café, *Rhodotorula aff. mucilaginoso* em abacaxi e cana dentre outras. O seqüenciamento da região D1/D2 de rDNA nem sempre é eficaz na separação de espécies de leveduras basidiomicéticas. Com isso, o seqüenciamento de outras regiões do rDNA (tais como a região ITS e a subunidade menor – SSU) poderia ter revelado uma diversidade ainda maior (SCORZETTI et al., 2002).

Diversos estudos sobre a diversidade de leveduras associadas a plantas vêm revelando a presença de muitas espécies novas. SILVA (2003), ao estudar leveduras associadas a plantas ecossistemas do tipo mediterrâneo, verificou que cerca de metade das espécies detectadas não correspondia a nenhuma espécie já descrita. LANDELL (2009) mostrou resultados muito semelhantes ao estudar leveduras associadas a bromélias; cerca de 60% dos isolados não correspondem a espécies já descritas. Nesses dois trabalhos, mais de 90% dos isolados são leveduras de afinidade basidiomicética. ABDEL-MOTAAL e colaboradores (2009) descreveram quatro novas espécies de leveduras endofíticas do gênero *Pseudozyma*, isoladas da planta medicinal egípcia *Hyoscyamus muticus* L.

Nosso grupo de pesquisas também tem observado a presença de espécies novas associadas a plantas. RIBEIRO (2009), ao estudar a diversidade de leveduras associadas à cana de açúcar, detectou novas de ascomicetos (*Pichia aff. fermentans*, *Candida aff. colliculosa*, *Candida aff. tsuchiyaе*, *Candida aff. azyma*, *Candida aff. drosophilae*) e de basidiomicetos (*Rhodospiridium aff. paludigenum*, *Pseudozyma aff. prunii*,

Rhodotorula aff. marina, *Cryptococcus aff. laurentii*, *Cryptococcus aff. luteolus*, *Cryptococcus aff. gilvescens*). GARCIA (2007), no seu estudo sobre bromélias associadas à bromélia *Neoregelia cruenta*, também verificou diversas estirpes que não puderam ser identificadas pela taxonomia convencional.

Principalmente na última década, o uso cada vez mais disseminado de técnicas de biologia molecular tais como o seqüenciamento de regiões do DNA ribossomal permitiu a detecção de muitas espécies novas, especialmente de basidiomicetos. Muitas características fisiológicas desses organismos são variáveis, tornando difícil a identificação usando a taxonomia convencional (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1979). Diversas espécies com características fenotípicas muito similares puderam ser separadas após estudos de filogenia molecular. Esse fato pode ser exemplificado com a descrição de gêneros novos tais como *Dexomyces* e *Hannaella*, que antes estavam dentro do gênero *Cryptococcus* (WANG e BAI, 2008). As espécies desses gêneros foram isoladas de plantas ou outras amostras de tecido vegetal.

Em ecossistemas tropicais ainda existem muitos biomas pouco estudados quanto à sua diversidade microbiana. No Brasil, por exemplo, é possível citar plantas da Caatinga, Cerrado e floresta Amazônica. Com isso, o estudo de plantas desses ambientes aliado ao uso de técnicas de biologia molecular é o caminho para descobrir a vasta biodiversidade ainda desconhecida. Nossos dados evidenciam que o conhecimento da diversidade de leveduras associadas a plantas de habitats tropicais ainda é pequeno.

8. Considerações finais:

Um dos principais argumentos para a preservação da biodiversidade é o fato de que espécies desconhecidas podem fornecer produtos/atividades que sejam importantes para a humanidade. No caso de endofíticos, apesar de haver muita diversidade ainda desconhecida, levando em consideração que cada planta abriga uma ou mais espécies de endofíticos, relativamente poucas espécies tem sido descobertas. Conseqüentemente, endofíticos são uma potencial fonte de produtos para agricultura, indústria e medicina (SMITH, et al., 2008).

O uso de adaptações nas metodologias de isolamento parece ser um bom caminho para, não apenas conhecer a biodiversidade, mas também para poder explorá-la em processos biotecnológicos. Nesse trabalho, algumas estratégias foram bem sucedidas

na detecção de leveduras endofíticas, principalmente em gramíneas, alface e bromélia. Para a detecção destes microrganismos, que parecem estar em populações menos numerosas que no filoplano, o uso de meios de enriquecimentos parece ser mais adequado que a metodologia de isolamento de endofíticos tradicionalmente usada. O meio BIL Y permitiu a detecção de ascomicetos, que não são freqüentemente detectados na superfície nem no interior das folhas. Sua composição com glicose e extrato de levedura favoreceu a proliferação deste tipo de levedura.

O meio BIL XL, contendo xilose e lactose como fonte de carbono e baixa concentração de extrato de levedura, favoreceu a recuperação de basidiomicetos, que são maioria nesses habitats. A etapa de trituração da amostra pareceu adequada tendo em vista que liberou as leveduras presentes no tecido vegetal para entrar em contato com o meio de enriquecimento. Nesses meios, diversas populações puderam proliferar até alcançar um nível de detecção na etapa de plaqueamento. Essa etapa só não parece ser vantajosa para amostra contendo compostos antimicrobianos. Para este tipo de amostra pode ser mais adequado utilizar fragmentos muito pequenos do tecido vegetal estéril sobre meios de cultura sólidos; ou ainda em meios de enriquecimento líquidos que permitiriam o uso de um inóculo maior. Isto permitiria que leveduras do interior da folha tivessem maiores chances de estar numa região na borda do tecido alcançando os nutrientes do meio de cultivo. Além disso, permitiria que não houvesse liberação de compostos tóxicos da folha em grandes quantidades.

O uso de meios de enriquecimento em tubos permitiu que apenas uma pequena parte do meio de cultivo entrasse em contato com o ar. Como muitos fungos filamentosos crescem apenas como uma película na interface entre o ar e o meio de cultivo, estes foram facilmente removidos facilitando a recuperação de leveduras. O uso de etanol também parece ser vantajoso na recuperação de ascomicetos em tecidos vegetais; essa substância inibe o desenvolvimento de fungos filamentosos e também as leveduras basidiomicéticas, permitindo a proliferação de algumas espécies de ascomicetos.

Nesse trabalho, além de *Candida* sp. 1, escolhida para ser descrita como espécie nova, diversas estirpes tiveram menos de 99% de similaridade com seqüências de culturas tipo de espécies descritas, sugerindo a presença de outras possíveis espécies novas. Esse fato ocorreu principalmente dentro da classe dos Basidiomicetos, nos gêneros *Pseudozyma*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*. Esses dados, associados a diversos dados sobre espécies novas de leveduras isoladas de plantas, sugerem que a diversidade

de leveduras associadas a folhas é muito maior do que o que já foi detectado e relatado na literatura científica. Isso estimula novas pesquisas nessa área tanto no que tange a investigação de diversas espécies vegetais quanto ao desenvolvimento e aplicação de novas metodologias para isolamento das leveduras.

CONCLUSÕES

- ❖ Foram encontradas leveduras endofíticas em folhas de milho, cana de açúcar, arroz, abacaxi, alface, limão, café e mandioca cultivados no sistema de agricultura orgânica do SIPA da Embrapa Agrobiologia.
- ❖ A utilização da metodologia descrita por GARCIA (2007), com processamento das folhas e utilização de grandes volumes de inoculo e meios de enriquecimento, foi mais eficaz na recuperação de leveduras endofíticas que a metodologia tradicional de isolamento de microrganismos endofíticos. Esse método mostrou resultados promissores para amostras de gramíneas, alface e abacaxi.
- ❖ As amostras de folhas de café, mandioca e limão apresentaram baixos níveis de colonização por leveduras endofíticas.
- ❖ A utilização de diversos meios de enriquecimento, apesar de levar ao isolamento de espécies redundantes em uma amostra, foi importante para captar a maior diversidade de leveduras endofíticas em amostras de gramíneas, alface e abacaxi.
- ❖ Os meios BIL Y e BIL XL foram eficientes para detecção de basidiomicetos e ascomicetos respectivamente.
- ❖ A maioria das leveduras isoladas possui afinidade basidiomicética, principalmente dos gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula*, que também são os gêneros mais detectados no filoplano. É possível destacar também a presença do gênero *Pseudozyma*. Também foi possível detectar diversos gêneros de leveduras ascomicéticas, principalmente aquelas com amplo perfil assimilativo, do clado *Debaryomyces*, do clado *Metschnikowia* e leveduras similares a *C. intermedia*.
- ❖ A presença de diversas culturas que não puderam ser identificadas, mesmo após o seqüenciamento da região D1/D2, mostra que o estudo de leveduras associadas a plantas é um campo promissor na detecção de espécies novas.
- ❖ Foi possível detectar leveduras “killer” e leveduras queratinolíticas a partir de amostras do interior dos tecidos vegetais estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-FATTAH, H.M.; MOUBASHER, A. A.; MAGHAZY, S.M., 1982. Keratinolytic fungi in Egyptian soils. *Microbiology and Immunology*, **26** (3), pp. 177-180.
2. ABDEL-MOTAAL, F.F.; EL-ZAYAT, S.A.; KOSAKA, Y.; EL-SAYED, M.A.; NASSAR, M.S.M.; SHIN-ICHI, I., 2009. Four novel Ustilaginomycetous anamorphic yeast species isolated as endophytes from the medicinal plant *Hyoscyamus muticus*. *Asian Journal of Plant Sciences*, **8**, pp. 526-535.
3. ABE, S.; SATO, Y.; INOUE, S.; ISHIBASHI, H.; MARUYAMA, N.; TAKIZAWA, T.; OSHIMA, H.; YAMAGUCHI, H., 2003. Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, **44**(4), pp. 285-91.
4. ABRANCHES, J.; MORAIS, P. B.; ROSA, C. A., MENDONÇA-HAGLER, L.C.; HAGLER, A.N., 1997. The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**, pp. 328-336.
5. ABRANCHES, J.; VALENTE, P.; NÓBREGA, H. N.; FERNANDEZ, F.A.S.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; HAGLER, A.N., 1998. Yeast diversity and killer activity dispersed in fecal pellets from marsupials and rodents in a Brazilian tropical habitat mosaic. *FEMS Microbiology Ecology*, **26**, pp. 27- 33, 1998.
6. ABRANCHES, J.; VITAL, M. J. S.; STARMER, W. T.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. ; HAGLER, A. N., 2000. The yeast community and mycocin producers of guava fruit in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycologia*, **92** (1), pp. 16-22.
7. ABRANCHES, J.; STARMER, W. T.; HAGLER, A. N., 2001. Yeast-yeast interaction in guava and tomato fruit. *Microbial Ecology*, **42**, pp. 186-192.
8. AGRICOM, 2004. The Endophyte Story. Disponível em: <http://www.agricom.co.nz/documents/Endophyte%20story.pdf>. Consultado em 2 de abril de 2009.
9. ALMEIDA, A. A. P., 2007. Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café: Avaliação in vitro e em modelo alimentar. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.
10. ALMEIDA, M.; ROCHELLE, L. A.; CROCOMO, O.J., 1995. Chave analítica para determinação de dez variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). *Scientia Agricola*, **52** (1), pp. 16-19.
11. AMBROZIN, A. R. P., 2004. Estudo fitoquímico de plantas das famílias Rutaceae e Meliaceae visando o isolamento de substâncias protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos e antileishmanioses. Tese de doutorado

apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos.

12. ANDRADE Jr., A. S.; KLAR, A. E., 1997. Manejo da irrigação da cultura da alface (*Lactuca sativa* L.) através do tanque classe A. *Scientia Agricola*, **54** (1-2), pp. 31-38.
13. ANDRÉ, N.; MEILLE, C., 2006. Taxanes in pediatric oncology: and now? *Cancer Treatment Reviews*, **32**, pp.65-73.
14. ANDREWS, J. H.; HARRIS, R. F. 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Reviews of Phytopatology*, **38**, pp.145-180.
15. ANTONIO, A. G.; MORAES, R. S.; PERRONE, D.; MAIA, L. C.; SANTOS, K. R. N.; IÓRIO, N. L. P.; FARAH, A., 2010. Species, roasting degree and decaffeination influence the antibacterial activity of coffee against *Streptococcus mutans*. *Food Chemistry*, **118** (3), pp. 782-788.
16. ARAUJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAVA, P.T, 2002. Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. 1ª edição. ESALQ, Piracicaba, 86p.
17. AZEREDO, L. A. I.; GOMES, E. A.T.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N., 1998. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. *International Microbiology*, **1**, pp. 205-208.
18. AZEVEDO, J. L., 1998. Microrganismos endofíticos. *In: Melo, I. S. e Azevedo (Eds.). Ecologia Microbiana*. 1ª Ed., pp. 117-137.
19. AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR.; PEREIRA, J. O.; DE ARAÚJO, W. L., 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, **3** (1), pp. 40-65.
20. BACON, C. W. e HINTON, D. M, 1997. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. *In: Manual of environmental microbiology*. 1st ed. American Society for Microbiology.
21. BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; KIMURA, O.; DÖBEREINER, J., 1997. Bactérias fitopatogênicas fixadoras de N₂ em associação com plantas. *Embrapa-CNPAB, Seropédica*, 25p.
22. BALDO, M .N., 2007. Comportamento anatômico, fisiológico, e agonômico do milho (*Zea mays* L.) submetido a estresses de ambientes em diferentes estádios fenológicos. Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo.
23. BANERJEE, H.; VERMA, M., 2000. Search for a novel “killer” toxin in yeast *Pichia pastoris*. *Plasmid*, **43**, pp.181-183.

