

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

TESE

**Diversidade e Ecofisiologia de Leveduras em Plantio Orgânico
de Cana-de-Açúcar**

José Roberto de Assis Ribeiro

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**DIVERSIDADE E ECOFISIOLOGIA DE LEVEDURAS EM
PLANTIO ORGÂNICO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

JOSÉ ROBERTO DE ASSIS RIBEIRO

Sob a Orientação do Professor

Ricardo Luis Louro Berbara

e Co-orientação dos Professores

Allen Norton Hagler e

Norma Gouvêa Rumjanek

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2009

576.15

R484d

T

Ribeiro, José Roberto de Assis, 1970-.

Diversidade e ecofisiologia de leveduras em plantio orgânico de cana-de-açúcar/ José Roberto de Assis Ribeiro – 2009.

167 f. : il.

Orientador: Ricardo Luis Louro Berbara.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Bibliografia: f. 111-125.

1. Ecologia microbiana – Teses. 2. Cana-de-açúcar - Cultivo - Teses. 3. Leveduras (Fungos) – Teses. 4. Agricultura orgânica - Teses. I. Berbara, Ricardo Luis Louro, 1957-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que citados fonte e autor.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO**

JOSÉ ROBERTO DE ASSIS RIBEIRO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

TESE APROVADA EM 27/02/2009

Ricardo Luis Louro Berbara. Ph.D. UFRRJ

Denise Maria Mano Pessôa. Dra. PUC-Rio

Verônica Massena Reis. Dra. Embrapa Agrobiologia

Fabio Vieira de Araújo. Dr. UERJ

Andrew Macrew. Ph.D. UFRJ

AGRADECIMENTOS

- A Aretha pelo companheirismo e carinho;
- A Hélia e Cesar Ribeiro pela dedicação;
- Aos colegas do Laboratório de Taxonomia de Levedura e de Biotecnologia Sustentável da UFRJ;
- Aos colegas do laboratório de Biologia do Solo e de Nutrição de Plantas da UFRRJ;
- Aos orientadores Ricardo Berbara e Norma Rumjanek que de diferentes formas contribuíram para realização deste trabalho;
- Ao Professor Allen Hagler pela dedicação e compromisso com a formação acadêmica;
- Ao CNPq e PRONEX pelo suporte financeiro;
- Na UFRJ aos laboratórios, equipes e seus coordenadores que contribuíram com pequenas coisas que fazem uma grande falta: no Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, laboratórios de Actinomicetos, de Estrutura de Microorganismos, de Proteases de Microorganismos; no Instituto de Biologia, laboratório de Genética Molecular Vegetal;
- Na Embrapa Agrobiologia: laboratório de Bioquímica, de Ecologia Microbiana Molecular, e de Ecologia Molecular, em especial à Aline Macedo, Jean Luis S. Araújo e Francisco A. de Souza.
- Aos idealizadores do SIPA e a UFRRJ, Embrapa-Agrobiologia e Pesagro-Rio pela manutenção de uma área de produção e experimentação agropecuária voltada para a sustentabilidade, que inspira diversos trabalhos acadêmicos sobre o assunto.

RESUMO

RIBEIRO, José Roberto de Assis. **Diversidade e ecofisiologia de leveduras em plantio orgânico de cana-de-açúcar**. 2009. 158p. Tese (Doutor em Ciências em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

O solo é considerado tradicionalmente um ambiente repositório para as leveduras de outros habitats e não um local especial onde possam estabelecer populações autóctones. Devido à escassez de dados, este grupo de fungos, amplamente disperso, não é incluído nas discussões gerais na área de Microbiologia do Solo. Recentemente, alguns autores demonstraram seu potencial uso na agricultura, principalmente nas interações simbióticas micorrízicas e rizóbio/ leguminosa e no antagonismo a patógenos. O crescimento de fungos filamentosos nos meios de isolamento é uma das causas para a carência de estudos com comunidades de leveduras nesta área. Portanto, desenvolver metodologias que permitam aperfeiçoar esse isolamento é fundamental para o desenvolvimento de novas pesquisas e a melhor compreensão da ecologia destes organismos. Com o objetivo de rever as populações de leveduras na raiz, na folha e no solo de uma área de produção orgânica de cana-de-açúcar, foi desenvolvido um protocolo de isolamento de amostras que possuem uma grande quantidade de propágulos de fungos filamentosos. Neste protocolo foram utilizados os métodos de espalhamento em placa, para avaliar as populações prevalentes, e de enriquecimento para as populações menores ou que são inibidas nas placas. Posteriormente, foi realizada uma etapa de triagem, com meios diferenciais, para diminuir os isolamentos redundantes. Amostras compostas, relativamente grandes para a inclusão das populações presentes em micro-habitats, foram realizadas no período seco e chuvoso. Foram observadas diferenças na composição das comunidades de leveduras presentes no solo, no rizoplano e no filoplano. As espécies prevalentes no solo foram *Torulaspora globosa*, *Pichia caribbica* e *Cryptococcus podzolicus* nas duas estações. *Aureobasidium pullulans* e espécies basidiomicéticas de *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula marina* e *Pseudozyma* spp., com *P. aff. pruni* e *P. jejuensis*, foram prevalentes nas folhas. Na raiz a dominância foi dividida entre as espécies ascomicéticas, *P. caribbica* e *Candida aff. azyma*, e basidiomicéticas, *Cryptococcus laurentii* e *C. podzolicus*. Quando as raízes estavam metabolicamente ativas, o conjunto de leveduras ascomicéticas foi incrementado por diversas espécies fermentativas, indicando um efeito rizosférico sobre estas leveduras. O cultivo por vários métodos permitiu a obtenção de mais de 700 isolados de cana-de-açúcar e do solo associado ao cultivo, incluindo 24 espécies ascomicéticas e 45 espécies basidiomicéticas de leveduras e organismos similares a levedura. Estes isolados foram identificados por caracterização fenotípica convencional e por sequenciamento parcial do rDNA. Mais de 40 % das sequências de rDNA D1/D2 tiveram menos de 99% de similaridade com sequências de culturas tipos de espécies descritas, sugerindo serem de espécies novas. Em especial são as prováveis novas espécies próximas a *Candida tsuchiyae* e *C. azyma*, entre os ascomicetos, e várias espécies novas de *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Pseudozyma*, entre os basidiomicetos. Uma provável nova espécie próxima ao fungo dimófico *Lecythophora decumbens* também foi encontrada. Nossos dados mostraram que o solo, principalmente associado com raízes ativas de plantas, possui uma rica diversidade de leveduras. Esta biodiversidade pode ser estudada pela aplicação de métodos apropriados de cultivo e pode contribuir como uma fonte de novas culturas para aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: Ecologia Microbiana do Solo. Cultivo de Leveduras. Comunidades.