24. BARBOZA, S. B. S. C.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J. B.; PORTES, T. A.; SOUZA, L. A. C, 2006. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **41** (2), pp.185-194.
25. BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D., 1990. The Yeasts: Characteristics and Identification. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
26. BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D., 1993. Yeasts Identification PC Program, version 3. Cambridge University Press, Cambridge.
27. BAUER, R.; BEGEROW, D.; NAGLER, A.; OBERWINKLER, F., 2001. The georgefischeriales: a phylogenetic hypothesis. *Mycological Research*, **105**, pp. 416-424.
28. BRUNDRETT, M. C., 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, **154**, pp. 275-304.
29. BUZZINI, P.; CORAZZI, L.; TURCHETTI, B.; BURATTA, M.; MARTINI, A., 2004. Characterization of the in vitro antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, **238**, pp.359-365.
30. BUZZINI, P.; MARTINI, A., 2000. Biodiversity of killer activity in yeasts isolated from the Brazilian rain Forest. *Candian Journal of Microbiology*, **46** (7), pp. 607-611.
31. CABRAL, A. S., 2009. Ecologia de leveduras micocinogênicas e potencial de aplicação como agente de controle biológico. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
32. CAI, C. G.; LOU, B. G.; ZHENG, X. D, 2008. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Zhejiang University Science B*, **9** (1), pp. 60-67.
33. CAILLIEZ, J. C.; SÉGUY, N.; ALIOUAT, E. M.; POLONELLI, L.; CAMUS, D.; DEI-CAS, E., 1994. The yeast killer phenomenon: a hypothetical way to control *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Medical Hypotheses*, **43**, pp. 167-171.
34. CAMATTI-SARTORI, V.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. E.; PAGNOCCA, F. C.; ECHEVERRIGARAY, S.; AZEVEDO, J. L., 2005. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. *Journal of Basic Microbiology*, **45** (5), pp. 397-402.
35. CAO, L. X; YOU, J. L.; ZHOU, S. N., 2002. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **18**, pp. 169-171.

36. CARUSO, M.; COLOMBO, A. L.; FEDELI, L.; PAVESI, A.; QUARONI, S.; SARACCHI, M.; VENTRELLA, G., 2000. Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers. *Annals of Microbiology*, **50**, pp. 3-13.
37. CARVALHO, P. M. B., 2007. Utilização de meios de enriquecimento para a bioprospecção de leveduras. Tese de Doutorado Apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
38. CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE AGROBIOLOGIA – EMBRAPA, 2009. Disponível em <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/artigos/fazendinha.html>. Consultado em 31 de março de 2009.
39. CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL, 2008. Disponível em http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_centrosul/importancia.htm. Consultado em: 27 de setembro de 2008.
40. CNPMS, 2006. Disponível em <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/index.htm>. Consultado em 12 de junho de 2006.
41. COELHO, A. R.; HOFFMANN, F. L.; HIROOKA, E. Y., 2003. Biocontrol by yeasts: perspectives in application for fruits safety. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, **24** (2), pp. 337-358.
42. CONTE, A.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M.; DEL NOBILE, M. A., 2007. Effect of lemon extract on foodborne microorganisms. *Journal of Food Protection*, **70** (8), pp. 1896-1900.
43. CORRÊA, A. P. F., 2009. Purificação parcial e caracterização de uma protease alcalina queratinolítica de *Bacillus* sp. P7. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
44. CUNHA, M. M. L.; SANTOS, L. P. B.; DORNELAS-RIBEIRO, M.; VERMELHO, A. B.; ROZENTAL, S., 2009. Identification, antifungal susceptibility and scanning electron microscopy of a keratinolytic strain of *Rhodotorula mucilaginosa*: a primary causative agent of onychomycosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **55**, pp. 396-403.
45. CZÁRÁN, T. L.; HOEKSTRA, R. F., 2003. “Killer” sensitive coexistence in metapopulations of micro-organisms. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **270**, pp. 1373-1378.
46. D'AMICO, M.; FRISULLO, S.; CIRULLI, M., 2008. Endophytic fungi occurring in fennel, lettuce, chicory, and celery: commercial crops in southern Italy. *Mycological research*, **112** (1), pp. 100-107.
47. DA REPORT, M. E. Z., 2003. Lucro com as frutas de mesa pode elevar produção na região de Apucarana-PR. Disponível em: <http://www.zoonews.com.br/noticia.php?idnoticia=6381>. Consultado em 09 de abril de 2009.

48. DE-PAULA, V. S.; RAZZERA, G.; MEDEIROS, L.; MIYAMOTO, C. A.; ALMEIDA, M. S.; KURTENBACH, E.; ALMEIDA, F. C. L.; VALENTE, A. P., 2008. Evolutionary relationship between defensins in the Poaceae family strengthened by the characterization of new sugarcane defensins. *Plant Molecular Biology*, **68**, pp. 321-335.
49. DUARTE, M. C. T., 2006. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Multiciência*, **7**. Disponível online em: http://www.multiciencia.rei.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf
50. DUARTE, T. R., 2009. Produção de queratinases por estirpes mutagenizadas de *Candida parapsilosis*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
51. EMBRAPA a (linhas de ação, alimentos, café), 2006. Disponível em http://www.embrapa.br/linhas_de_acao/alimentos/cafe/index_html/mostra_documento. Consultado em 12 de junho de 2006.
52. EMBRAPA b, 2006. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Abacaxi/CultivodoAbacaxiRO/index.htm>. Consultado em 12 de junho de 2006.
53. FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*, **50**, pp. 1351-1371.
54. FERNANDES, A. B. P., 2006. Métodos de enriquecimento aplicados a caracterização das comunidades de leveduras da água de tanques de bromélias na Barra de Marica-RJ. Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
55. FERREIRA, E. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, A. A.; SANTOS, J. B.; VENTRELLA, M. C.; MARQUES, A. E.; PROCÓPIO, S. O., 2005. Composição química da cera epicuticular e caracterização da superfície foliar em genótipos de cana-de-açúcar. *Planta daninha*, **23** (4), pp. 611-619.
56. FLEET, G. H., 1999. Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, **50** (1-2), pp. 101-117.
57. FONSECA, A.; INÁCIO, J., 2006. Phylloplane yeasts. In: 'Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts', G. Peter & C.A. Rosa (editors). Springer-Verlag, Berlin.
58. FORCHETTI, G.; MASCIARELLI, O.; ALEMANO, S.; ALVAREZ, D.; ABDALA, G., 2007. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbial and Cell Physiology*, **76**, pp. 1145-1152.

59. FUENTEFRIA, A. M., 2007. Bioprospecção de leveduras “killer” com potencial para aplicação em biotipagem de microorganismos patogênicos humanos. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
60. FUENTEFRIA, A. M.; FRANSKOVIKI, I. M.; MERCADO, L. W.; RAMOS, J. P.; VAINSTEIN, M. H.; VALENTE, P., 2006. Inhibition of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates by two Brazilian killer yeasts. *Journal of Basic Microbiology*, **46** (2), pp. 87-93.
61. FRÖHLICH, J., HYDE, K. D. E PETRINI O., 2000. Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research*, **104**, pp. 1202-1212.
62. GAI, C. S.; LACAVAL, P. T.; MACCHERONI JR., W.; GLIENKE, C.; ARAÚJO, W. L.; MILLER, T. A.; AZEVEDO, J. L., 2009. Diversity of endophytic yeasts from sweet orange and their localization by scanning electron microscopy. *Journal of Basic Microbiology*, **49** (5), 441-451.
63. GALERA, J. S., 2006. Substituição parcial da farinha de trigo por farinha de arroz (*Oryza sativa* L.) na produção de sonho – estudo modelo. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos (Area de Bromatologia) da Universidade de São Paulo.
64. GAO, X. X.; ZHOU, H.; XU, D. Y.; YU, C. H.; CHEN, Y. Q.; QU, L. H., 2005. High diversity of endophytic fungi from pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation independent approach. *FEMS Microbiology Letters*, **249**, pp. 255-266.
65. GARCIA, K. M. 2007. Meios diferenciados para bioprospecção de leveduras endofíticas da bromélia *Neoregelia cruenta*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
66. GOLUBEV, W. I.; KULLAKOVSKAYA, T. V.; GOLUBEVA, E. V., 2001. *Pseudozyma fusiformata* BKM Y-2821- a producer of antifungal glycolipid. *Mikrobiologiya*, **70** (5), pp. 642-646.
67. GOLUBEV, W. I., 2006. Antagonistic interactions among yeasts. *In: The Yeast Handbook – Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Rosa, C. A & Gabor, P. (eds).
68. GOOGLE MAPS. Disponível em: <http://maps.google.com.br/>. Consultado em janeiro de 2010.
69. GÖTZ, M.; NIRENBERG, H.; KRAUSE, S.; WOLTERS, H.; DRAEGER, S.; BUCHNER, A.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K., 2006. Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, **58** (3), pp. 404-413.

70. GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; MATHAN, N.; REDDY, P. M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J. K., 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, **183** (8), pp. 2634-2645.
71. GUZZO, S. D.; DE CASTRO, R. M.; KIDA, K.; MARTINS, E. M. F., 2001. Ação protetora do acibenzolar-s-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. *Arquivos do Instituto Biológico* (São Paulo), **68** (1), pp. 89-94.
72. HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. **41**, pp. 95- 98.
73. HAGLER, A. N., 1978. Ecologia e taxonomia em um estuário poluído em ambientes marinhos do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado Apresentada ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ – RJ.
74. HAGLER, A. N.; D. G. AHEARN, 1981. A rapid DBB method for detection of basidiomycetous yeasts. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **31** (2), pp. 204-208,
75. HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C., 1978. The yeasts of fresh water and sewage. *Anais de microbiologia (Rio de Janeiro)*, **23**, pp. 79-103.
76. HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C., 1979. Taxonomic implications of *Rhodotorula rubra* isolated from polluted seawater in Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas*, **12** (1), pp. 63-66..
77. HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER L. C.; SILVA FILHO, J. B.; SANTOS, E. A.; FARAGE, S.; SHRANK, A.; DE OLIVEIRA, R. B., 1986. Evaluation of microbial pollution indicators in Brazilian tropical and subtropical marine surface waters. *The Science of the Total Environment*, **58**, pp. 151-160.
78. HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; ROSA, C. A.; MORAIS P. B., 1995. Yeasts as an example of microbial diversity in brazilian ecosystems. *Oecologia Brasiliensis*, **1**, pp. 225-244.
79. HATTORI, M.; YOSHIURA, K.; NEGI, M.; OGAWA, H., 1984. Keratinolytic proteinase produced by *Candida albicans*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, **22**, pp. 175-183.
80. HAZEN, K. C., 1995. New and emerging yeast pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, **8** (4), pp. 462-478.
81. HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P., 2007. Uso de ethephon e fécula de mandioca na conservação pós colheita de limão siciliano. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, **7** (1), pp. 99-106.

82. HEUSSEN, C.; DOWDLE, E. B., 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulphate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry*, **102**, pp. 196-202.
83. HODGSON, V. J.; BUTTON, D.; WALKER, G. M., 1995. Anti-Candida activity of a novel toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiology*, **141**, pp. 2003-2012.
84. IBGE, Comunicação social (06 de dezembro de 2005). Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=498&id_pagina=1. Consultado em 12 de junho de 2006.
85. INSTITUTO DE ELETROTÉCNICA E ENERGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (IEE-USP). Disponível em http://infoener.iee.usp.br/scripts/biomassa/br_cana.asp. Consultado em 24 de março de 2009
86. ISAEVA, O. V.; GLUSHAKOVA, A. M.; YURKOV, A. M.; CHERNOV I. Y., 2009. The Yeast *Candida railenensis* in the fruits of English Oak (*Quercus robur* L.). *Microbiology*, **78** (3), pp. 355-359.
87. IZGÜ, F.; ALTINBAY, D.; ACUN, T., 2006. Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its exo- β -1,3-glucanase activity. *Enzyme and Microbial Technology*, **39** (4), pp. 669-676.
88. JOLY, A. B., 1979. Botânica – Introdução à Taxonomia Vegetal. 5ªed. Companhia Editora Nacional.
89. JORNAL DO ENDOFÍTICO. Disponível em <http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/endofiticos/>. Consultado em 2 de agosto de 2006.
90. KACHALKIN, A. V.; GLUSHAKOVA, A. M.; YURKOV, A. M.; CHERNOV, I. YU., 2008. Characterization of yeast groupings in the phyllosphere of *Sphagnum* mosses. *Microbiology*, **77** (4), pp. 474-481.
91. KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L. M., 2007. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. *Infection*, **35** (2), pp. 51-58.
92. KIMURA, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, pp. 111-120.
93. KUDANGA, T.; MWENJE, E., 2005. Extracellular cellulase production by tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Canadian Journal of Microbiology*, **51**(9), pp. 773–776.
94. KUKLINSKY-SOBRAAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L., 2005. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine Max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant and Soil*, **273**, pp. 91-99.

95. KUNICKA-STYCZYN'SKA, A.; SIKORA, M.; KALEMBA, D., 2009. Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. *Journal of Applied Microbiology*, **107**, pp. 1903-1911.
96. KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W., 1998. The Yeasts, a Taxonomic study. 4th ed. Elsevier Pu. Co., Amsterdam.
97. KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antoine van Leeuwenhoek*, **73**, pp. 331 – 371.
98. LACHANCE, M. A.; STARMER, W. T., 1998. Ecology and Yeasts. *In: Kurtzman & Fell eds. The Yeast, a Taxonomic Study. 4th ed. Kurtzman & Fell (eds.). Elsevier, Amsterdam.*
99. LANDELL, M. F.; MAUTONE, J. N.; VALENTE, P., 2006. Biodiversity of yeasts associated to bromeliads in Itapoã Park, Viamão/RS. *Biociências*, **14** (2), pp. 144-149.
100. LANDELL, M. F., 2009. Caracterização genética e avaliação da diversidade de leveduras associadas a bromélias no Parque de Itapoã-Viamão, RS. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
101. LARRAN, S.; MÓNACO, C.; ALIPPI, H. E., 2001. Endophytic fungi in leaves of *Lycopersicon esculentum* Mill. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **17**, pp. 181-184.
102. LARRAN, S.; PERELLÓ, A.; SIMÓN, M. R.; MORENO, V., 2002. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **18**, pp. 683-686.
103. LAST, F. T.; PRICE, D., 1969. Yeast associated with living plants and their environs. *In: Rose, A. H e Harrison, J. S. (eds). The yeasts, 1st edition, vol 1, Academic, New York, pp. 183-217.*
104. LEE, J. C.; LOBKOVSKY, E.; PLIAM, N. B.; STROBEL, G.; CLARDY, J., 1995. Subglutinols A and B: Immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. *Journal of Organic Chemistry*, **60**, pp. 7076-7077.
105. LEME, E. M. C; MARIGO, L. C., 1993. Bromélias na natureza. Rio de Janeiro, Ed. Marigo Comunicações Visuais, p. 183.
106. LI, J.; ZHAO, J.; XU, L.; ZHOU, L.; LI, X.; WANG, J., 2008. Endophytic fungi from rhizomes of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **24**, pp. 733-737.
107. LOBO, D. S., 2007. Análise da interação protéica da defensina Psd1 de *Pisum sativum* com proteínas do fungo *Neurospora crassa*. Tese apresentada ao Programa

de Pós Graduação em Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

108. MAGNUSON, J. A.; KING JR., A. D.; TOROK, T., 1990. Microflora of partially processed lettuce. *Applied and Environmental Microbiology*, **56** (12), pp. 3851-3854.
109. MARIA, G.L.; SRIDHAR, K.R., 2003. Endophytic fungal assemblage of two halophytes from west coast mangrove habitats, India. *Czech Mycology*, **55**, pp. 241-251.
110. MÁRQUEZ, L. M.; REDMAN, R. S.; RODRIGUEZ, R. J.; ROOSSINCK, M. J., 2007. A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science*, **315**, pp. 513-515.
111. MARQUINA, D.; SANTOS, A.; PEINADO, J. M., 2002. Biology of killer yeasts. *International Microbiology*, **5**, pp. 65-71.
112. McCORMACK, P. J.; WILDMAN, H. G.; JEFFRIES, P., 1994. Production of antibacterial compounds by phylloplane-inhabiting yeasts and yeastlike fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, **60** (3) pp. 927-931.
113. McCURDY, L. H.; MORROW, J. D., 2003. Infections due to non-neoformans cryptococcal species. *Comprehensive Therapy*, **29** (2-3), pp. 95-101.
114. MELO, F. M. P., 2005. Atividade antifúngica de metabólitos secundários produzidos pelo endófito de mandioca *Bacillus pumilus* MAIIM4a. Dissertação apresentada a Escola Superior de “Agricultura Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo.
115. MIDDELHOVEN, W. J., 1997. Identity and biodegradative abilities of yeasts isolated from plants growing in an arid climate. *Antonie van Leeuwenhoek*, **72**, pp. 81-89.
116. MOLECULAR EXPRESSIONS CELL BIOLOGY: PLANT CELL STRUCTURE – LEAF TISSUE ORGANIZATION. Disponível em: <http://www.molecular-expressions.com/cells/leaftissue/leaftissuelarge.html>. Consultado em 15 de julho de 2010.
117. MORAIS, P. B.; ROSA, C. A.; LINARDI, V. R.; PATARO, C.; MAIA, A. B. R. A., 1997. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **13**, pp. 241-243.
118. MOORE, G. R. P.; MARTELLI, S. M.; GANDOLFO, G. A.; PIRES, A. T. N.; LAURINDO, J. B., 2006. Queratina de penas de frango: extração, caracterização e obtenção de filmes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **26** (2), pp. 421-427.

119. NASSAR, A. H.; EL-TARABILY, K. A., 2005. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils*, **42**, pp. 97-108.
120. NEJAD, P.; JOHNSON, P. A., 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion and disease suppression in oilseed rape and tomato. *Biological Control*, **18**, pp. 208-215.
121. NUNES, C.; MANSO, T.; VIÑAS, I.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N., 2005. Biocontrol of postharvest blue mold on pear and apple fruits with the combination of *Candida sake* (CPA-1) and *Pseudomonas syringae* (CPA-5). *Acta Horticulturae*, **682**, pp. 2101-2108.
122. OLIVERIA, R. B.; GIMENEZ, V. M. M.; GODOY, S. A. P., 2007. Intoxicações com espécies da família Euphorbiaceae. *Revista Brasileira de Biociências*, **5** (1), pp. 69-71.
123. PARÉ, P. W.; LIU, Q.; BONNESS, M. S.; LIU, M.; DIXON, R. A.; MABRY, T. J., 1996. *Cephalocereus senilis* (Old Man Cactus): in vitro culture and the elicitation of flavonoids. In: BAJAJ (EDS). *Biotechnology in Agriculture and Forestry 37 – Medicinal and Aromatic Plants IX*.
124. PEREIRA, Z. V.; MEIRA, R. M. S. A.; AZEVEDO, A. A., 2003. Morfoanatomia foliar de *Palicourea longepedunculata* Gardiner (Rubiaceae). *Revista Árvore*, **27**, (6), pp. 759-767.
125. PEREIRA, J. O.; VIEIRA, M. L. C.; AZEVEDO, J. L., 1999. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **15**, pp.37-40.
126. PHAFF, H. J.; STARMER, W. T., 1987. Yeast Associated with Plants, Insects and Soil. In: Rose and Harrison eds. *The Yeasts*. vol 1. Academic Press, London, pp. 123-180.
127. PINOTTI, T., 2003. Utilização de meio de enriquecimento com 6% de etanol para o isolamento de leveduras ascomicéticas de jaca *Artocarpus heterophyllus* em decomposição. Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
128. POLONELLI, L.; MORACE, G., 1986. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *Journal of Clinical Microbiology*, **24** (5), pp. 866-869.
129. PROENÇA, S. L.; SAJO, M. G., 2004. Estrutura foliar de espécies de *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botânica Brasilica*, **18** (2), pp. 319-331.
130. RADU, S.; KQUEEN, C. Y., 2002. Preliminary screening of endophytic fungi from medicinal plants in Malaysia for antimicrobial and antitumor activity. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, **9** (2), pp. 23-33.

131. REIS, V. M.; OLIVARES, F. L., 2006. Vias de penetração e infecção de plantas por bactérias. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, documentos 216.
132. RIBEIRO, J. R. A., 2009. Diversidade e ecofisiologia de leveduras em plantio orgânico de cana de açúcar. Tese de Doutorado Apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia – Ciências do Solo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
133. ROBBS, P. G; HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C., 1989. Yeasts associated with a pineapple plantation in Rio de Janeiro, Brazil. *Yeast*, **5**, pp. 5485-5489.
134. ROCHA Jr., P. R. S. R., 2003. Potencial biotecnológico de leveduras isoladas do fruto *Syzygium cumini*, Lann. - jamelão. Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
135. RODRÍGUEZ, P.; BARTONA, M.; ALDABALDEB, V.; ONETTOB, S.; PANIZZAA, P.; MENÉNDEZB, P.; GONZALEZB, D.; RODRÍGUEZ, S., 2007. Are endophytic microorganisms involved in the stereoselective reduction of ketones by *Daucus carota* root? *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **49** (1-4), pp. 8-11.
136. RUINEN, J., 1963. The phyllosphere II: yeasts from the phyllosphere of tropical foliage. *Antonie van Leeuwenhoek*, **29**, pp. 425 – 438.
137. RUINEN, J., 1966. The phyllosphere IV: Cuticle decomposition by microorganisms in the phyllosphere. *Annales de l' Institut Pasteur*, **111**, pp. 342-346.
138. RUIVO, C. C. C.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A.; BACCI JR., M.; PAGNOCCA, F. C., 2006. *Candida heliconiae* sp. nov., *Candida picinguabensis* sp. nov. e *Candida saopaulonensis* sp. nov., three new ascomycetous yeasts from *Heliconia velloziana* (Heliconiaceae). *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*, **56**, pp. 1147-1151.
139. SACKS, E. J.; ABBAS, H. K.; MENGISTU, A., 2006. First report of endophytic *Candida ipomoeae* isolated from ovules of upland cotton in Mississippi. *Plant Disease*, **90**, pp. 1362.
140. SAIKKONEM, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S., 2004. Evolution of endophyte-plant symbiosis. *Trends in Plant Science*, **9** (6), pp. 275-280.
141. SAIKKONEM, K.; FAETH, S.; HELANDER, M.; SULLIVAN, 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Reviews Of Ecology And Systematics*, **29**, pp. 319-343.
142. SAITO, K., 2006. Screening and characterization of the endophytic yeast from crops in Hokkaido. Annual Report on Exploration and Introduction of Microbial Genetic Resources, Vol. 19.

143. SAITOU, N.; NEI, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, pp. 406-425.
144. SAKIYAMA, C. C. H.; PAULA, E. M., PEREIRA, P. C.; BORGES, A. C.; SILVA, D.O, 2001. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. *Letters in Applied Microbiology*, **33**, pp.117-121.
145. SALAZAR, C. S.; DE GARCIA, M. C. C, 2005. Aislamiento de hongos endofitos en rosa (*Rosa hybrida*) en Bogotá, Colombia. *Revista Iberoamericana de Micología*, **22**, pp. 99-101.
146. SALA, F. C.; COSTA, C. P., 2005. 'PIRAROXA': Cultivar de alface crespa de cor vermelha intensa. *Horticultura Brasileira*, **23** (1), pp.158-159.
147. SALES, M. R.; CAVALCANTI, M. T. H.; FILHO, J. L. L.; MOTTA, C. M. S.; A. L. F., 2008. Utilização de penas de galinha para produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **43** (2), pp. 285-288.
148. SAMUELS, G. J.; SUAREZ, C.; SOLIS, K.; HOLMES, K. A.; THOMAS, S. E.; ISMAIEL, A.; EVANS, H. C., 2006. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. *Mycological Research*, **110**, pp. 381-392.
149. SANTAMARÍA, J.; BAYMAN, P., 2005. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*, **50** (1), pp. 1-8.
150. SANTOS, E. A.; OLIVEIRA, R. B., MENDONÇA-HAGLER, L.C.; HAGLER, A. 1996. Yeasts associated with flowers and fruits from a semi-arid region of Northeastern. *Revista Brasileira de Microbiologia*, **27** (1), pp. 33-40.
151. SANTOS, M. J.; MACHADO, I. C; LOPES, A. V., 2005. Biologia reprodutiva de duas espécies de *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) em Caatinga, Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, **28** (2), pp.361-373.
152. SCHMIDT, R., 2008. A tribo Bambuseae Nees (Poaceae, Bambusoideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
153. SCHMITT, M.; BREINIG, F., 2006. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews/Microbiology*, **4**, pp. 212-221.
154. SCHRANK, A., 1982. Método de número mais provável para contagem de leveduras em ambientes aquáticos poluídos. Tese de Mestrado Apresentada ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
155. SCHWEIGKOFER, W. e PRILLINGER, H., 1999. Molecular identification and phylogenetic analyses of endophytic and latent pathogenic fungi from grapevine.

Mitteilungen Klosterneuburg Rebe und Wein, Obstbau und Fruchteverwertung, **49** (3), pp. 65-78.

156. SCORZETTI, G.; FELL, J. W.; FONSECA, A.; STATZELL-TALLMAN, 2002. Systematics of basidiomycetous yeast: a comparison of large D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Research*, **2**, pp. 495-517.
157. SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S., 2007. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, **28** (1), pp. 25-34.
158. SILVA, J. J. I., 2003. Ocorrência e diversidade de leveduras no filoplano de plantas selecionadas do Parque Nacional da Serra da Arrábida. Tese de doutorado apresentada a Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Disponível em <http://run.unl.pt/handle/10362/1902>.
159. SILVA, H. S. A.; BETTIOL, W.; TERRANSON, C. R. F.; TOZZI, J. P. L.; MELO, I. S.; NUNES, F. V., 2006. Microrganismos endofíticos: potencial de uso como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 38 – EMBRAPA.
160. SMITH, S. A.; TANK, D. C.; BOULANGER, L. A.; BASCOM-SLACK, C. A.; EISENMAN, K.; KINGERY, D.; BABBS, B.; FENN, K.; GREENE, J. S.; HANN, B. D.; KEEHNER, J.; KELLEY-SWIFT, E. G.; KEMBAIYAN, V.; LEE, S. J.; LI, P.; LIGHT, D.Y.; LIN, E. H.; MA, C.; MOORE, E.; SCHORN, M. A.; VEKHTER, D.; NUNEZ, P. V.; STROBEL, G. A.; DONOGHUE, M. J.; STROBEL, S. A., 2008. Bioactive endophytes warrant intensified exploration and conservation. *PLoS One*, **3** (8), pp. 1-4.
161. SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O., 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica*, **34** (2), pp. 185-195.
162. STERN, K. R., 1994. Introductory Plant Biology. Wm. C. Brown Publishers. Sixth Edition.
163. STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D., 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of a Pacific yew. *Science*, **260** (5105), pp. 214-216.
164. STOLTZFUS, J. R.; MALARVITHI, P. P.; LADHA, J. K.; DE BRUIJN, F. J., 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant and Soil*, **194**, pp. 25-36.
165. STONE, J. K.; WHITE JR., J. F.; POLISHOOK, J. D., 2004. Endophytic fungi. In: Measuring and Monitoring Biodiversity of Fungi. Inventory and monitoring

- methods. G. Mueller, G. Bills, M. Foster (eds.). Elsevier Academic Press, Boston, MA, pp. 241-270.
166. STRINGINI, M.; COMITINI, F.; TACCARI, M.; CIANI, M., 2008. Yeast diversity in crop-growing environments in Cameroon. *International Journal of Food Microbiology*, **127** (1-2), pp. 184-189.
167. STROBEL, G. A., 2002. Rainforest Endophytes and Bioactive Products. *Critical Reviews in Biotechnology*, **22** (4), pp. 315-333.
168. STROBEL, G. A., 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, **5**, pp. 535-544.
169. STROBEL, G. A.; DAISY, B., 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67** (4), pp. 491-502.
170. SURYANARAYANAN, T. S.; WITTLINGER, S. K.; FAETH, S. H., 2005. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. *Mycological Research*, **109** (5), pp. 635-639.
171. SUTO, M.; TAKEBAYASHI, M.; SAITO, K.; TANAKA, M.; YOKOTA, A.; TOMITA, F., 2002. Endophytic as producers of xylanase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **93** (1), pp. 88-90.
172. SUZUKI, M. T., 2006. Isolamento, identificação e caracterização de linhagens endofíticas de *Bacillus thuringiensis* de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo/ Instituto Butantan/ Instituto de Pesquisas Tecnológicas.
173. TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology Evolution*. **24** (8), pp. 1596-1599.
174. TAMPIERI, M. P.; GALUPPI, R.; MACCHIONI, F.; CARELLE, M. S.; LAURA FALCIONI, L.; CIONI, P. L.; MORELLI, I., 2005. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia*, **159**, pp. 339-345.
175. TAYLOR, J. E.; HYDE, K. D.; JONES, E. B. G., 1999. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. *New Phytologist*, **142**, pp. 335-346.
176. TEIXEIRA-YAÑEZ, L. D., 2005. Resistência genética, fungicidas e solarização para o controle de *Thielaviopsis basicola* (Berk e Broome) Ferraris na cultura da alface (*Lactuca sativa* L.). Tese de doutorado apresentada à Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo.