ABSTRACT

RIBEIRO, José Roberto de Assis. **Yeast diversity and physiology in organically cultivated sugar cane.** 2009. 158p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Soil is traditionally known as a repository for yeasts from diverse habitats and not an environment where they can establish autochthonous populations. Because of the scant data available, this widely distributed group of fungi is not frequently included in general discussions about soil microbiology. Recently, some authors have shown a potential use of yeasts in agriculture for mycorrhizal and rhizobia/leguminous symbioses and pathogen antagonism. The growth of filamentous fungi on isolation media has contributed to the low number of studies on yeasts in soil communities. Therefore, a key factor for increasing and improving soil yeast ecology studies was development of a protocol that could inhibit mycelial growth, but permit good recovery of yeasts. A protocol was developed for isolating yeasts from samples with many mold propagules in order to survey populations on rhizoplane, phyloplane, and in bulk soil of an organically cultivated sugar cane field. It consisted of a plating methods to access fast growing prevalent populations, and enrichment media for smaller populations or those inhibited on plates. This was followed by a screening step with differential media, to diminish the redundant isolates. Relatively large composite samples were used to include populations distributed in different microhabitats. Samples were taken during both the dry and wet seasons. Different yeast community structures were found for bulk soil, root and leaf surface. The yeasts prevalent in soil were *Torulaspota globosa*, *Pichia caribbica* and *Cryptococcus podzolicus* in both seasons. *Aureobasidium pullulans* and basidiomycetes yeasts of *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula marina* and *Pseudozyma* spp. with *P. aff. pruni* and *P. jejuensis*, were prevalent on leaves. Whereas on roots community dominance was shared by ascomycetous yeasts, specially comprised by *P. caribbica* and *Candida aff. azyma*, and by basidiomycetes species *Cryptococcus laurentii* and *C. podzolicus*. When plant roots were metabolically active the ascomycetous yeast guild was increased by several fermentative species, indicating that there was a rhizosphere effect on them. Cultivation by various methods allowed the isolation over 700 cultures including 24 ascomycetes and 45 basidiomycetes species of yeasts and yeast like organisms from sugar cane and associated soil. These isolates were identified by conventional phenotypic characterization and rDNA partial sequencing methods. More than 40 % of the species had D1/D2 rDNA sequences with less than 99 % of similarity to the type cultures of known species suggesting that they are new species. Of special note were probable new species similar to *Candida tsuchiyae* and *C. azyma* among the ascomycetes and various *Cryptococcus*, *Rhodotorula* and *Pseudozyma* species among the basidiomycetes. A probable new species similar to the dimorphic fungus *Lecythophora decumbens* was also discovered. Our data showed soil, especially when associated with roots of actively growing plants, to be a rich source of yeast biodiversity. This diversity can be studied by application of appropriate cultivation methods and could contribute as a source for novel cultures for application in biotechnology.

Key words: Soil Microbial Ecology. Yeast Cultivation. Yeast Guild.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1.	O que é uma Levedura?	3
2.2.	Taxonomia e Identificação de Leveduras	4
2.3.	Filogenia de Leveduras	7
2.4.	Isolamento de Leveduras de Solo	8
2.5.	Levedura no Rizoplano, Filoplano e Solo.....	11
2.6.	Ecologia de Leveduras	23
2.6.1.	Solo	23
2.6.2.	Plantas – rizosfera e filoplano	24
2.6.3.	Animais	24
2.6.4.	Fungos	26
2.6.5.	Micorrizas	28
2.6.6.	Procariotos.....	29
2.7.	A Cultura da Cana-de-Açúcar no Brasil	31
3.	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1.	Local de Coleta das Amostras	33
3.2.	Amostragem e Coleta.....	34
3.3.	Análise da Diversidade de Leveduras em Cana-de-Açúcar	36
3.3.1.	Plaqueamento, contagem e isolamento de leveduras.....	36
3.3.2.	Triagem dos isolados	37
3.3.3.	Identificação dos isolados	37
3.4.	Cultivo e Manuseio de Culturas de Leveduras.....	37
3.5.	Caracterização e Identificação de Leveduras: Metodologia Clássica.....	38
3.5.1.	Características morfológicas das células.....	38
3.5.2.	Testes fisiológicos	38
3.5.3.	Assimilação de fonte de carbono.....	39
3.5.4.	Assimilação de fonte de nitrogênio	39
3.5.5.	Fermentação de fontes de carbono	39
3.5.6.	Teste de reação ao corante azul de diazonium B (DBB-diazonium blue B).....	39
3.5.7.	Outros testes	40
3.5.8.	Controle dos experimentos.....	40
3.5.9.	Leitura dos testes realizados em placa	41
3.5.10.	Leitura dos testes realizados em tubos.....	43
3.6.	Identificação de Atividade Micocinogênica.....	43
3.7.	Assimilação de Ácidos Orgânicos pelos Isolados	43
3.8.	Caracterização Molecular das Culturas	43
3.8.1.	Extração de ácidos nucleicos (ADN).....	44
3.8.2.	Amplificação de fragmentos da região estudada.....	45
3.8.3.	Quantificação e determinação do tamanho do fragmento amplificado	46
3.8.4.	Reação de sequenciamento.....	46
3.8.5.	Análise das seqüências.....	46
3.9.	Identificação a partir dos Perfis Morfo-fisiológicos.....	47

3.10.	Desenvolvimento de Método para Isolamento de Leveduras	47
3.10.1.	Resistência das leveduras ao NaCl	47
3.10.2.	Inibição do crescimento de fungos filamentosos em isolamento de leveduras.....	48
3.10.3.	Teste de meios para isolamento de leveduras	49
3.11.	Desenvolvimento de Método de Triagem de Isolados de Leveduras	52
3.11.1.	Meios diferenciais.....	52
3.11.2.	Morfologia das colônias e fermentação	54
3.11.3.	Teste de inóculo para a triagem.....	54
3.11.4.	Validação do método de triagem.....	54
4.	RESULTADOS	56
4.1.	Diversidade de Leveduras em Cana-de-Açúcar	56
4.2.	Otimização das Condições de Extração e da Reação de Amplificação	72
4.2.1.	Extração de ácidos nucleicos.....	72
4.2.2.	Amplificação dos fragmentos.....	73
4.3.	Metodologia de Isolamento	75
4.3.1.	Teste de resistência das leveduras ao NaCl.....	75
4.3.2.	Inibição do crescimento de fungos filamentosos por NaCl e filtragem.....	77
4.3.3.	Teste de meios de cultura para isolamento	79
4.4.	Desenvolvimento de Método de Triagem para Leveduras	83
4.5.	Validação da Metodologia de Triagem.....	87
5.	DISCUSSÃO.....	91
5.1.	Diversidade de Leveduras em Cana-de-Açúcar	91
5.2.	Otimização das Condições de Extração e da Reação de Amplificação	99
5.2.1.	Extração de ácidos nucleicos.....	99
5.2.2.	Amplificação dos fragmentos.....	99
5.3.	Metodologia de Isolamento	101
5.3.1.	Teste de resistência das leveduras ao NaCl.....	101
5.3.2.	Inibição do crescimento de fungos filamentosos por NaCl e filtragem.....	101
5.3.3.	Teste de meios de cultura para isolamento	103
5.4.	Desenvolvimento de Método de Triagem para Leveduras	105
5.5.	Validação da Metodologia de Triagem.....	108
6.	CONCLUSÕES	109
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
8.	ANEXO.....	126

1. INTRODUÇÃO

Muitos exemplos existem de como o conhecimento sobre o ecossistema, sua diversidade e interação entre as espécies, pode ser aproveitado como técnicas e insumos para melhoria de sistemas produtivos. Em especial os de seleção de cultivares, insumos biológicos, rotação de culturas, adubação verde e aproveitamento de restos culturais.