177. TIAN, X. L.; CAO, L. X.; TAN, H. M.; ZENG, Q. G.; JIA, Y. Y.; HAN, W. Q.; ZHOU, S. N., 2004. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **20**, pp. 303-309.
178. TSUOBI, R.; KURITA, Y.; NEGI, M.; OGAWA, H., 1985. A specific inhibitor of keratinolytic proteinase from *Candida albicans* could inhibit the cell growth of *C. albicans*. *Journal of Investigative Dermatology*, **85**, pp. 438-440.
179. UNICA. Disponível em: <http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>. Consultado em 06 de fevereiro de 2010.
180. VANNUCCI, A. L., 1982. Anatomia comparada de duas espécies nativas de *Manihot* Mill (Euphorbiaceae). Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.
181. VARMA, A.; VERMA, S.; SUDHA; SAHAY, N.; BÜTEHORN, B.; FRANJEN, P., 1999. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiology*, **65** (6), pp. 2741-2744.
182. VEGA, F. E.; SIMPKINS, A.; AIME, M. C.; POSADA, F.; PETERSON, S. W.; REHNER, S. A.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; ARNOLD, A. E., 2010. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. *Fungal ecology*, no prelo, pp. 1-17.
183. VELOSO, C. A. C.; OEIRAS, A. H. L.; CARVALHO, E. J. M.; DE SOUZA, F. R. S., 2001. Resposta do abacaxizeiro à adição de nitrogênio, potássio e calcário em latossolo amarelo do Nordeste Paraense. *Revista Brasileira de Fruticultura*, **23** (2), pp. 396-402.
184. VERMA, V. C., KHARWAR, R. N., STROBEL, G. A., 2009. Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. *Natural Products Communication*. **4** (11), pp. 1511-32.
185. VERMELHO, A. B.; MAZOTTO, A. M.; MELO, A. C. N.; VIEIRA, F. H. C.; DUARTE, T. R.; MACRAE, A.; NISHIKAWA, M. M.; BON, E. P. S., 2010. Identification of a *Candida parapsilosis* strain producing extracellular serine peptidase with keratinolytic activity. *Mycopathologia*, **169** (1), pp. 57-65.
186. VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G., 2005. Gênero *Baccharis* (ASTERACEAE): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química Nova*, **28**, (1), pp. 85-94.
187. VIÑAS, I.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; SANCHIS, V., 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, **20** (1-2), pp. 9-16.
188. VITAL, M. J. S., ABRANCHES, J.; HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C., 2002. Mycocinogenic yeasts isolated from amazon soils of the Maracá

- ecological station, Roraima-Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, **33**, pp. 230-235.
189. VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J., 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, **19**, pp. 1130–1138.
190. WALKER, G. M.; MCLEOD, A. H.; HODGSON, 1995. Interactions between “killer” yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, **127**, pp. 213-222.
191. WALKER, G. M., 1998. Yeast Physiology and Biotechnology. In: Chichester, John Willey & Sons (eds.)
192. WALLER, F.; ACHATZ, B.; BALTRUSCHAT, H.; FODOR, J.; BECKER, K.; FISCHER, M.; HEIER, T.; HÜCKELHOVEN, R.; NEUMANN, C.; VON WETTSTEIN, D.; FRANKEN, P.; KOGEL, K. H., 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS*, **102** (38), pp.13386-13391.
193. WANG, Q. M.; BAI, F. Y., 2008. Molecular phylogeny of basidiomycetous yeasts in the *Cryptococcus luteolus* lineage (*Tremellales*) based on nuclear rRNA and mitochondrial cytochrome *b* gene sequence analyses: proposal of *Derxomyces* gen. nov. and *Hannaella* gen. nov., and description of eight novel *Derxomyces* species. *FEMS Yeast Research*, **8** (5), pp. 799-814.
194. WANG, L., YUE, L.; CHI, Z.; WANG, X., 2008. Marine killer yeasts active against a yeast strain pathogenic to crab *Portunus trituberculatus*. *Diseases of aquatic organisms*, **80** (3), pp. 211-218.
195. WANG, J.; LI, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SU, W., 2000. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *FEMS Microbiology Letters*, **193**, pp. 249-253.
196. WANG, Y.; CASADEVALL, A., 1994. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Applied and Environmental Microbiology*, **60** (10), pp. 3864-3866.
197. WAWRZKIEWICZ, K.; LOBAREWSKI, J.; WOLSKI, T., 1987. Intracellular keratinase of *Trichophyton gallinae*. *Journal of Medical Veterinary Mycology*, **25**, pp. 261-268.
198. WEI, Y. H.; LEE, F. L.; HSU, W. H.; CHEN, S. R.; CHEN, C. C.; WEN, C. Y.; LIN, S. J.; CHU, W. S.; YUAN, G. F.; LIOU, G. Y., 2005. *Pseudozyma antarctica* in Taiwan: a description based on morphological, physiological and molecular characteristics. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, **46**, pp. 223-229.
199. WHITE Jr., J. F., 1987. Widespread distribution of endophytes in the Poaceae. *Plant Disease*, **71** (4), pp. 340-342.

200. WICKERHAM, L. J., 1951. Taxonomy of Yeasts. Tech. Bul. 1029. U.S. Department of Agronomy. Washington D.C.
201. WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; DANWISSETKANJANA, K.; RUANGRUNGSI, N.; MEEVOOTISOM, V., 2004. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **20**, pp.265-272.
202. XIN, G.; GLAWE, D.; DOTY, S. L., 2009. Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid-producing yeasts occurring in *Populus* trees. *Mycological Research*, **113** (9), pp. 973-980.
203. YARROW, D., 1998. Methods for the isolation and Identification of Yeasts. In: Kurtzman e Fell eds. *The Yeast, a Taxonomic Study*. 4th ed.
204. YURI, J. E.; DE SOUZA, R. V.; DE FREITAS, S. A. C.; RODRIGUES JÚNIOR, J. C.; MOTA, J. H., 2002. Comportamento de cultivares de alface tipo americana em Boa Esperança. *Horticultura brasileira*, **20** (2), pp. 229-232.
205. ZAGORC, T.; MARÁZ, A.; CADEZ, N.; JEMEC, K. P.; PETER, G.; RESNIK, M.; NEMANIC, J.; RASPOR, P., 2001. Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. *Food Microbiology*, **18**, pp. 441-451.
206. ZANOTTI, P. D.; SOUZA NETO, E. M., 2005. História do Café no Espírito Santo no Brasil e no Mundo. Disponível em <http://enetovix.tripod.com/cafe-final.pdf>. Consultado em 12 de agosto de 2006.
207. ZHAO, J. H.; BAI, F. Y.; GUO, L. D.; JIA, J. H., 2002. *Rhodotorula pinicola* sp. nov., a basidiomycetous yeast species isolated from xylem of pine twigs. *FEMS Yeast Research*, **2**, pp. 159-163.
208. ZHANG, B.; SALITURO, G.; SZALKOESKI, D.; ZHIHUA, L.; ZHANG, Y.; ROYO, I.; VILELLA, D.; DÍEZ, M.T.; PELAEZ, F.; RUBY, C.; KENDALL, R. L.; MAO, X.; GRIFFIN, P.; CALAYCAY, J.; ZIERATH, J. R.; HECK, J. V.; SMITH, R. G.; MOLLER, D. E., 1999. Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science*, **284**, pp. 974-977.

ANEXOS

Tabela 18: Caracterização fenotípica de leveduras endofíticas. As culturas marcadas com * tiveram sua identificação confirmada por sequenciamento

Isolado	Especie	Glicose	Galactose	Sorbose	Glucosamina	Ribose	Xitose	L-Arabinose	D-Arabinose	Rhamnose	Sacarose	Maltose	Trealose	α Dglucoside	Celobiose	Salicina	Arbutina	Melibiose	Lactose	Rafinose	Melezitose	Inulina	Amido	Glicerol	Eritritol	Ribitol	Xilitol	D-Glucitol	D-Manitol	
4L3XL*	<i>P.aphidis</i>	1	1	1	1	1	0.5	0.5	1	0		1	1	1	1	1	0.5	1	1	1	1	0	0.5	1	1	1		1	1	
2L3XL*	<i>P.aphidis</i>	1	1	1	0.5	1	1	1	1	0		0.5	0	1	0.5	1	1	1	1	1	1	0	0.5	1	1	1		1	1	
4L3XL-XLb ?	<i>P.aphidis</i>	1	0.5	0.5	1	1	0.5	0.5	1	0		1	1	1	1	0.5	0	0.5	0	1	0.5	0.5	0.5	1	1	0.5		1	1	
1L3XL*	<i>P.aphidis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	0		1	1	0.5	1	1	1	0.5	1	1	1	1	0	1	1	1	1		1	1
4AL5XL-XL*	<i>P.aphidis</i>	0.5	1	0.5	1	1	0.5	1	1	0.5	1	0	0.5	0	0	0.5	1	1	1	0.5	0		0.5	0.5	1		1	1	0.5	
1C1XL	<i>Pseudozyma sp.</i>	1	0	0.5	0	0.5	0.5	0.5	1	0		0.5	0.5	0	1	0	0.5	0	1	1	0.5	0	0	0	1	0.5		0.5	0.5	
1C1XL-XL	<i>Pseudozyma sp.</i>	0	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0.5	0		0.5	0.5	0	1	0	0.5	0	1	1	0.5	0	0	0	1	0.5		0	0.5	
AR1XLO	<i>P.aff. fusiformata</i>	1	0	0.5	0.5	1	0.5	0.5	0	0		1	1	0.5	0	0	0.5	0	0	0	0.5	0		0.5	1	0		1	0.5	
1AR1XLO-XL*	<i>P.aff. fusiformata</i>	0.5	0	0	0.5	0.5	0	0.5	0	0		1	0.5	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	0		1	0	0		1	0.5	
1CA1XL*	<i>P. aff. proflicca</i>	0.5	1	0.5	0.5	1	1	1	1	1		1	1	1	0.5	1	1	1	1	1	1	0		1	0.5	0		0.5	1	
1MI5Ga*	<i>P. hubeiensis</i>	0.5	1	0	1	0.5	0	1	0	0.5	1	0	0.5	0.5	1	0.5	1	1	1	1	0		1	0.5	0		1	0.5	0.5	
4AR3XL	<i>E. oryzae-like</i>	0.5	0	0	0	0.5	0	1	0	0		0	0	0	0.5	0	0	0	0	1	0.5	0		0.5	0	1		1	1	
4AB2XL	<i>Pseudozyma sp.</i>	0.5	0	0	0	0	0	1	0	0		0	0.5	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0.5	0		0	0	
AL1XLO-XL	<i>Pseudozyma sp. ?</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.5	1	1	1	1		1	1	
4AB4Y*	<i>T. aff. globispora</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0		0.5	0.5	1	1	1	
MA3Ba	<i>F. inconspicuum?</i>	1	1	1	1	0	1	0.5	1	1		1	0.5	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1		1	1	
MA3Bb	<i>F. inconspicuum?</i>	0.5	0	0.5	0	0	1	1	1	1		1	0	0.5	1	1	0.5	0	0.5	0	1	0.5	0	0	0	0.5		0	1	
1AB5Gb*	<i>R. paludigenum</i>	0.5	1	0	0	0	0	0	0	0		0	0.5	0	0	1	1	0	0	1	0	0		1	0	0.5	1	0	0.5	
AR2XLO-XL*	<i>R. paludigenum</i>	0.5	0	0	0	1	0.5	1	0	0		0.5	1	0.5	0	0	0	0	0	0	0.5	0		0	1	0		1	1	
MI4XLOb*	<i>S. pararoseus</i>	1	1	1	0	1	1	0.5	1	0		1	1	1	0.5	0.5	0.5	0	0	1	1	0		1	0	1		1	1	
AB1XLO	<i>R. mucilaginosa</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	1		1	1	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0	0.5	1	0	1	1	0	1		1	1	
1AB1XLO-XL*	<i>R. mucilaginosa</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	1		1	1	0	0	0	1	0.5	0	1	0	0	0.5	1	0.5	1		1	1	
AB1B	<i>Cryptococcus sp. rosa</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	1		1	1	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0	1	0	0.5	1	1	0	1		1	1	
1CA2G*	<i>R. aff. mucilaginosa</i>	1	1	0.5	0	1	0.5	1	1	0		1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0		1	0	0		1	1	
2CA2G*	<i>R. aff. mucilaginosa</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	0		1	1	1	1	0.5	1	0	0	1	1	1	0		1	0	1		1	1
4CA2Ga	<i>Rhodotorula sp.</i>	0.5	0	0	0	1	0	1	1	0		0.5	1	1	0	0	0	0	0	0.5	0.5	0		1	0		1	0	0	
MA3Y	<i>R. glutinis</i>	0.5	1	0.5	0	1	1	1	1	0		1	0.5	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1		1	1	
1MA3B	<i>R. glutinis</i>	0.5	1	1	0	1	1	1	1	0		1	0.5	0	1	1	0.5	0	0	1	1	1	0	0	0	1		1	1	
4AB5G	<i>Rhodotorula sp.</i>	0.5	0	0	0	0.5	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0		0	0	0.5	
1AB5E	<i>Cryptococcus sp. rosa</i>	0.5	1	0	0	1	0.5	1	1	1		1	0.5	1	1	0.5	1	1	1	1	1	0		1	1	0.5	0.5	0.5	0.5	
1MI4XLOb	<i>Cryptococcus sp. rosa</i>	0.5	1	1	1	1	0	0.5	1	1		1	0.5	1	0.5	0	1	0.5	0.5	1	1	0		0	0	0.5	1	0.5	0.5	
1MI8XLO-Xla	<i>Cryptococcus sp. rosa</i>	0.5	1	0.5	0	1	1	1	1	1		1	0	1	0.5	1	0	1	1	1	1	1	0		1	1	0.5	0.5	1	0.5
MI8XLO-XLb	<i>Cryptococcus sp. rosa</i>	1	1	0	0	1	0.5	1	1	1		1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0		0	1	1		1	1
AL1XLO	<i>C. daszewskae</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	0.5		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0.5	1	1	1		1	1	
CA3XLO-XLa	<i>Cryptococcus sp.</i>	1	1	0	0	1	1	1	1	1		1	1	0	0	0	0.5	1	0	1	0.5	0		0	1	1		1	1	
4CA1XL-XLc	<i>C. flavus ?</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	0.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		1	1	0.5	1	1	1	1	
1AB2G	<i>C. flavus</i>	1	1	1	0.5	1	1	1	0.5	1		1	1	1	1	0	0.5	1	0.5	1	1	1	1	1	0	1	1		1	1
AB3Y*	<i>C. flavus</i>	1	1	0	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0.5	0	1	0		1	1	
4AB3XL-XL*	<i>C. flavus</i>	1	1	0	0	1	1	0.5	1	1		0	0	1	1	0.5	1	1	0.5	0.5	1	1	1	0	1	0		0.5	0.5	

Tabela 18: continuação

Isolado	Espécie	Galactitol	Mio inositol	Lactato	Succinato	Citrato	Metanol	Etanol	Nitrato	Formação de amido	10% NaCl	15% NaCl	0,01% Ciclohexamida	0,1% Ciclohexamida	28°C	34°C	36°C	38°C	40°C	42°C	DBB	Ferm. glicose	Cor da colônia	Formato da célula	Brotamento
4L3XLa*	<i>P.aphidis</i>	1	0	0	1	0	0	0.5	1	0	1	0			1	1	1				1	0	Bege		
2L3XL*	<i>P.aphidis</i>	1	1	0	0	0	0	0.5	1	0	1	0			1	1	1				1	0	Bege	Alon	
4L3XL-XLb?	<i>P.aphidis</i>	0.5	0.5							0	1	0			1						1	0	Bege	Alon	
1L3XL*	<i>P.aphidis</i>	1	1	0	0	0	0	0.5	1	0	1	0			1	1	1				1	0	Bege	Alon	
4AL5XL-XL*	<i>P.aphidis</i>	0.5	1							0	1	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	B/R		
1C1XL	<i>Pseudozyma</i> sp.	0	0							0	0	0	0	0	1		0	0	0	0		0	Rosa	Alon	UMP
1C1XL-XL	<i>Pseudozyma</i> sp.	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0			1		0	0	0	0		0	Rosa		
AR1XLO	<i>P.aff. fusiformata</i>	0	1							0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Rosa	Oval	UMP
1AR1XLO-XL*	<i>P.aff. fusiformata</i>	0	0.5							0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	UMP
1CA1XLa*	<i>P.aff. profilica</i>	0.5	0.5							0	1	0	0.5	0	1	1	1		0	0	1	0	Bege	Oval	UMP
1MI5Ga*	<i>P. hubeiensis</i>	0	1							0	1	0	0	0	1		0	0	0	0		0		Alon	UMP
4AR3XL	<i>E. oryzae-like</i>	0	0							0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0			
4AB2XL	<i>Pseudozyma</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.5	0			1						1	0	Bege	Alon	
AL1XLO-XL	<i>Pseudozyma</i> sp. ?	1	0.5							1	0	1	0		1	1	1				1	0	Bege	Alon	UMP
4AB4Y*	<i>T. aff. globispora</i>	1	0							0	0	0	1	1	1	1	1		0	0	1	0	Bege	G/O	UMP
MA3Ba	<i>F. inconspicuum</i>	1	1							1	0	1	0		1						1	0	Bege		
MA3Bb	<i>F. inconspicuum</i>	0	1							1	1	1	0		1						1	0	Branco	G/O	UMP
1AB5Gb*	<i>R. paludigenum</i>	1	0							0	1	0	1	0	1		0	0	0	0	1	0	Rosa	O	
AR2XLO-XL*	<i>R. paludigenum</i>	0	1							0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Rosa		
MI4XLOB*	<i>S. pararoseus</i>	0	0						w	0	1	0	0	0	1	1	1				1	0	Rosa		
AB1XLO	<i>R. mucilaginosa</i>	1	0.5	0	1	0	0	1	0	0	1	0			1	1	0.5				1	0	Rosa	Oval	UMP
1AB1XLO-XL*	<i>R. mucilaginosa</i>	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0			1						1	0	Rosa	Oval	UMP
AB1B	<i>Cryptococcus</i> sp. rosa	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0			1		0	0	0	0	1	0	Rosa	Oval	UMP
1CA2G*	<i>R. aff. mucilaginosa</i>	0.5	0							0	1	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Rosa	Oval	UMP
2CA2G*	<i>R. aff. mucilaginosa</i>	0	0						w	0	0.5	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Rosa		
4CA2Ga	<i>Rhodotorula</i> sp.	0	0							0	0	0	0	0	1						1	0	Rosa		
MA3Y	<i>R. glutinis</i>	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0			1						1	0	Rosa	Oval	UMP
1MA3B	<i>R. glutinis</i>	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0			1						1	0	Rosa	O/A	
4AB5G	<i>Rhodotorula</i> sp.	1	0.5							0	0	0	1	1	1	1	1				1	0	Rosa	Oval	UMP
1AB5E	<i>Cryptococcus</i> sp. rosa	1	1							0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Rosa		
1MI4XLOB	<i>Cryptococcus</i> sp. rosa	0.5	0.5							0	0.5	0	0.5	0	1		0	0	0	0	1	0	Rosa	Glob	UMP
1MI8XLO-Xla	<i>Cryptococcus</i> sp. rosa	0.5	1							0	1	0	0	0	1	1	1		0	0	1	0	Rosa	Oval	UMP
MI8XLO-XLb	<i>Cryptococcus</i> sp. rosa	1	1							0	0	0	?	1	1		0	0	0	0	1	0	Rosa	O/G	UMP
AL1XLO	<i>Cryptococcus</i> sp.	1	1							1	0	1	0		1	1	1				1	0	Bege	Alon	UMP
CA3XLO-XLa	<i>Cryptococcus</i> sp.	1	1							0	0.5	0	1	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege		
4CA1XL-XLc	<i>C. flavus</i> ?	0	1							0	0.5	0	1	0	1	1	1				1	0	Bege	Alon	UMP
1AB2G	<i>C. flavus</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0			1						1	0	Bege	Oval	UMP
AB3Y*	<i>C. flavus</i>	1	1	0	1	0	0	0	0.5	0	0	0			1		0	0	0	0	1	0	Bege	G/O	UMP
4AB3XL-XL*	<i>C. flavus</i>	0.5	1		1	0	0	0	0	0	0.5	0			1		0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	

Tabela 18: continuação

Isolado	Espécie	Glicose	Galactose	Sorbose	Glucosamina	Ribose	Xilose	L-Arabinose	D-Arabinose	Rhamnose	Sacarose	Maltose	Trealose	αDglucoside	Celobiose	Salicina	Arbutina	Melibiose	Lactose	Rafinose	Melezitose	Inulina	Amido	Glicerol	Eritritol	Ribitol	Xilitol	D-Glucitol	D-Manitol	
4AB3XL-XL	<i>C. flavus</i>	1	1	0	0	1	1	0.5	1	1		0	0	1	1	0.5	1	1	0.5	0.5	1	1	1	0	1	0		0.5	0.5	
1AB3XL-XL*	<i>C. flavus</i>	1	1	0	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1		1	1	
AL5XLO	<i>C. aff. flavus</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	1		1	1	1	0.5	0	1	1	1	1	1	0.5	0	0	1	0		0	0	
1AL3XL*	<i>C. flavus</i>	0	0.5	0.5	0	1	1	1	1	1		1	1	1	1	0.5	1	1	0.5	1	1	0	1	0	1	0		0.5	1	
2AL3XL	<i>C. flavus</i>	1	0.5	0.5	0	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0		1	1	
4AL3XL*	<i>C. flavus</i>	1	1	1	0	1	0.5	0.5	0.5	1		1	1	1	1	0.5	1	1	1	1	1	?		1	0.5	1	1	1	1	
4AL3XL-XL	<i>C. flavus</i>	0.5	1	0.5	0	1	1	1	0.5	0.5		1	1	1	0.5	0	0	1	0.5	1	1	0	1	1	1	0		0	0	
4AL4G	<i>C. flavus?</i>	0.5	0.5	0	0	0	0	1	0	1		1	0.5	0	0.5	0	0	1	0	1	1	0		0	1	0		0	0.5	
1AL4Y	<i>C. flavus?</i>	1	1	0.5	1	1	1	1	1	0.5	0.5	1	1	0.5	1	0.5	1	1	1	1	0		0.5	1	1		1	1	1	
1AL2XL-XL	<i>C. flavus</i>	1	1	0	0	1	1	1	1	1		1	1	1	1	0.5	1	1	1	1	1	0	0.5	0	1	1		1	1	
4MI4XLb	<i>C. flavus</i>	1	1	0	0.5	1	1	0.5	0	1		1	0.5	1	1	1	0.5	1	1	1	1	1		0	1	0		0.5	1	
4MI4XL-XL*	<i>C. flavus</i>	1	1	1	0.5	1	1	0.5	0	0.5	1	0.5	1	1	0.5	0.5	1	0	1	1	0		0	1	0.5	0.5	1	1	1	
MI8XLOb	<i>Cryptococcus</i> sp.	1	1	0.5	0.5	1	0.5	1	1	1		1	1	1	1	0.5	1	1	1	1	1	0.5	0	0.5	1	1		1	0.5	
1MI7XLa	<i>C. laurentii?</i>	1	1	0	0	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		1	1	1		1	1	
AL5XLO-XL	<i>Cryptococcus</i> sp.	1	1	1	0.5	1	1	1	0.5	1		1	1	1	1	1	1	1	0	0.5	1	0		1	1.5	1	1	1	1	
4MI6Gb	<i>F. itaipuensis?</i>	0	1	0	0	1	1	1	1	1		1	0.5	1	0.5	0	0	1	0	1	1	0		0	1	0		0.5	0.5	
1MI6XL-XL	<i>F. itaipuensis?</i>	0	1	0	0.5	1	1	1	1	1		1	1	1	0.5	0	0	1	0	1	1	0		0	1	0		1	0.5	
4AB4Gb	<i>Cryptococcus</i> sp.?	0	1	0	1	1	1	1	1	1		1	1	0	0.5	0	0	1	1	1	1	0		0	0	1		0	0	
4AB4XL	<i>Cryptococcus</i> sp.?	0.5	0.5	0.5	1	1	1	1	1	1		0.5	0.5	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0		0	0.5	0		0.5	0
2AB3Yb	<i>C. podzolicus?</i>	1	1	0	0.5	0	1	0.5	1	1		0.5	0.5	1	1	0	1	1	1	0.5	1	0	1	0	0	0		0.5	1	
2CA3XL-XL	<i>C. aeriis?</i>	1	1	0.5	1	1	1	1	0	1		1	1	0.5	1	0	0.5	1	1	1	1	1	0		0	0	0.5	1	1	1
4CA2XL-XL	<i>C. aeriis?</i>	1	1	0	1	1	1	1	0	1		1	0.5	1	1	0.5	0.5	1	1	1	1	1	0		0	0	0.5	0.5	1	1
1CA2XLO	<i>C. aeriis?</i>	1	1	0.5	0.5	1	0.5	1	0.5	1		1	1	0.5	1	0	1	1	1	1	1	1	0		0	0	0		1	0.5
CA2XLO	<i>C. aeriis?</i>	1	1	0	0.5	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		0	0	0		1	1
CA2XLO-XL	<i>C. aeriis?</i>	1	1	0	0.5	1	1	0.5	1	1		1	1	0.5	1	0	1	1	1	1	1	0.5	0		0	0	0		1	0.5
1CA2Ya	<i>C. aeriis?</i>	1	1	0.5	0.5	1	0.5	1	0.5	1		1	0.5	1	1	0.5	0.5	1	1	1	1	1	0		0	0	0		1	1
1CA2XL	<i>C. aeriis?</i>	1	1	0	1	1	1	1	0.5	1		1	1	1	1	0.5	1	1	1	1	1	1	0		0	0	0		1	1
1CA2XL-XL	<i>C. aeriis?</i>	1	1	0	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	0.5	1	1	1	1	1	1	0		0	0	0		1	1
MI6XLO-XL	<i>C. aeriis?</i>	1	1	1	1	1	0.5	1	1	1		1	1	1	1	1	1	0.5	1	1	1	1	0		0	0	1		1	1
2MI6XL-XL	<i>C. albidus</i>	1	1	0	0	0	0.5	1	1	1		1	0.5	0.5	0	0	0.5	0	0	0.5	0.5	0		0.5	1	1		1	1	
1MI4Y*	<i>C. flavescens</i>	1	1	0	0	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		0.5	1	1		1	1	
1MI4XLOa	<i>C. flavescens</i>	0.5	1	1	1	1	0.5	0.5	0.5	1		1	0.5	1	0.5	0.5	1	0.5	0.5	1	1	0		0	0.5	0.5	1	0.5	0.5	
4MI7XL-XL*	<i>C. flavescens</i>	1	1	0	0	1	1	1	1	1		1	0.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		1	1	1		0.5	1
1MI5Y*	<i>C. flavescens</i>	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		0.5	1	1		1	1
2MI5XL-XL	<i>C. flavescens</i>		1	0	0	0	0.5	1	0.5	0		0.5	0.5	0.5	0	0	1	0	1	1	1	0.5	0		1	0.5	1		0.5	1
4MI5XL-XL	<i>C. flavescens</i>	1	0	0	0	0.5	1	0.5	0	0		1	0	0.5	0	1	0.5	0.5	0.5	1	1	0		1	1	0.5	0.5	0	1	1
MI8XLOa*	<i>C. flavescens</i>	1	1	0	0	1	1	1	1	1		1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0		0	1	1		0.5	0.5
1MI8XLOa*	<i>C. flavescens</i>	1	0.5	0	0	1	0	0	0.5	1		0.5	1	0.5	0.5	0	0.5	1	1	1	1	1	0		0	0.5	0		0.5	1
2AR2XL-XL	<i>C. flavescens?</i>	1	0.5	0	0	0.5	0	0.5	0	0		1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0		0.5	1	0		1	1	
4AR2XL-XL	<i>C. flavescens?</i>	0.5	0.5	0	0.5	0.5	1	1	0	0		0.5	0	0.5	0	0.5	0	0	0	0	1	1	0		0.5	1	0		1	1