A utilização de microrganismos tem uma importância relevante neste cenário, pela fixação biológica de nitrogênio, associações micorrízicas e controle biológico. Em relação às leveduras alguns exemplos também podem ser citados. Estudos ecológicos de comunidades¹ destes organismos demonstraram que as leveduras eram naturalmente dominantes na superfície dos tecidos vegetais maduros. Descreveram também como era formada esta comunidade, como ela variava em diversas situações, e estudaram a ecologia das espécies encontradas. Entre elas, algumas com capacidade de produzir toxinas específicas contra outros fungos. Seguiu-se uma série de experimentos aplicados testando as melhores formas, veículos e período de aplicação, e especificidade no controle. Atualmente, as leveduras são utilizadas no pré e pós-colheita de frutas, como agentes de biocontrole contra perdas causadas por fungos. Os índices de controle alcançados são equiparados aos de fungicidas.

Alguns trabalhos apontam novos caminhos de aplicação destes organismos na agricultura. Um deles, o sinergismo de leveduras nas associações simbióticas micorrizo arbusculares. Embora, ainda não completamente compreendida esta interação, a inoculação de leveduras promove um aumento na colonização das raízes pelos fungos. Efeitos benéficos também foram notados no acúmulo de biomassa e na absorção de fósforo. Mais recentemente e com menor quantidade de informação, também já foi descrito que a inoculação conjunta de leveduras aumenta o número de nódulos formados e o crescimento da planta na simbiose rizóbio-leguminosa. Apesar deste potencial emergente de aplicação de leveduras como insumo, pouca informação foi gerada sobre a ecologia e a diversidade destes organismos associados às raízes das plantas. E em especial no Brasil, apenas um artigo publicado a cerca de 10 anos foi produzido explorando este assunto.

Historicamente, o conhecimento nesta área se desenvolveu pouco porque o maior interesse nos estudos ecológicos de leveduras estava voltado para amostras onde há prevalência de leveduras e baixa incidência de fungos filamentosos. Apesar deste grupo de organismo estar sempre presente em amostras de solo e rizoplano, há grande dificuldade de isolamento devido ao grande número de propágulos e esporos de fungos filamentosos. Os plaqueamentos são rapidamente tomados pelo crescimento micelial e os métodos utilizados que promovam a diminuição da incidência de fungos filamentosos acabam por diminuir a incidência de leveduras. Para dar suporte a indústria de fermentação e alimentos, as pesquisas foram concentradas em exudados de plantas, nectários de flores, partes moles de plantas e frutas e mostos fermentativos. Nestes locais de baixa tensão de oxigênio e maior teor de açúcares simples, as leveduras ascomicéticas fermentativas dominam amplamente.

A atividade metabólica da raiz diminui a disponibilidade de oxigênio e os exudados fornecem compostos de carbono, principalmente na forma de açúcares e ácidos orgânicos, tornando o ambiente próximo às raízes favoráveis a esse grupo de organismos. Porém, o conhecimento científico considera que não haja diferenciação entre as comunidades de levedura presentes no rizoplano e no filoplano. Embora mais recentemente tenha sido observada uma diferença nesta composição, a característica das comunidades ainda é considerada semelhante. Levando em consideração que estes dois compartimentos possuem

¹ Comunidade: conjunto de populações biológicas de espécies diferentes que ocupam um mesmo habitat.

características ecológicas distintas, tais como: irradiação solar, oscilação de temperatura, umidade e animais, é possível esperar que haja uma diferenciação entre estas comunidades.

Partindo das observações acima, uma hipótese pode ser levantada:

A comunidade de levedura presente no rizoplano possui uma composição diferenciada de espécies das encontradas no filoplano e no solo. Além disso, deve ser composta por leveduras com característica fisiológica distinta das populações basidiomicéticas do filoplano.

Os problemas no isolamento das leveduras dificultam os estudos das comunidades de levedura em amostras com grande presença de fungos filamentosos, contribuindo para a pequena quantidade de trabalhos com este foco e para que ainda se considerem semelhantes às comunidades destes dois compartimentos ecológicos.

O objetivo geral desta tese é caracterizar, identificar e comparar as populações de leveduras presentes no rizoplano, no filoplano e no solo de um cultivo orgânico de cana-de-açúcar em dois períodos distintos de atividade metabólica da planta. Foi estudado também o aperfeiçoamento nos métodos de estudo de leveduras em amostras com grande quantidade de propágulos de fungos filamentosos.

Objetivos específicos:

- Adaptar e desenvolver metodologias de isolamento de leveduras do ambiente solo, pela utilização de inibidores nas técnicas de plaqueamento e de metodologia de enriquecimento;
- Desenvolver metodologia de triagem dos isolados obtidos;
- Isolar, triar, caracterizar morfo-fisiologicamente e identificar por abordagem polifásica as leveduras de amostras de rizoplano, filoplano e solo de plantio de cana-de-açúcar;
- Comparar as populações obtidas no período seco e no período úmido;
- Comparar as populações encontradas nos compartimentos estudados.
- Formar uma coleção de culturas de leveduras isoladas de ambiente agrícola para posteriores estudos aplicados.

Parece bastante oportuno rever as comunidades de leveduras presentes nestes compartimentos ecológicos, em um momento que estudos aplicados com este grupo de organismo, no sistema solo-planta, começam a se tornar mais frequentes. Acreditamos que o rizoplano possui uma comunidade de leveduras característica, e que a compreensão da diversidade e ecologia de um grupo de organismo é a formação de conhecimento básico necessário para futuras aplicações. Foi decidido realizar este estudo em cana-de-açúcar por esta cultura ser estratégica para o país em dois importantes setores, alimentos e energia, ocupando grandes áreas de plantio em diversas regiões do país. E, também, por já existir um estudo de comunidade de levedura em raiz de cana-de-açúcar cultivada em plantio convencional e que poderia servir de base para comparação dos resultados obtidos. Foi escolhido o cultivo orgânico pois se acredita que neste tipo de manejo as relações ecológicas estejam mais preservadas.

As leveduras foram muito pouco estudadas na área de Ciência do Solo, no Brasil e em outros locais. E, portanto para situar o leitor, é importante iniciar a revisão de literatura deste trabalho fornecendo informações sobre este organismo e como ele é estudado. Para isso, na revisão de literatura, foram incluídas informações extras com o objetivo de auxiliar o leitor neste assunto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O que é uma Levedura?

Dentro das limitações implícitas no termo e segundo as informações encontradas em Wickherham (1951), Rose e Harrison (1969), Lodder (1970), Kocková-Kratochílová (1990a), Barnett et al. (1990), Boekhout e Kurtzman (1996) e Kurtzman e Fell (1998), as leveduras são: fungos ascomicetos ou basideomicetos que se reproduzem vegetativamente (assexual) por brotamento, alguns por fissão, e que quando apresentam estrutura sexual ela não está relacionada a um corpo de frutificação.

Mas pelo que pode ser observado, responder esta pergunta é um desafio mesmo para os especialistas na área. Livros, monografias e tratados sobre leveduras, normalmente demonstram cautela nessa explicação. “A diferenciação entre leveduras e os fungos dimórficos é incerta”, retirado de Kurtzman e Fell (2006). Davenport (1980) fazendo menção à característica unicelular destes organismos afirma que, uma definição simples e precisa do termo levedura é impossível porque atualmente é conhecido que muitas formas unicelulares de leveduras possuem ciclos de vida complexos. Kocková-Kratochílová (1990a) em relação à artificialidade taxonômica do grupo também afirma que uma definição única do que é uma levedura não é possível.