Tabela 18: continuação

Isolado	Espécie	Galactitol	Mio inositol	Lactato	Succinato	Citrato	Metanol	Etanol	Nitrato	Formação de amido	10% NaCl	15% NaCl	0,01% Ciclohexami	0,1% Ciclohexami	28oC	34oC	36oC	38oC	40oC	42oC	DBB	Ferm. glicose	Cor da colônia	Formato da célula	Brotamento
4AB3XL-XL	<i>C. flavus</i>	0.5	1		1	0	0	0	0	0	0.5	0			1		0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	
1AB3XL-XL*	<i>C. flavus</i>	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0			1						1	0	Bege		
AL5XLO	<i>C. aff. flavus</i>	1	1							0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege		
1AL3XL*	<i>C. flavus</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			1		0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	UMB
2AL3XL	<i>C. flavus</i>	1	1						0	0	0	0			1		0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	UMB
4AL3XL*	<i>C. flavus</i>	0.5	0.5	0	0.5	0	0	1	0	0	0	0	0.5	0	1	1	1				1	0	Bege		
4AL3XL-XL	<i>C. flavus</i>	0.5	0.5						0	0	0	0			1						1	0	Bege		
4AL4G	<i>C. flavus ?</i>	0.5	1						w	0	1	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	UMB
1AL4Y	<i>C. flavus ?</i>	1	1							0	1	0	0	0	1	1	0.5		0		1	0	Bege		
1AL2XL-XL	<i>C. flavus</i>	1	1						0	0	1	0			1	0	0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	UMB
4MI4XLb	<i>C. flavus</i>	1	1						w	0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	UMB
4MI4XL-XL*	<i>C. flavus</i>	1	1							0	0	0	0.5	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	UMB
MI8XLOb	<i>C. flavus</i>	1	1						w	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	Bege		
1MI7XLa	<i>C. laurentii ?</i>	1	1							0	0	0	?	1	1	1	0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	UMB
AL5XLO-XL	<i>Cryptococcus</i> sp.	1	1							0	0	0	1	1	1	1	1				1	0	Bege		
4MI6Gb	<i>F. itaipuensis?</i>	1	1							0	1	0	0.5	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	UMB
1MI6XL-XL	<i>F. itaipuensis?</i>	1	0.5							0	1	0	0.5	0.5	1		0	0	0	0	1	0	Bege		
4AB4Gb	<i>Cryptococcus</i> sp.	1	1							0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege		
4AB4XL	<i>Cryptococcus</i> sp.	1	1							0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	G/O	UMB
2AB3Yb	<i>C. podzolicus ?</i>	1	1						0	0	0	0			1		0	0	0	0	1	0	Branco	G/O	UMB
2CA3XL-XL	<i>C. aerius ?</i>	1	1							0	0	0			0	1	0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	UMB
4CA2XL-XL	<i>C. aerius ?</i>	1	1							0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	UMB
1CA2XLO	<i>C. aerius ?</i>	0.5	0.5						w	0	0	0	0.5	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege		
CA2XLO	<i>C. aerius ?</i>	1	1							0	0	0	0.5	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	UMB
CA2XLO-XL	<i>C. aerius ?</i>	1	1							0	0	0	0.5	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege		
1CA2Ya	<i>C. aerius ?</i>	1	1						w	0	0	0	1	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	Glob	UMB
1CA2XL	<i>C. aerius ?</i>	1	1							0	1	0	?	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege		
1CA2XL-XL	<i>C. aerius ?</i>	1	1						w	0	1	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege		
MI6XLO-XL	<i>C. aerius ?</i>	1	1						1	0	1	0	0	1	1		0	0	0	0	1	0	Bege	G/O	UMB
2MI6XL-XL	<i>C. albidus</i>	1	1						1	0	0	0	1	0.5	1		0	0	0	0	1	0	B/R	Oval	UMB
1MI4Y*	<i>C. flavescens</i>	1	1						1	0	0	0	0	1	1		0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	UMB
1MI4XLOa	<i>C. flavescens</i>	0.5	0.5							0	1	0	0.5	0	1	1	1				1	0	Bege		
4MI7XL-XL*	<i>C. flavescens</i>	1	1							0	0	0	0	1	1		0	0	0	0	1	0	B/R		
1MI5Y*	<i>C. flavescens</i>	1	1							0	0	0	0	0.5	1		0	0	0	0	1	0	Bege		
2MI5XL-XL	<i>C. flavescens ?</i>	0.5	0.5						1	0	0.5	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	O/A	UMB
4MI5XL-XL	<i>C. flavescens ?</i>	0	1							0	1	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	Alon	UMB
MI8XLOa*	<i>C. flavescens</i>	1	1						w	0	0.5	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	G/O	UMB
1MI8XLOa*	<i>C. flavescens</i>	1	1						w	0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Branco	G/O	UMB
2AR2XL-XL	<i>C. flavescens ?</i>	0	1							0	0.5	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	UMB
4AR2XL-XL	<i>C. flavescens ?</i>	0	1							0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege		

Tabela 18: continuação

Isolado	Espécie	Glicose	Galactose	Sorbose	Glucosamina	Ribose	Xilose	L-Arabinose	D-Arabinose	Rhamnose	Sacarose	Maltose	Trealose	α Dglucoside	Celobiose	Salicina	Arbutina	Melibiose	Lactose	Rafinose	Melezitose	Inulina	Amido	Glicerol	Eritritol	Ribitol	Xilitol	D-Glucitol	D-Manitol	
4AR2XL	<i>C. flavescens</i> ?	0.5	0	0	1	1	1	1	0	0		0.5	0	1	0	0.5	0	0	0	1	1	0		0.5	1	0.5	1	1		
1AR3Ya	<i>C. flavescens</i> ?	0.5	0	0	0	0.5	0	1	0	0		1	0.5	1	0	0	0	0	0	0.5	1	0		0	1	0		0	0.5	
CA1XLO-XL*	<i>C. flavescens</i>	1	1	0	0	1	1	1	1	0		0.5	1	0.5	0.5	0	0.5	1	0	1	0.5	0		0.5	1	1		1	0	
1MI7XLO-XL	<i>C. laurentii</i> ?	1	1	1	0.5	1	0.5	0.5	1	1		0.5	0.5	1	0.5	0	1	0	1	1	1	0		0	0	1		1	0.5	
2MI7XL-XL	<i>C. laurentii</i>	0.5	1	0.5	0.5	0	1	1	0.5	1		1	0.5	1	1	0.5	0.5	0	1	1	1	0		1	0	1		1	1	
2AL5XL-XL	<i>C. laurentii</i> ?	1	1	0	1	1	0	1	0	1		1	1	1	1	1	0.5	1	1	0.5	1	0		0	0	0		1	1	
2AB1XL-XL*	<i>C. laurentii</i>	1	1	0.5	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	0.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
AB1Yb*	<i>C. laurentii</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	0.5	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	
1AB1XL-XL*	<i>C. laurentii</i>	1	1	0	1	1	1	1	0.5	1		1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
4AB1XL-XL*	<i>C. laurentii</i>	1	1	0	1	1	1	1	0.5	1		1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0.5	1	1	1	1	1	1	1	
1AB1Ya	<i>C. laurentii</i>	1	1	0.5	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0.5	
1AB1B	<i>Cryptococcus</i> sp.	1	1	1	0	1	1	1	1	1		0.5	1	0.5	0.5	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1		1	1	
1AB1G	<i>C. laurentii</i>	0	1	0	0.5	1	1	1	0	1		1	1	0.5	1	0.5	0.5	1	1	1	0.5	0	1	0	1	0		0	0	
2AB1G	<i>C. laurentii</i>	1	0.5	0	0	1	0.5	1	0	1		0.5	0.5	1	1	0	1	1	0.5	1	1	0	1	0	1	0		0.5	0.5	
4AB1G	<i>C. laurentii</i>	1	1	0	0	1	1	1	0.5	1		1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0		0.5	0	
4AB1XL	<i>C. laurentii</i> ?	1	1	0	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
AB1G	<i>C. laurentii</i>	1	1	0	0.5	1	1	1	1	1		1	1	1	1	0.5	1	1	0.5	1	1	0.5	1	1	1	0		0.5	0.5	
2AB1Y	<i>C. laurentii</i>	1	1	0.5	1	1	1	1	0.5	1		1	1	1	1	0.5	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0		0.5	1
2MI6Y	<i>C. laurentii</i>	1	0.5	0	0	1	1	1	1	1		0.5	0.5	0.5	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
1MI8XLOc	<i>C. laurentii</i>	0.5	1	0	0	1	1	1	1	1		1	1	0.5	1	0	0	1	1	1	1	1	0		0.5	1	1		1	1
2MI8XL-Xla	<i>C. laurentii</i>	0.5	0.5	1	1	1	1	1	1	0.5	0.5	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0		0	1	1		1	1	
CA3XLO-XLb*	<i>C. laurentii</i> ?	1	1	1	0.5	1	1	1	1	0		1	1	1	0.5	1	1	1	1	1	1	0.5	0		0.5	1	1		1	1
1MI7XLOb*	<i>C. rajasthanensis</i>	1	1	0.5	1	1	0.5	0.5	1	1		0.5	1	1	1	0.5	1	0.5	1	1	1	1	0		0	0.5	1		1	0.5
1C1G	<i>C. nemorosus</i>	1	1	1	1	1	0.5	1	1	1		1	1	1	1	0.5	0.5	1	1	1	1	1	0.5	1	0	0.5	0.5		1	1
4C1G*	<i>C. nemorosus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	0.5		0.5	0.5	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0.5	1		1	1
4CA2XLa	<i>C. perniciosus</i> ?	1	1	1	1	1	1	1	1	0.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		1	1	1		1	1		
4AL2XL-XL	<i>C. daszewskae</i> ?	0.5	1	1	0	0	1	1	1	1		1	1	1	1	0	1	0.5	1	1	1	1	0	0.5	1	0.5	1		1	1
4AL2XL	<i>C. daszewskae</i> ?	1	1	0	0	0.5	1	1	1	1		1	1	0.5	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1		1	1
2AL4Gb	<i>Cryptococcus</i> sp. ?	0.5	0.5	0	0	0	1	1	0	1		0	0	0	1	0	0	1	0	0.5	0.5	0		0	1	0		0	0	
1MI9XLO	<i>Cryptococcus</i> sp.	0	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	0	1	0	0.5	1	1	1	1	1	0.5	0	0.5	1		1	1	
AB5XLO	<i>C. albidus</i>	1	1	0	0	1	1	1	1	0.5	1	1	0	0.5	0	0.5	1	0	1	0.5	0		0	1	1		1	0.5		
1AB5XLO-XL	<i>C. albidus</i>	0.5	1	0	0	0.5	0.5	0.5	1	1		0.5	1	0	1	0	0.5	1	0	1	0.5	0		0	1	1		1	0.5	
1AB4XLb	<i>Cryptococcus</i> sp. ?	0.5	0	0	0.5	0.5	0	0	0	0		0	0	0	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0		0	0		0	0	0.5	
2AB4XL	<i>Cryptococcus</i> sp. ?	0.5	1	0.5	1	1	0	0.5	1	1		0	0	0	0.5	0.5	0	1	1	1	1	0		0	0	1		0.5	1	
4AB6XL*	<i>A. pullulans</i>	1	1	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0	0	0	1	0.5	0	0	0.5	0.5	0		0.5	0.5	1		0.5	0.5		
2AB6XL	<i>A. pullulans</i>	0.5	1	1	0	0	1	1	0	0		0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0		1	0		1	1	1
2AB6XL-XL*	<i>A. pullulans</i>	1	0	0	0	0	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0.5	1	0.5	0	0	0.5	0		0	0	0		0	0.5		
4AB6XL-XL	<i>A. pullulans</i>	1	1	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0	1		0.5	0	0	0	1	0.5	0	0	0.5	0.5	0		0.5	0.5	1		0.5	1	
1AB6XL-XL	<i>A. pullulans</i>	0	1	0.5	0	0	0.5	1	0	0.5	1	0.5	0	0	1	1	0.5	0	1	1	0		1	0.5	0		0	0		
2AL5Y	<i>A. pullulans</i>	1	1	0	0	1	0	1	0	1		1	0.5	1	0	0	0	0.5	1	0.5	1	0		0	0		0.5	1	1	1