O que se conhece hoje como levedura é bem mais abrangente do que o significado dado pela palavra. Em diversos idiomas a palavra utilizada está relacionada à fermentação. Desta característica se tem o relato dos primeiros processos biotecnológicos utilizados pela humanidade, que datam de 6.000 a 8.000 anos atrás, na Babilônia antiga (KOCKOVÁ-KRATOCHÍLOVÁ, 1990a), um tipo de caldo ou sopa que era preparado com o fermentado de cereais em germinação. Muitos outros exemplos podem ser citados, como a produção de cerveja e pães pelos egípcios a 3.000 a 6.000 anos, fermentados de milho ou mandioca por povos na América Central e do Sul, e uva ou cereais na Europa e Ásia. Muitas sociedades fizeram uso desta forma de modificação e conservação de alimentos, e que, atualmente, sabe-se serem realizadas por leveduras ou por associações entre bactérias e leveduras.

As leveduras foram descobertas muito tempo depois de sua utilização. Em 1680, Antonie Van Leeuwenhoek fez o primeiro relato da observação de grânulos em amostras de mostos de cerveja. Os quais ele suspeitava serem grânulos de amido. No final da década de 30 do século XIX, se atribuiu à presença deste organismo em mostos de fermentação como responsável por este processo. E, em um período dominado pela química, levaria ainda mais 30 anos para que a idéia fosse aceita pela comunidade científica, com os experimentos definitivos de Louis Pasteur (GEST, 2003). Então, a denominação de levedura, historicamente, foi dada por um processo de transformação de alimentos, a fermentação, e não por uma característica observada diretamente no organismo. Por isso, no senso comum, acredita-se que todas possam fermentar, embora uma minoria, entre as espécies descritas, tenha demonstrado esta capacidade. Estas espécies, normalmente por comparação de sua forma celular com as espécies fermentadoras, foram e ainda são alocadas para o mesmo grupo taxonômico. Entre essas características, as principais são: o predomínio da forma unicelular e a incapacidade de formar estruturas aéreas vegetativas (hifas) e reprodutivas (conídios). É interessante notar que o emprego do termo levedura inicialmente originado de um processo fisiológico tem o seu significado modificado para uma característica morfológica, e passa a designar fungos, em sua maior parte, unicelulares, que apresentam carência de caracteres morfológicos e estruturais para sua classificação entre as demais espécies de fungos.

Não há nenhuma distinção precisa entre organismos considerados leveduras e fungos filamentosos. A definição tradicional do termo levedura é aplicada a espécies que são

unicelulares, nunca ou raramente produzem estruturas filamentosas, como hifas verdadeiras, e apresentam reprodução por brotamento. Por estas características, suas colônias, em meio de cultura sólido, possuem semelhança com colônias bacterianas. Este conceito pode ser bem aplicado a *Saccharomyces cerevisiae* e organismos semelhantes, utilizados nas indústrias de bebida e panificação. Enquanto que as definições tradicionais de fungos filamentosos são aplicadas a espécies que nunca se apresentam sob a forma unicelular, a não ser como conídios, produzem hifas e estruturas de reprodução aéreas. E, em meio de cultura, possuem as colônias claramente filamentosas. Entre estas duas formas há todas as variações que a evolução permitiu. A descrição de novas espécies e o aumento do conhecimento sobre as espécies conhecidas provocam constantes mudanças nesta definição (PHAFF, 1982).

A formação deste grupo baseado nessas características levou à criação de um grupo artificial dentro da árvore filogenética dos fungos. Mesmo os fungos dimórficos que apresentam as formas micelial e de levedura tiveram muitas vezes a fase leveduriforme sendo classificada como espécie de levedura ou como tipos anamorfos. Os taxonomistas na área de Micologia são divididos em dois grupos: os que se dedicam ao estudo de fungos filamentosos e os que estudam leveduras, possuindo e desenvolvendo, independentemente, suas próprias escolas, técnicas, publicações e reuniões científicas.

Von Arx (1980) acredita que esta separação tem motivos na história do estudo de fungos na Holanda, quando em 1922 o Professor Albert Jan Kluyver levou a coleção de leveduras do CBS² para o Laboratório de Microbiologia da então Escola Politécnica de Delft. Neste local, ele passou a aplicar nesta coleção as metodologias utilizadas na taxonomia de bactérias. Seus estudos, ainda hoje, influenciam a taxonomia de leveduras. Ainda, como lembrado por Rose e Harrison (1969), Von Arx (1971), Phaff (1982) e Lachance (2003), Kluyver iniciou e influenciou a produção dos importantes tratados sobre estes organismos, publicados entre as décadas de 30 e 50 (STELLING-DEKKER, 1931; LODDER, 1934; DIDDENS e LODDER, 1942; LODDER e KREGER VAN RIJ, 1952). Esta forma de caracterizar as leveduras, principalmente pelas suas habilidades fermentativas e de assimilação de fontes de carbono, é reconhecida hoje como da Escola Holandesa de taxonomia de levedura (VON ARX, 1980; PHAFF, 1982), influenciada pela escola de microbiologia de Delft (LA RIVIÈRE, 1997).

Talvez a melhor descrição do uso do termo levedura não seja biológica, mas sim uma descrição prática, como a que foi proferida pelo Professor Allen Hagler (comunicação pessoal), em que o termo é aplicado aos organismos que, por questões históricas são estudados por um grupo de especialistas que empregam metodologias que no, conjunto diferenciam das empregadas pelos que estudam fungos filamentosos. O termo está relacionado à natureza humana e de como a ciência se desenvolveu e não diretamente à natureza do organismo como atualmente é concebido.

2.2. Taxonomia e Identificação de Leveduras

A Taxonomia é a ciência que trata da classificação de objetos. Como ciência ela surgiu como um ramo da Biologia e é aplicada para classificar os organismos. Atualmente, é empregada em diversas áreas. Ela retrata a necessidade que a humanidade e suas atividades, como por exemplo a ciência, tem de classificar os objetos como forma de compreendê-los. Outra função da Taxonomia na Biologia é a nomenclatura das espécies descritas e aceitas. Inicialmente os fungos foram estudados por botânicos, portanto o sistema de classificação

² CBS - Centraalbureau voor Schimmelcultures, Centro de Culturas de Fungos, Holanda, (<http://www.cbs.knaw.nl/>) possui uma das maiores coleções de levedura e fungo do mundo. Historicamente é a coleção mais importante para a área de Taxonomia de Leveduras. O Setor de Leveduras do CBS funcionou por muito tempo no Laboratório de Microbiologia da Universidade de Delf.

binomial da área de Micologia segue as determinações do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICBN). O mesmo é válido para os critérios necessários para a descrição de uma nova espécie. Porém, ao invés de depósitos em herbários é realizado o depósito de cultura viável do *specimen* em coleções reconhecidas internacionalmente no meio acadêmico. O *specimen* depositado da nova espécie, com suas informações fenotípicas e genotípicas, é o organismo considerado a cultura padrão ou estirpe tipo (*typo* ou ‘type-strain’) para aquela determinada espécie. A cultura *typo* é a referência utilizada para futuras comparações de identificação e classificação dos organismos. Dentro do que é aceito pelos taxonomistas como uma variabilidade intra específica, um organismo é identificado como pertencente a uma espécie quando se assemelha ao *specimen typo* representante.

Ainda, 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. Indicando que o organismo é similar a espécie denominada, mas diferente o suficiente para ser considerado como outra espécie. Quando há incerteza sobre a identificação ou a identificação ainda necessita ser conferida pode ser adicionado o prefixo *cf.*, do latim *confer*, ao descritor da espécie. Para a área de leveduras pode ser adicionado o sufixo “-like” ou “-similar” e o sufixo “?” ao descritor do organismo, respectivamente para as duas situações citadas anteriormente (VITAL et al., 2002).

A Taxonomia Clássica para microrganismos utiliza caracteres morfológicos, estruturais, bioquímicos e fisiológicos para criar comparações entre organismos e grupos de organismos. Entre os caracteres analisados há uma hierarquia de importância, ou de peso, para cada grupo taxonômico. Além disso, há uma ordem de análise em que determinadas características são consideradas antes do que as outras. As comparações são feitas diretamente entre os conjuntos de dados, tornando-se mais demorada à medida que se acrescentam mais caracteres e aumenta-se o número de organismos a serem classificados. Para leveduras, caracteres morfológicos, tais como a forma da célula, os tipos de brotamento e de esporo, e a formação de filamentos, são considerados para identificação dos gêneros. E os fisiológicos, como os de assimilação e fermentação de açúcares, são utilizados para os níveis taxonômicos de espécies. Este tipo de taxonomia foi empregado pela Escola Holandesa e os tratados gerados, por influência direta ou histórica, dessa escola até a sua última edição, Kurtzman e Fell (1998), possuem esta forma de comparação.

Em meados do século XX, Sneath e Sokal (1962) propuseram que as comparações entre os organismos e seu agrupamento fossem feitas por métodos numéricos. A Taxonomia Numérica se popularizou entre as diversas áreas da ciência, tanto por ter se beneficiado do avanço na área computacional como pela capacidade de lidar com grandes matrizes de dados, removendo assim uma de suas limitações. Mas a grande transformação realizada pela análise por métodos numéricos foi a geração de uma idéia quantitativa entre as classes criadas pela comparação. Charles Singer em seu livro, escrito em 1959, sobre a história da Biologia, comenta que um ponto fraco desta ciência sempre foi a ausência de qualquer sentido quantitativo de distância entre os termos classificatórios (Ordem, Família, Gênero, etc.) e entre as classes criadas (SINGER, 1989).

O exemplo mais importante da utilização de métodos numéricos aplicados à taxonomia de leveduras está nos algoritmos probabilísticos desenvolvido por Gower (1974) e utilizados na chave de Payne et al. (1982) incluída em Barnett et al. (1983, 1990 e 2000). Esta chave surgiu como uma alternativa à chave de Lodder (1970) e suas subsequentes edições, mas não em contraposição, uma vez que utilizava a mesma forma de classificar leveduras proposta pela Escola Holandesa (Taxonomia Clássica). O principal diferencial desta chave era uma simplificação nos caracteres morfológicos ficando com os de mais fácil reconhecimento e abolindo o uso dos que necessitavam maior especialização e treinamento, e a utilização dos métodos numéricos probabilísticos. Esta chave também não foi idealizada para quantificar a

semelhança entre as classes, mas fornece a probabilidade dos dados inseridos pertencerem a uma dada espécie pertencente ao banco de dados.

A Taxonomia Polifásica (COLWELL, 1970) se caracteriza pela inclusão de dados moleculares ao conjunto de dados que anteriormente eram utilizados e a utilização de dados filogenéticos para classificação do organismo. Por utilizar um conjunto mais amplo e diverso de dados e informações, ela essencialmente indica um consenso entre as associações (VANDAMME et al., 1996, UILENBERG e GOFF, 2006). Ela surgiu e se desenvolveu com o advento da Biologia Molecular e também do contínuo desenvolvimento da Ciência Computacional e seu crescente uso na Biologia. Na Microbiologia, área em que os dados estruturais são limitados e muitas vezes provas bioquímicas e fisiológicas se mostram taxonomicamente inconsistentes, a utilização de características dos ácidos nucleotídicos foi amplamente aceita e causou grandes transformações no que se compreendia das relações entre os organismos. Com dados de ácidos nucléicos, principalmente genes ribossômicos, pode-se reestruturar toda a árvore taxonômica dos seres vivos com a proposição por Woese et al. em 1990 de três grandes domínios: *Archea*, *Bacteria* e *Eucaria*. Esta concepção do arranjo entre os organismos ampliou a noção que se tinha da diversidade da vida presente no planeta.

Esta abordagem, passa a ser empregada em taxonomia bacteriana (VANDAMME, 1996), pela capacidade de integração de diferentes tipos de dados. O emprego de caracteres moleculares em taxonomia de levedura inicia-se com dados de composição de bases no ácido nucléico (NAKASE e KOMAGATA, 1968; MEYER e PHAFF, 1970). Posteriormente há o emprego de dados de re-associação de ácidos nucléicos (MEYER e PHAFF, 1972) e, mais recentemente, a utilização de dados das seqüências dos genes ribossomais. Para leveduras, a abordagem polifásica tem sido utilizada para a classificação e descrição de novas espécies (MONTES et al, 1999; GADANHO et al., 2001) e para promover rearranjos nos clados anteriormente formados com outro tipo de abordagem, como em *Rhodospiridium* (SAMPAIO et al., 2001), em *Rhodotorula* (GADANHO e SAMPAIO, 2002) e em *Fellomyces* (LOPANDIC et al., 2005). À medida que os dados de sequenciamento ficam cada vez mais acessíveis, eles tendem a se tornar o principal método de classificação e identificação, principalmente pela facilidade de comparação dos dados de seqüência de culturas tipo, presentes em bancos de dados disponíveis ao público.

Nota-se, também, que o emprego deste tipo de abordagem começa a ser utilizado na identificação de isolados de leveduras de diversos ambientes como: alimentos fermentados (PARAMITHIOTIS et al., 2000) e queijo (PRILLINGER et al., 1999), ambientes aquáticos (LIBKIND et al., 2003) e de casca de sobreiro (*Quercus suber*) (VILLA-CARVAJAL et al., 2004). Porém, os trabalhos mais recentes, encontrados na revisão de literatura, sobre o levantamento de leveduras de solo, rizoplano e filoplano (item 2.5) utilizam a taxonomia clássica ou a molecular para a classificação de isolados. Como forma de tornar o acesso a este tipo de análise mais acessível à comunidade científica, o CBS disponibiliza o BioloMICS (ROBERT e SZOKE, 2006), um conjunto de ferramentas de análise de taxonomia numérica e polifásica que pode ser utilizado em <http://www.cbs.knaw.nl/yeast/BioloMICS.aspx>.

Ainda assim, a classificação das espécies dos isolados, na grande parte dos trabalhos, é feita por metodologia clássica de testes fisiológicos e observação de características morfológicas das colônias e das células por microscopia (YARROW, 1998). Os testes fisiológicos incluem a fermentação e a assimilação de diversas fontes de carbono. Além do crescimento em resposta a fontes nitrogênio e outros compostos, incluindo inibidores, produção de amido e temperatura de crescimento. As características morfológicas das células são: a forma da célula, presença e tipo de hifas, presença de esterigma e presença e tipo de esporo. As características observadas são comparadas em chaves taxonômicas pré-estabelecidas e checadas principalmente com as informações taxonômicas das estirpes *typo* contidas em Wikerham (1951), Lodder e Kreger Van Rij (1952), Lodder (1970), Barnett et al.