Tabela 18: continuação

Isolado	Espécie	Galactitol	Mio inositol	Lactato	Succinato	Citrato	Metanol	Etanol	Nitrato	Formação de amido	10% NaCl	15% NaCl	0,01% Ciclohexamida	0,1% Ciclohexamida	28oC	34oC	36oC	38oC	40oC	42oC	DBB	Ferm. glicose	Cor da colônia	Formato da célula	Brotamento
4AR2XL	<i>C. flavescens</i> ?	0	1							0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0			
1AR3Ya	<i>C. flavescens</i> ?	0	1							0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Branco	Oval	UMB
CA1XLO-XL*	<i>C. flavescens</i>	1	0							0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	B/R	Glob	UMB
1M17XLO-XL	<i>C. laurentii</i> ?	1	1						w	0	0.5	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	Glob	UMB
2M17XL-XL	<i>C. laurentii</i>	1	1							0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	Bege	G/O	UMB
2AL5XL-XL	<i>C. laurentii</i> ?	1	1						w	0	0.5	0	1	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	Glob	UMB
2AB1XL-XL*	<i>C. laurentii</i>	1	1						0					1							1	0	Bege		
AB1Yb*	<i>C. laurentii</i>	1	1						1	0	0.5	0		1							1	0	Bege		
1AB1XL-XL*	<i>C. laurentii</i>	1	1						0	0	1	0		1							1	0	Bege	G/O	UMB
4AB1XL-XL*	<i>C. laurentii</i>	1	1						0	0	1	0		1							1	0	Bege		
1AB1Ya	<i>C. laurentii</i>	1	1						0.5	0	0	0		1							1	0	Bege	Glob	UMB
1AB1B	<i>Cryptococcus</i> sp.	0.5	1						0	0	1	0		1							1	0	Bege	Oval	
1AB1G	<i>C. laurentii</i>	1	1						0	0	0	0		1							1	0	Bege		
2AB1G	<i>C. laurentii</i>	0.5	1						0	0	0	0		1							1	0	Bege	Oval	
4AB1G	<i>C. laurentii</i>	0	1						0	0	0	0		1							1	0	Bege	G/O	UMB
4AB1XL	<i>C. laurentii</i> ?	1	1						0.5	0	1	0		1							1	0	Bege		
AB1G	<i>C. laurentii</i>	1	1						0	0	0	0		1							1	0	Bege		
2AB1Y	<i>C. laurentii</i>	1	1						0	0	0	0		1							1	0	Bege		
2M16Y	<i>C. laurentii</i>	1	1						0	0	0	0	?	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	G/O	UMB
1M18XLOc	<i>C. laurentii</i>	1	1						0	1	0	0	0	0.5	1		0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	UMB
2M18XL-Xla	<i>C. laurentii</i>	0.5	1						w	0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	G/O	UMB
CA3XLO-XLb*	<i>C. laurentii</i> ?	0	1						w	0	0	0	0	0	1	1	1				1	0	Bege	Oval	UMB
1M17XLOb*	<i>C. rajasthanensis</i>	1	1						0	0	0.5	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Branco		
1C1G	<i>C. nemorosus</i>	1	1						0	0	0	0		1	0		0	0	0	0	1	0	Bege	O/A	UMB
4C1G*	<i>C. nemorosus</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0		1		0	0	0	0	0	1	0	Bege	O/A	UMB
4CA2XLa	<i>C. perniciosus</i> ?	0.5	1						0	0	0.5	0	1	0	1	1	1		0	0	1	0	Bege	Alon	UMB
4AL2XL-XL	<i>C. daszewskae</i> ?	1	1						0	0	1	0		1			0	0	0	0	1	0	Bege		
4AL2XL	<i>C. daszewskae</i> ?	1	1						0	0	1	0		1			0	0	0	0	1	0	Bege		
2AL4Gb	<i>Cryptococcus</i> sp. ?	?	1						0	1	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	O/A	UMB
1M19XLO	<i>Cryptococcus</i> sp.	1	1						w	0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	G/O	UMB
AB5XLO	<i>C. albidus</i>	1	1						1	0	1	0	1	0.5	1		0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	UMB
1AB5XLO-XL	<i>C. albidus</i>	1	0.5						0	0	0	0	0.5	0.5	1		0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	UMB
1AB4XLb	<i>Cryptococcus</i> sp.	1	0.5						0	0	0	0	0	0.5	1	0.5					1	0	Bege	Oval	UMB
2AB4XL	<i>Cryptococcus</i> sp. ?	1	0						w	0	0	0	0.5	0	1		0	0	0	0	1	0	Bege	Oval	UMB
4AB6XL*	<i>A. pullulans</i>	0	0.5						0	1	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	Preto	Oval	UMB
2AB6XL	<i>A. pullulans</i>	0	0						0	0	0	0	1	1	1	1	1				1	0	Preto	Oval	UMB
2AB6XL-XL*	<i>A. pullulans</i>	0	0						0.5	0	1	0	0	0	1		0	0	0	0	0	1	Preto	Oval	
4AB6XL-XL	<i>A. pullulans</i>	0	0.5						0	1	0	0	0	0	1		0	0	0	0	0	0	Preto		
1AB6XL-XL	<i>A. pullulans</i>	0.5	0						0.5	0	1	0	0	0	1		0	0	0	0	0	0	Preto		
2AL5Y	<i>A. pullulans</i>	1	0.5						1	0	0	0	1	1	1	1	1		0	0	0		Preto	O/A	UMB

Tabela 18: continuação

Isolado	Espécie	Glicose	Galactose	Sorbose	Glucosamina	Ribose	Xilose	L-Arabinose	D-Arabinose	Rhamnose	Sacarose	Maltose	Trealose	α Dglucoside	Celobiose	Salicina	Arbutina	Melibiose	Lactose	Rafinose	Melezitose	Inulina	Amido	Glicerol	Eritritol	Ribitol	Xilitol	D-Glucitol	D-Manitol	
1MI3Eb	<i>Candida sp. 2</i>	1	1	1	0	1	1	0	0.5	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	
1MI9E	<i>C. etchellsii</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0		1	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0		0.5	0	0		1	1	
1MI7Ya	<i>C. etchellsii</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0		1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		1	0	0		1	1
4MI7G	<i>C. sake</i>	1	1	1	0	0	1	0	0	0		1	1	1	0	0	0	0.5	0	0.5	1	0		0.5	0	0		1	1	
1AR3Yb	<i>C. etchellsii</i>	0.5	0.5	1	0	0	0	0	0	0		1	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0		0.5	0	0		0.5	1	
1CA1XLb	<i>Candida etchellsii</i>	0.5	0.5	1	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		1	0	0		0	0	
1MI7E*	<i>Candida etchellsii</i>	0.5	0.5	1	0	0	0	0	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0.5	0	0		1	1	
1MI3Gb	<i>Candida sake</i>	0.5	1	1	0	0	1	0	0	0			0.5	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.5		1	1	
1MI3Ea	<i>Candida sake</i>	0.5	1	1	1	1	1	0	0	0		1	0	0.5	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0.5		1	0.5	
MI7XLO	<i>Candida sake</i>	1	0.5	1	0	0	0.5	0	0	0		1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0		0	0	1		1	1	
4MI8XL-XL	<i>Candida sake</i>	1	1	1	0	0	1	0	0	0		1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0		0	0	0.5	1	1		
1MI8XL-XLa*	<i>Candida sp. 1</i>	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1		1	1	
1CA2Yb*	<i>Candida sp. 1</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0		0	0	
CA1XLO*	<i>Candida sp. 1</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		0	0
1MI4XL	<i>C. tropicalis</i>	1	1	1	0	0	1	0	0	0		1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0		0.5	0	0		1	1	
4AL4Y	<i>C. tropicalis</i>	1	1	0.5	0.5	0	0.5	1	0.5	0		1	1	1	1	0.5	0.5	0	0	0	1	0		1	0		1	1	1	
2AL4Y	<i>C. tropicalis</i>	0.5	1	1	1	0	1	1	0	0		1	1	1	1	0.5	1	0	0	1	1	0		1	0	1		1	1	
2MI7G	<i>C. tropicalis</i>	1	1	1	0	0	1	0	0	0		1	0.5	1	0	0	?	0	0	0	1	0		0	0	0.5	1	1		
2CA1XL-XLb*	<i>C. guilliermondii</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0.5	0	0		0	0	
4MI4Yb*	<i>C. guilliermondii</i>	1	1	1	1	0.5	0.5	1	1	0		1	1	1	1	1	1	0.5	0	1	1	1		1	0	1		1	1	
1MI8Ya*	<i>C. guilliermondii</i>	1	1	1	1	0.5	1	1	0.5	0		1	1	1	0.5	0.5	0.5	0	0	0.5	1	1		1	0	1		1	1	
1AB5Ya	<i>C. guilliermondii</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	0		1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0		1	0	1		1	1	
1AB5XL	<i>C. guilliermondii</i>	0.5	1	1	1	0.5	1	1	1	0		1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0		1	0	1		1	1	
1AB5XL-XL	<i>C. guilliermondii</i>	0.5	1	1	1	0.5	1	1	1	0		1	0.5	1	0.5	1	1	0.5	0	0.5	1	0		1	0	1		0.5	1	
4AB5Y	<i>C. guilliermondii</i>	0.5	1	1	0.5	0.5	1	1	1	0		1	1	1	1	0.5	1	1	0	1	1	0		1	0	0.5	1	1		
2AB5Y	<i>C. guilliermondii</i>	0.5	1	1	1	0	1	1	0.5	0		1	0.5	1	1	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	1		0	1	0		1	1	
4AB5XL	<i>C. guilliermondii</i>	1	1	1	1	0.5	1	1	1	0		1	1	1	1	0.5	1	0.5	0	1	1	0		1	0.5	1		1	1	
4AB5XL-XL	<i>C. guilliermondii</i>	1	1	1	1	0.5	1	1	1	0		1	0.5	1	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5	1	0		1	0	1		1	1	
2AB5XL-XL	<i>C. famata</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	0		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		1	0	1		1	1	
2AB5XL	<i>C. guilliermondii</i>	0.5	1	1	1	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0		1	0	1		1	1	
1AB5Yb	<i>C. guilliermondii</i>	1	1	1	1	0.5	1	1	1	0		1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0		0.5	0	1		1	1	
4AL5Y	<i>C. guilliermondii</i>	1	1	0	1	0	1	0.5	0.5	0		0.5	0.5	1	1	1	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0.5	1	0	1		1	0.5		
2AL6Ya	<i>C. guilliermondii</i>	1	1	1	1	0	1	1	0	0		1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0		1	0	1		1	1	
2AL6Yb	<i>D. occidentalis</i>	1	1	1	1	0	1	1	0.5	0		1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0		1	0	1		1	1	
4AL6Y	<i>D. occidentalis</i>	1	1	1	1	0	1	1	0.5	0		1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0		1	0	1		1	1	
1AB6Y	<i>D. occidentalis</i>	1	1	1	0.5	0.5	1	1	1	0		1	1	1	1	1	0.5	1	0.5	1	1	0		1	0	1		1	1	
2AB6Y	<i>D. occidentalis</i>	0.5	1	0.5	0.5	0	1	1	0.5	0		1	0.5	1	1	0.5	0.5	0	0	0.5	1	0		1	0	1		1	1	
4AB6Y	<i>D. occidentalis</i>	1	1	1	1	0.5	1	1	1	0		1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0		1	0	1		1	1	
4AR2Y	<i>C.pseudointermedia</i>	0.5	1	1	1	0.5	1	0.5	0.5	1		0.5	0.5	1	1	1	1	0	1	0	1	0		0	0	1		1	1	
2AR2Y*	<i>C.pseudointermedia</i>	1	1	1	0.5	0	1	0	0.5	1		1	1	1	1	1	1	0	1	0.5	1	0		0	0	0.5	1	1		

Tabela 18: continuação

Isolado	Espécie	Galactitol	Mio inositol	Lactato	Succinato	Citrato	Metanol	Etanol	Nitrato	Formação de amido	10% NaCl	15% NaCl	0,01% Ciclohexamida	0,1% Ciclohexamida	28oC	34oC	36oC	38oC	40oC	42oC	DBB	Ferm. glicose	Cor da colônia	Formato da célula	Brotamento		
1M13Eb	<i>Candida sp. 2</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0			1				0	0	0	0	0	1	Branco	Along	UMP
1M19E	<i>C. etchellsii</i>	0	0							0	1	0	0	0	1			0	0	0	0	0	1	Branco	Glob	UMP	
1M17Ya	<i>C. etchellsii</i>	0	0							0	1	0	0	0	1			0	0	0	0	0	1	Branco			
4M17G	<i>C. sake</i>	0	0							0	0	0	1	0	1			0	0	0	0	0	1	Branco	Glob	UMP	
1AR3Yb	<i>C. etchellsii</i>	0	0							0	1	0	0	0	1			0	0	0	0	0	1	Branco			
1CA1XLb	<i>Candida etchellsii</i>	0	0							0	0.5	0	0	0	1	1	1		0	0	0	0	1	Branco			
1M17E*	<i>Candida etchellsii</i>	0	0							0	1	0	0	0	1			0	0	0	0	0	1	Branco			
1M13Gb	<i>Candida sake</i>	0	0						0	0	0	0			1							0	1	Branco			
1M13Ea	<i>Candida sake</i>	0	0						0	0	1	0			1							0	w	Branco	Oval		
MI7XLO	<i>Candida sake</i>	0	0							0	0	0	0.5	0	1			0	0	0	0	0	1	Branco			
4M18XL-XL	<i>Candida sake</i>	0	0							0	0	0	0.5	0	1			0	0	0	0	0	1	Branco			
1M18XL-XLa*	<i>Candida sp. 1</i>	0	0	0	0	1	0		w	0	0	0	1	0	1			0	0	0	0	0	w	Branco	G/O	UMP	
1CA2Yb*	<i>Candida sp. 1</i>	0	0	0	0	0	0	0	w	0	0	0	0	0	1	1	1		0	0	0	0	0	Branco	O/A	UMP	
CA1XLO*	<i>Candida sp. 1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1		0	0	0	0	0	Branco	O/A	UMP	
1M14XL	<i>C. tropicalis</i>	0	0							0	0	0	0.5	0	1			0	0	0	0	0	1	Branco			
4AL4Y	<i>C. tropicalis</i>	0	0							0	0	0	1	1	1	1	1		0	0	0	0	1	Branco	Oval		
2AL4Y	<i>C. tropicalis</i>	0	0							0	0.5	0	0.5	1	1	1	1					0	1	Branco			
2M17G	<i>C. tropicalis</i>	0	1						1	0	0	0	1	0	1			0	0	0	0	0	1	Branco			
2CA1XL-XLb*	<i>C. guilliermondii</i>	0	0						w	0	0.5	0	0	0	1	1	0.5		0	0	0	0	1	Branco	O/A	UMP	
4M14Yb*	<i>C. guilliermondii</i>	1	0							0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	Branco			
1M18Ya*	<i>C. guilliermondii</i>	0.5	0						1	0	1	0.5	1	1	1	1	1	1	0.5	0	0	0	1	Branco	Oval	UMP	
1AB5Ya	<i>C. guilliermondii</i>	1	0							0	1	0	1	1	1	1	1		0.5	0	0	0	1	Branco			
1AB5XL	<i>C. guilliermondii</i>	1	0						w	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	Branco				
1AB5XL-XL	<i>C. guilliermondii</i>	1	0							0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	Branco	Oval	UMP	
4AB5Y	<i>C. guilliermondii</i>	0.5	0							0	1	0	1	1	1	1	1		0	0	0	0	1	Branco	Oval	UMP	
2AB5Y	<i>C. guilliermondii</i>	1	0							0	0.5	0	1	1	1	1	0.5				0	1	Branco				
4AB5XL	<i>C. guilliermondii</i>	1	0							0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	Branco	Oval	UMP		
4AB5XL-XL	<i>C. guilliermondii</i>	1	0							0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	Branco	Oval	UMP		
2AB5XL-XL	<i>C. famata</i>	1	0							0	1	0	1	1	1	1	1				0	1	Branco				
2AB5XL	<i>C. guilliermondii</i>	1	0							0	1	0	1	1	1	1	1				0	1	Branco				
1AB5Yb	<i>C. guilliermondii</i>	1	0							0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	Branco				
4AL5Y	<i>C. guilliermondii</i>	0.5	0						w	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0		0	1	Branco	Oval	UMP		
2AL6Ya	<i>C. guilliermondii</i>	0.5	0							0	0.5	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	Branco				
2AL6Yb	<i>D. occidentalis</i>	1	0							0	0.5	0	1	1	1		1	1	1	1	0	1	Branco	G/O/A	UMP		
4AL6Y	<i>D. occidentalis</i>	0.5	0						w	0	0.5	0	1	1	1	1	1		0	0	0	1	Branco	G/O	UMP		
1AB6Y	<i>D. occidentalis</i>	1	0							0	0.5	1	1		1	1	1				0	1	Branco				
2AB6Y	<i>D. occidentalis</i>	0.5	0							0	0.5	0	0.5	0.5	1	1	1				0	1	Branco				
4AB6Y	<i>D. occidentalis</i>	0.5	0							0	1	0	1	1	1		0	0	0	0	0	1	Branco				
4AR2Y	<i>C.pseudointermedia</i>	0.5	0							0	0.5	0	0.5	0	1	1	0.5				0		Branco				
2AR2Y*	<i>C.pseudointermedia</i>	1	0							0	0.5	0	0.5	0	1		0	0	0	0	0	0	1	Branco			

Tabela 18: continuação

Isolado	Espécie	Glicose	Galactose	Sorbose	Glucosamina	Ribose	Xilose	L-Arabinose	D-Arabinose	Rhamnose	Sacarose	Maltose	Trealose	α Dglucoside	Celobiose	Salicina	Arbutina	Melibiose	Lactose	Rafinose	Melezitose	Inulina	Amido	Glicerol	Eritritol	Ribitol	Xilitol	D-Glucitol	D-Manitol	
MI3XLO	<i>C. pseudointermedia</i>	1	1	1	0.5	0	1	1	1	0		1	1	1	1	1	1	0	1	0.5	1	0	0	0	0	1		1	1	
2MI3Y *	<i>C. pseudointermedia</i>	0.5	1	1	0.5	0	1	0.5	1	1		1	0.5	0.5	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0.5	0	1		1	1	
MI3E *	<i>C. pseudointermedia</i>	1	1	1	0.5	0	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	0	1	0.5	1	0	0	0	0	1		1	1	
1MI3B*	<i>C. pseudointermedia</i>	1	1	1	0.5	0	1	0.5	1	0		1	0.5	0.5	1	1	1	0	1	0.5	1	0	0	0	0	1		1	1	
1MI3Ya*	<i>C. pseudointermedia</i>	1	1	1	0.5	0	1	0.5	1	1		1	0.5	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1		1	1	
1MI3XL*	<i>C. pseudointermedia</i>	1	1	1	0.5	0	1	0.5	1	0		1	0	1	1	1	0.5	0	1	0.5	1	0	0	0	0	1		1	1	
2MI3XL*	<i>C. pseudointermedia</i>	0.5	1	1	0.5	0	1	0.5	1	0		1	0.5	0.5	1	1	1	0	1	0.5	1	0	0	0	0	1		1	1	
2MI3XL-XL*	<i>C. pseudointermedia</i>	0.5	1	1	0.5	0	1	0.5	1	0		1	0.5	0.5	1	1	1	0	1	0.5	1	0	0	0	0	1		1	1	
2MI3G*	<i>C. pseudointermedia</i>	0.5	1	1	0.5	0	1	0.5	1	1		1	0.5	0.5	1	1	1	0	1	0.5	1	0	0	0	0	1		1	1	
4MI3XL-XL*	<i>C. pseudointermedia</i>	0.5	1	1	0.5	0	1	0.5	1	0		1	1	1	1	1	1	0	1	0.5	1	0	0	0	0	1		1	1	
4MI3XL	<i>C. pseudointermedia</i>	0.5	1	1	0.5	0	1	0.5	1	0		1	1	1	1	1	1	0	1	0.5	1	0	0	0	0	1		1	1	
4MI3Y	<i>C. pseudointermedia</i> ?	1	1	1	0	0	0	0	0.5	1		0	1	1	0.5	0.5	0	0	0.5	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	
1MI3XL-XL	<i>C. pseudointermedia</i>	0.5	1	1	0.5	0	1	0.5	1	0		1	0.5	1	1	1	1	0	1	0.5	1	0	0	0	0	1		1	1	
MI3B	<i>C. pseudointermedia</i>	0.5	1	1	1	0	1	0.5	1	1		1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1		1	1	
MI3XLO-XL	<i>C. pseudointermedia</i>	1	1	1	0.5	0	1	1	1	0		1	1	1	1	1	1	0	1	0.5	1	0	0	0	0	1		1	1	
4MI3Gb	<i>C. pseudointermedia</i>	0.5	1	1	0.5	0	1	0.5	1	0		1	1	0.5	1	1	1	0	1	0.5	1	0	0	0	0	1		1	1	
MI3G	<i>C. pseudointermedia</i>	0.5	1	1	0.5	0	1	0.5	1	1		1	0.5	0.5	1	1	1	0	1	0.5	1	0	0	0	0	1		1	1	
1MI3Yb	<i>C. pseudointermedia</i>	0.5	1	1	0	0	1	0	0.5	1		1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	
4MI6XL*	<i>C. pseudointermedia</i>	1	1	0	0.5	1	1	1	1	1		1	1	1	1	0.5	0.5	1	0	1	1	0		1	1	1		1	1	
2MI9Y*	<i>C. pseudointermedia</i>	1	0.5	1	0.5	0	1	0	0.5	1		0.5	0.5	1	1	0	1	0	1	0.5	1	0		0	0	0.5	1	1		
4MI9Y*	<i>C. pseudointermedia</i>	1	1	1	1	0	1	0	1	1		0.5	1	1	1	1	1	0	1	0.5	1	0		0	0	0.5	1	1		
1MI9Y	<i>C. pseudointermedia</i>	1	1	0.5	0.5	0	1	0	1	1		1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0		0	0	1		1	1	
2AR3Y*	<i>C. pseudointermedia</i>	1	1	1	1	0	1	0	0.5	1		0.5	1	0.5	1	1	1	0	1	0.5	1	0		0	0	0.5	1	1		
1AB5Ga	<i>Candida intermedia</i> ?	0	1	0.5	1	1	0.5	0.5	1	0.5	0.5	0	0	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	0		1	1	0		0.5	0.5		
2AL4Ga*	<i>C. saopaulonensis</i>	0.5	0	0	0	0	0.5	1	0.5	0.5	0.5	0	0	0.5	0	0	0	0	0.5	0.5	0		0	1	0		0	0		
1AR2Y*	<i>C. saopaulonensis</i>	1	1	1	1	0	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0		0	0	1		1	1	
4MI3Ga*	<i>C. saopaulonensis</i>	1	1	1	0	0	1	0	0	1		1	1	1	1	0.5	0	0	0.5	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	
1MI7G*	<i>C. saopaulonensis</i>	1	0.5	1	0	0	0	0	0	0		1	1	1	0	0	0	0	0	0.5	1	0		0.5	0	0		1	1	
1MI7XLOa*	<i>C. saopaulonensis</i>	1	0.5	1	0	0	0	0	0	0		0.5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0		0	0	0	1	1	
MI7XLO-XLb*	<i>C. saopaulonensis</i>	1	1	1	0	0	0.5	0	0	0		1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0		0	0	1		1	1
2MI8XL*	<i>C. saopaulonensis</i>	1	0.5	1	0	0	1	0	0	0		1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0		0	0	1		1	1	
2MI8XL-XLc*	<i>C. saopaulonensis</i>	0.5	0.5	1	0	0	0.5	0	0	0		0.5	0.5	0.5	0	0	1	0	0	0	1	0		0	0	0.5	0.5	1		
1MI8XLb*	<i>C. saopaulonensis</i>	1	1	1	0	0	0.5	0	0	0		1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0		0.5	0	0		1	1	
2MI8Y	<i>C. saopaulonensis</i>	1	0.5	1	1	0	1	0	0.5	0		0.5	0.5	0.5	1	1	1	0	1	0.5	1	0		0	0	0.5	1	1		
4MI8XL*	<i>C. saopaulonensis</i>	1	1	1	0	0	1	0	0	0		1	0.5	1	0	0	0	0	0	0	1	0		0	0	0.5	1	1		
1MI7XLb	<i>Candida etchelsii</i> ?	0.5	1	1	0	0.5	0	0	0	0		1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		1	0	0		1	1	
1MI8E	<i>Candida etchelsii</i> ?	0.5	1	1	0	0	0	0	0	0		1	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0		0.5	0	0		1	1	
1AR1Yb	<i>Candida sorbosa</i> ?	0.5	0	1	0	0	0	0	0	0		0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0		0.5	1	
2AR1Y	<i>Candida famata</i> ?	1	1	1	0.5	0	1	0.5	0	1		0.5	0.5	0.5	1	1	1	0	1	0.5	1	0		0	0	0.5	1	1		
1AB2XLb	<i>P. wickerhamii</i>	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0	0		0	1	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tabela 18: continuação

Isolado	Espécie	Galactitol	Mio inositol	Lactato	Succinato	Citrato	Metanol	Etanol	Nitrato	Formação de amido	10% NaCl	15% NaCl	0,01% Ciclohexamida	0,1% Ciclohexamida	28oC	34oC	36oC	38oC	40oC	42oC	DBB	Ferm. glicose	Cor da colônia	Formato da célula	Brotoamento
MI3XLO	<i>C. pseudointermedia</i>	1	0						0.5	0	1	0			1						0	1	Branco	Oval	UMP
2MI3Y *	<i>C. pseudointermedia</i>	1	0	0	1	0	0	1	0.5	0	1	0			1						0	1	Branco	Oval	UMP
MI3E *	<i>C. pseudointermedia</i>	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0			1						0	1	Branco	O/A	UMP
1MI3B*	<i>C. pseudointermedia</i>	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0			1						0	1	Branco	G/O	UMP
1MI3Ya*	<i>C. pseudointermedia</i>	1	0	0	1	0	0	1	0.5	0	1	0			1						0	1	Branco	G/O	UMP
1MI3XL*	<i>C. pseudointermedia</i>	1	0	0	1	0	0	1	0.5	0	1	0			1						0	1	Branco		
2MI3XL*	<i>C. pseudointermedia</i>	1	0	0	1	0	0	1	0.5	0	1	0			1						0			G/O	UMP
2MI3XL-XL*	<i>C. pseudointermedia</i>	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0			1						0	1	Branco	Oval	UMP
2MI3G*	<i>C. pseudointermedia</i>	1	0	0	1	0	0	1	0.5	0	1	0			1						0	1	Branco	Oval	UMP
4MI3XL-XL*	<i>C. pseudointermedia</i>	1	0	0	1	0	0	1	0.5	0	1	0			1						0	1	Branco		
4MI3XL	<i>C. pseudointermedia</i>	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0			1						0	1	Branco		
4MI3Y	<i>C. pseudointermedia</i> ?	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0.5				0	1	Branco		
1MI3XL-XL	<i>C. pseudointermedia</i>	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0			1						0	1	Branco		
MI3B	<i>C. pseudointermedia</i>	1	0						0.5	0	1	0			1						0	1	Branco	G/O	UMP
MI3XLO-XL	<i>C. pseudointermedia</i>	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0			1						0	1	Branco	G/O/A	UMP
4MI3Gb	<i>C. pseudointermedia</i>	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0			1						0	1	Branco		
MI3G	<i>C. pseudointermedia</i>	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0			1						0	1	Branco	O/A	UMP
1MI3Yb	<i>C. pseudointermedia</i>	0.5	0	0	1	0	0	1		0	0	0	1	0	1	1	0.5				0	1	Branco	O/A	UMP
4MI6XL*	<i>C. pseudointermedia</i>	1	1						0	0	1	0	1	1	1		0	0	0	0	0	1	Bege	Oval	UMP
2MI9Y*	<i>C. pseudointermedia</i>	0.5	0						1	0	0.5	0	0	0	1		0	0	0	0	0	1	Branco		
4MI9Y*	<i>C. pseudointermedia</i>	0.5	0						0	1	0	0	0	0	1	1	1		0	0	0	1	Branco		
1MI9Y	<i>C. pseudointermedia</i>	0.5	0						w	0	1	0	0.5	0	1	1	1		0	0	0	1	Branco	O/A	UMP
2AR3Y*	<i>C. pseudointermedia</i>	0	0						w	0	1	0	0	0	1		0	0	0	0	0	1	Branco		
1AB5Ga	<i>Candida intermedia</i>	1	0						0	1	0	0	0	0	1		0	0	0	0	0	1	Branco	O/A	UMP
2AL4Ga*	<i>C. saopaulonensis</i>	1	1						w	0	0.5	0	0	0	1		0	0	0	0	0	1	Bege	Alon	UMP
1AR2Y*	<i>C. saopaulonensis</i>	1	0						w	0	1	0	0.5	0	1	1	0.5		0	0	0	1	Branco		
4MI3Ga*	<i>C. saopaulonensis</i>	0	0	0		0	0	1	0	0	0	0	0.5	0	1		0	0	0	0	0	1	Branco		
1MI7G*	<i>C. saopaulonensis</i>	0	0							0	0	0	1	0	1		0	0	0	0	0	1	Branco		
1MI7XLOa*	<i>C. saopaulonensis</i>	0	0							0	0	0	0.5	0	1		0	0	0	0	0	1	Branco	G/O	UMP
MI7XLO-XLb *	<i>C. saopaulonensis</i>	0	0						w	0	0	0	0.5	0	1		0	0	0	0	0	1	Branco	Glob	UMP
2MI8XL*	<i>C. saopaulonensis</i>	0	0							0	0	0	1	0	1		0	0	0	0	0	1	Branco		
2MI8XL-XLc*	<i>C. saopaulonensis</i>	0	0							0	0	0	1	0	1		0	0	0	0	0	1	Branco		
1MI8XLb*	<i>C. saopaulonensis</i>	0	0							0	0	0	1	0	1		0	0	0	0	0	0	Branco		
2MI8Y	<i>C. saopaulonensis</i>	0.5	0							0	0.5	0	0.5	0	1		0	0	0	0	0	1	Branco		
4MI8XL*	<i>C. saopaulonensis</i>	0	0							0	0	0	0.5	0	1	1	0.5	0	0	0	0	1	Branco		
1MI7XLb	<i>Candida etchelsii</i> ?	0	0						1	0	1	0	0	0	1		0	0	0	0	0	1	Branco	Glob	UMP
1MI8E	<i>Candida etchelsii</i> ?	0	0							0	1	0	0	0	1		0	0	0	0	0	1	Branco	Glob	UMP
1AR1Yb	<i>Candida sorbosa</i> ?	0	0							0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	0	1	Branco		
2AR1Y	<i>Candida famata</i> ?	0.5	0							0	0.5	0	0.5	0	1	1	0.5				0	1	Branco		
1AB2XLb	<i>P. wickerhamii</i>	0	0						1	0	0	0			1						0	0	Branco		

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)