(1983, 1990 e 2000), Kreger Van Rij (1984), Kocková-Kratochvílová (1990b) e Kurtzman e Fell (1998). Também são utilizados artigos de descrição de espécie quando estes são mais recentes ou quando não incluídos nestas revisões taxonômicas. Outra fonte de consulta é a base de dados das culturas depositadas no CBS (ROBERT et al., 2008).

2.3. Filogenia de Leveduras

As leveduras e fungos leveduriformes estão distribuídos nos dois grandes grupos de fungos *Dikaria*: os ascomicetos e os basideomicetos. A última boa estimativa do número de espécies conhecidas deste grupo foi realizada por Lachance (2006) enumerando cerca de 1000 espécies descritas. Na filogenia do grupo, Kurtzman e Fell (2006) enumeram cinco classes nos *Ascomycetous*, sendo que *Saccharomyces*, que concentra a maioria dos gêneros e espécies, e *Schizosaccharomyces* são monofiléticos. Ainda em *Ascomycetous* vários gêneros com posição incerta ou conflitante foram alocados no clado com status de ordem *Saccharomycetales incertae sedis*. Enquanto que nos *Basideomicetous* as leveduras podem ser encontradas juntamente com espécies de fungos filamentosos nas classes *Urediniomycetes*, *Ustilaginomycetes* e *Hymenomycetes* (Figura 1).

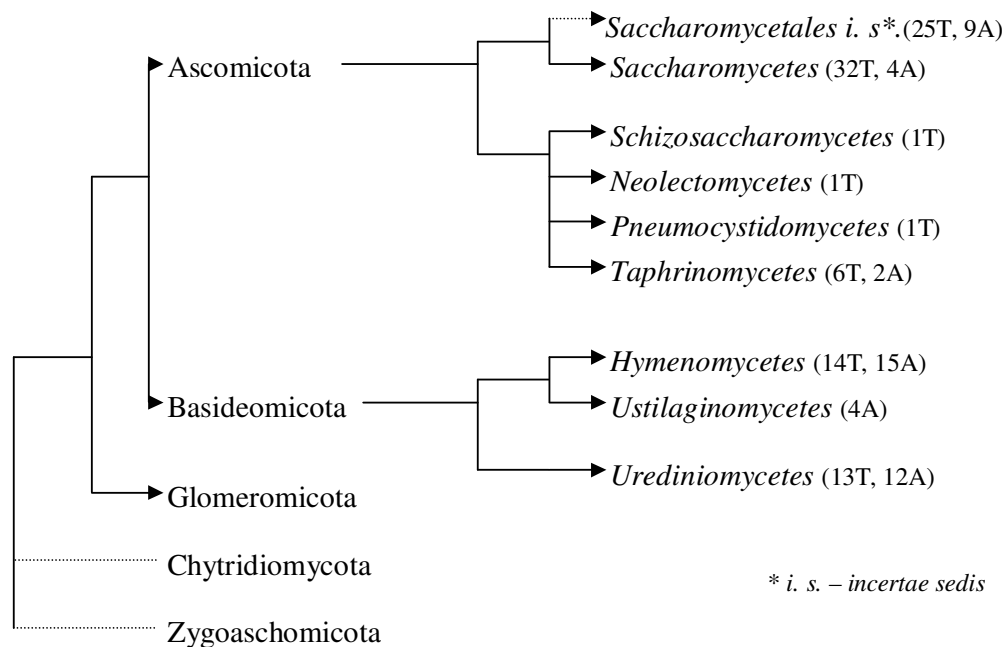


Figura 1: Representação esquemática de uma árvore filogenética com os principais grupos de fungos. Mostrando apenas as classes de *Ascomycetous* e *Basideomicetous* onde a presença de leveduras foi descrita. Entre parênteses, números de gêneros de leveduras teleomórficos (T) e anamórficos (A) reconhecidos para cada classe de acordo com Kurtzman e Fell (2006). Os galhos tracejados indicam uma provável origem polifilética. Tamanho do galho não indica distância filogenética.

Em uma revisão dos gêneros *Pichia*, *Isatchenia* e *Williopsis*, foram analisadas filogeneticamente seqüências dos genes ribossomais (SSU e LSU) e do fator de alongamento

(EF-1 α) e propuseram a divisão do gênero *Williopsis*, em três novos gêneros: *Barnettozyma*, *Lindnera* e *Wickerhamomyces* (KURTZMAN et al., 2008), com a inclusão de várias espécies pertencentes ao clado *Pichia* nestes novos gêneros e a inclusão das espécies de *Isatchenkia* spp. para o gênero *Pichia*. Nessa revisão, como já havia sido notado anteriormente por outros autores, foi observada a falta de valor filogenético da assimilação de nitrato e da morfologia de ascosporos para este grupo. Estas observações indicam a necessidade de rever a utilização de dados morfo-fisiológicos para este fim. A inclusão dos dados moleculares, em especial os de seqüências de genes, em filogenia tem provocado freqüentes rearranjos em uma filogenia montada principalmente com dados morfofisiológicos.

2.4. Isolamento de Leveduras de Solo

Alguns levantamentos ecológicos foram realizados para se compreender quais espécies ou grupos de leveduras conhecidos podem ser encontrados no solo ou tem este ambiente como habitat, ou determinar quais são os grupos dominantes e quais as espécies raras. Normalmente, estes levantamentos fazem uso de metodologia clássica em microbiologia, onde a amostra é ressuspensa com agitação em água ou tampão isotônico, com objetivo de liberar as células das partículas minerais ou orgânicas. Em seguida esta suspensão é inoculada em meio de cultura sólido.

Quando necessário, são realizadas diluições para se obter uma quantidade de colônias que possibilite o isolamento. Na rotina dos laboratórios de microbiologia, por motivos práticos, é comum se realizar diluições com o objetivo de obter contagens entre 30 e 100 colônias, ainda que haja a recomendação pelos manuais de microbiologia para que este número fique perto de 300 colônias por placa. Como as colônias normalmente são maiores que as de bactéria, mais de 100 colônias crescendo em uma placa de Petri já causam competição por nutrientes suficiente para inibir o aparecimento de algum tipo menos competitivo. Em isolamentos de amostras com muitos propágulos de fungos filamentosos, como solo, sedimento e superfície de vegetais, as contagens de colônias de leveduras são dificultadas e às vezes impedidas pelo crescimento micelial. E os números obtidos por placa dificilmente passam de 30 colônias. Dois trabalhos mostram o quanto este problema acompanha os estudos de leveduras: um em alimentos (HERTZ e LEVINE, 1942) e o outro em solo (ETCHELLS et al., 1954) já se dedicavam a experimentações de inibição do crescimento micelial. Nestes mais de 50 anos, diversos autores se ocuparam do estudo de populações de leveduras em amostras de ambientes naturais, e com freqüência relataram este problema com colônias de fungos filamentosos.

Nos levantamentos realizados sobre diversidade de leveduras no solo, foram utilizados, por diversos autores, uma variedade de meios de cultura para realizar o isolamento deste organismo. Embora não haja uma unanimidade, os meios YM, EM, Wort e Glucose-Agar aparecem com maior freqüência (para composição dos meios ver tabela 1). Alguns meios menos utilizados foram YNB³ (Yeast Nitrogen Base - base nitrogenada para cultivo de leveduras) com 0,5% de glicose (AZEREDO et al., 1998), 2% de glicose (ROBBS et al., 1989) ou com lecitinas (SPENCER e GORIN, 1971; SPENCER et al., 1971); peptona-glicose-agar com rosa bengala (ZAMBRANO e CASAS-CAMPILLO, 1959; WUCZKOWSKI e PRILLINGER, 2004). Este último é o meio de isolamento de fungos proposto por Martin (1950), Saboraud modificado com 4% de glicose, 1% de peptona e 2 % de agar (MENNA, 1957; 1966); PDA (batata-dextrose-agar) (MILLER e WEBB, 1954;

³ YNB: base de nitrogênio para leveduras (Yeast Nitrogen Base), meio de cultivo sintético proposto por Wickerham e Burton (1948) e Wickerham (1951) para a classificação de leveduras em testes de assimilação de fonte de carbono.

TORO et al., 2005). Outros meios foram menos utilizados, tais como: agar com extrato de milho (*corn meal agar*–CMA) (WUCZKOWSKI e PRILLINGER, 2004), CCA (*casaminoacids*⁴) (VISHNIAC e HEMPFLING, 1979), agar com extrato de solo e Czapek-Dox (MENNA, 1957). Além da variedade alguns autores utilizaram os meios de cultura originais com modificações em suas composições. Estas modificações geralmente foram na concentração dos componentes ou no acréscimo de inibidores.

Muitas vezes, em isolamentos microbianos, se utiliza a técnica de cultivo em meio líquido (caldo) de enriquecimento e posterior isolamento em meio sólido. Isto é feito para privilegiar o desenvolvimento de determinado organismo que tenha dificuldade de competir com outras populações presentes na amostra ou que estejam em número abaixo do detectável nos isolamentos com a técnica de espalhamento em placa. O enriquecimento não fornece qualquer informação sobre a estrutura da comunidade, pois as populações de cada espécie podem ser, e normalmente são, completamente alteradas. Uma vez que este é o objetivo da utilização da técnica. A inoculação de uma amostra em meios de enriquecimentos promove uma modificação nas populações originais, e espécies que estavam ativas ou dominantes desaparecem enquanto outras raras, inativas ou latentes podem tornar-se prevalentes. Esta técnica é bastante utilizada em estudos de bioprospecção da microbiota, onde o objetivo é isolar microrganismos que possuam uma determinada função desejada.

Em estudo recente, Carvalho (2007), comparou o rendimento de métodos de enriquecimento e espalhamento em placa no isolamento de leveduras em amostras de frutos e de sedimento de mangue. Os resultados encontrados indicaram que, com o método de enriquecimento, se obteve um maior número de espécies quando comparado ao de espalhamento em placa. Além disso, as espécies recuperadas com os dois métodos não foram iguais em sua totalidade, recomendando a utilização conjunta destas abordagens para um melhor estudo da diversidade. A utilização do enriquecimento, apesar de ter sido recomendada por Zambrano e Casas-Campillo (1957) para o isolamento de uma maior diversidade de leveduras de amostras de solo, não foi muito explorada pelos autores da área. Desde a década de 60 esta técnica parece estar em desuso, uma vez que os trabalhos deste período em diante só utilizam o espalhamento em placa como forma de isolar estes organismos. Os últimos registros científicos de utilização de enriquecimento para o estudo de diversidade de leveduras foram os trabalhos de Capriotti de 1962 e 1967.

⁴ Casaminoacids – termo para designar uma mistura de ácidos aminados obtidos da hidrólise da caseína e utilizado na composição de meios de cultura.

Tabela 1: Meios de culturas mais utilizados, suas composições e os levantamentos das populações de levedura do solo que utilizaram estes meios.

Meio utilizado	Composição	levantamentos da população de leveduras
YM-agar	glicose 1%, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona 0,5%, agar 2%	Azeredo et al., 1998; Vital et al., 2002; Hong et al., 2002.
glicose-agar	glicose 2%, 0,3% extrato de levedura, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1%, K ₂ HPO ₄ 0,02%, KH ₂ PO ₄ 0,01%, MgSO ₄ · 7 H ₂ O 0,02%, NaCl 0,02%, K ₂ SO ₄ 0,01%, agar 2%	Gochenaur, 1970*; Sláviková e Vadkertiová, 2000; 2003a; 2003b.
EM	extrato de malte 3%, peptona 0,5%, agar 2%	Bouthilet, 1951; Spencer et al., 1971; Spencer e Gorin 1971; Moawad, 1971; Moawad et al., 1986; Sláviková e Vadkertiová, 2003a; 2003b; Wuckowiski e Prillinger, 2004.
Wort-agar	extrato de malte 1,5%, peptona 0,78%, maltose 1,275%, dextrina 0,275%, glicerol 0,235%, K ₂ PO ₄ 0,1%, NH ₄ Cl 0,1%, agar 2%	Sláviková e Vadkertiová, 2000; Poliakova et al., 2001; Maksimova e Chernov, 2004.

Ao se efetuar isolamentos microbiológicos, não raramente se obtém centenas de isolados mesmo para um número reduzido de amostras. Se o trabalho tem o foco de estudar um grupo ou uma atividade específica, os isolamentos podem ser conduzidos para que favoreçam determinadas populações. Ainda assim não há nenhuma garantia de que o número não chegue a centenas. Para estudos de levantamento da diversidade o limite para o número de microrganismos que serão estudados está muito mais relacionado com a capacidade do laboratório e de seus operadores do que com o que se encontra na natureza.

À coleção inicial formada podem ser aplicados diversos métodos de triagem e inicia-se um processo de agrupamento dos isolados em que cada grupo contém os indivíduos com as características mais próximas possíveis dentro do que pode ser observado. Os métodos de triagem, empregados na busca de indivíduos que apresentem determinada característica entre os demais de uma coleção, são muito utilizados em microbiologia. Porém, nas triagens realizadas para estudo da diversidade total, o objetivo é separar a coleção em grupos distintos. A partir desta separação, são escolhidos representantes de cada grupo para análises posteriores, normalmente de maior custo, mais demorada ou trabalhosa. Os resultados obtidos pelos representantes nas demais análises, por presunção, são atribuídos aos demais componentes do grupo que ele representa.

2.5. Levedura no Rizoplano, Filoplano e Solo

O solo, de uma maneira geral e macroscópica, é visto como um ambiente oligotrófico, onde as concentrações de nutrientes são baixas a muito baixas. Possivelmente, por este motivo, foi considerado um local onde as leveduras permaneciam em estado de dormência após o esgotamento dos nutrientes dos resíduos animais e vegetais que as levavam a este ambiente (EMMONS, 1951). Porém depois de freqüentes isolamentos de espécies do gênero *Cryptococcus* de amostras do solo, este pensamento começou a mudar e se suspeitou que poderia haver leveduras próprias deste ambiente. Apesar destes organismos serem reconhecidos como hábeis em utilizar fontes de açúcares simples e grandes competidores quando este tipo de recurso está disponível, como em mostos, em tubos nectários de flores e em frutos, algumas leveduras isoladas de solo podem se desenvolver em condições de baixa concentração de nutrientes. Por exemplo, *Candida aurita* é uma espécie isolada de um solo oligotrófico foi descrita por Poliakova e Chernov (2002) e Kimura et al. (1998) isolaram leveduras de solo com capacidade de se desenvolverem em diluições de até 1.000 vezes do meio YM (ver composição na Tabela 1), um meio de cultura normalmente utilizado para cultivo e manutenção de fungos.

Mesmo que numa visão geral consideremos o solo como oligotrófico ele pode ser dividido em diversos ambientes, interessantes para as discussões de ecologia microbiana. O solo possui uma organização heterogênea e diversa em relação a seus componentes orgânicos e inorgânicos, profundidade e classes. Características como concentração de nutrientes e sais, disponibilidade de água, temperatura, quantidade de matéria orgânica, rizosfera e populações de organismos podem variar tanto em distâncias muito pequenas quanto em larga escala. Se o ambiente pudesse ser continuamente fragmentando e amostrado até uma perspectiva microscópica, seria possível encontrar diversos micro-ambientes com grandes variações, de um para outro, da oferta de nutrientes e das características físicas, químicas e biológicas. Porém, a dificuldade deste micro-ambientes serem amostrados e a quantidade de amostras geradas inviabilizariam as tentativas de seu estudo.

Uma das abordagens para estudos ecológicos é encontrar padrões no ambiente que possam ser amostrados e avaliados, e assumir que o ambiente é heterogêneo. Trabalhando com esta idéia Bab'eva e Chernov (1995) identificam no pano de fundo dos ambientes naturais, três tipos de substratos ou conjunto de substratos que diferenciam as populações de leveduras: 1) a superfície das plantas aonde as leveduras se desenvolvem utilizando secreções do vegetal, incluindo aí o rizoplano; 2) o material vegetal em diferentes estágios de decomposição incluindo folheto, turfa e parte morta do vegetal; e 3) a parte ou os horizontes minerais do solo com pouca matéria orgânica acessível. As populações que habitam estes substratos foram identificadas como pertencentes aos grupos:

- a) fitobiontes: leveduras que vivem permanentemente na superfície vivas dos vegetais ou nas superfícies que ainda não começaram um processo de decomposição. Muitas produzem pigmentos e possuem no seu ciclo celular um estágio de resistência à seca (clamidósporo), uma característica freqüente, mas talvez não aplicada a rizosfera, é a formação de balistósporo que lança os esporos no ar para aumentar a disseminação. Como espécies representativas deste grupo temos as do gênero *Sporobolomyces* e *Sporodibolus* e também algumas espécies dos gêneros *Rhodotorula* e *Cryptococcus*;
- b) pedobiontes: são adaptadas a viver na superfície dos minerais. Não produzem pigmentos e possuem cápsulas que auxiliam nas trocas de água e nutrientes em períodos de oscilação da oferta d'água. São oligotróficas e acumulam reservas na forma de lipídios, as espécies deste grupo pertencem aos do gênero *Lypomyces*, e as espécies *Cryptococcus aerius* e *C. terreus*;
- c) saprobiontes: vivem nas partes em decomposição dos vegetais e no folheto. Possuem algumas características dos dois grupos anteriores como formação de cápsula e ciclo

de vida com clamidósporo. Comumente apresentam alta capacidade hidrolítica que permite assimilar os compostos de degradação do material vegetal, como polímeros e complexos aromáticos. As espécies deste grupo são *Guehomyces pullulans*, *Cystofilobasidium capitatum* e espécies de *Cryptococcus* pertencentes ao que era considerado anteriormente como gênero *Candida* com afinidade basideomicética, *C. podzolica*, *C. humicola* e *C. curvata*, atualmente, *C. podzolicus*, *C. humicolus* e *C. curvatus*.

- d) humidobiontes: são característicos de frutos maduros, flores, tecido necrosado de plantas suculentas, exudados de árvores e outros locais de oferta de açúcares simples e água. Com baixa tensão de O₂ muitos destes organismos alteram seus metabolismos para vias fermentativas. Estas leveduras não possuem pigmentos, não formam cápsulas nem clamidosporo. Espécies deste grupo pertencem principalmente a leveduras ascomicéticas com características fermentativas, mais frequentemente dos clados *Saccaromyces*, *Nadsonia*, *Metschnikowia*, *Saccharomycoides* e *Hanseniaspora*.

Segundo Bab'eva e Chernov (1995) as florestas seriam o ambiente onde se poderia mais facilmente perceber esta diferenciação dos grupos de leveduras com suas espécies típicas e o ambiente de deserto o mais difícil, pois praticamente poucas espécies dominam o ambiente por completo. A quantidade de leveduras no solo é normalmente baixa, na ordem de 10³ a 10⁴ células por grama de solo, e em alguns casos podem ser encontradas populações de 10⁶ céls.g de solo⁻¹. A estrutura das populações de levedura no solo indica que neste ambiente há o predomínio de poucas espécies, enquanto que para a superfície vegetal a dominância está distribuída entre um maior número de espécies. Ainda, segundo estes autores, a composição de espécies das populações no solo tem a distribuição de Poisson e as da superfície dos vegetais a distribuição Normal. Porém a distribuição Normal raramente é observada nos dados de distribuição de espécies encontradas na literatura.

Bab'eva e Chernov (1995) caracterizaram a ecologia e a distribuição geográfica das leveduras em uma revisão sobre conhecimento produzido pelos autores russos sobre espécies de leveduras encontradas em plantas, folheto e solo do ambiente ártico ao sub-tropical. Esta revisão torna, de certa forma, acessível, para o mundo ocidental, parte do conhecimento, em ecologia e distribuição geográfica de leveduras, produzido durante 25 anos pelos professores e alunos do Departamento de Biologia do Solo da Universidade de Moscou. Nesta revisão os autores diferenciam, no ambiente, locais com características que sustentam determinadas formas de vida de leveduras, entre elas, os horizontes inorgânicos do solo com baixa disponibilidade de matéria orgânica acessível, possuem populações de levedura presentes compostas de representantes dos gêneros *Lipomyces* (Tabela 3) e *Cryptococcus* (*C. albidus* (= *terricola*), *C. aerius* e *C. terreus*) e o complexo do folheto, constituído de material orgânico em diferentes estágios de decomposição e matéria orgânica, com populações de leveduras componentes tanto das populações do solo quanto de espécies da superfície dos vegetais e com a espécie *Guehomyces* (= *Tricosporon*) *pullulans* aparecendo com muita frequência. As populações de leveduras no solo normalmente apresentam espécies características da superfície vegetal introduzidas no solo pelo material em decomposição. Os autores ressaltam que as populações de leveduras, presentes nos ambientes de solo, de folheto e da superfície vegetal, podem variar bastante entre diferentes zonas geográficas. Por exemplo, o complexo de leveduras de solo pode estar reduzido ou até não ter nenhum representante ou ter como representantes espécies do complexo da superfície das plantas.

Reunindo os trabalhos que tinham como objeto de estudo o outro extremo do globo, a região do continente Antártico, Vishniac (1996) organizou uma revisão sobre as populações de leveduras e fungos filamentosos em ambiente aquático e terrestre encontradas neste local. As populações de leveduras no solo podem variar bastante neste tipo de ambiente variando de

zero a populações na ordem de 10^6 . Vishniac (1996) observou que várias espécies haviam sido isoladas apenas uma vez e deveriam ser consideradas contaminações do ambiente por espécies exógenas e, portanto, poucas espécies podem ser consideradas como nativas da região. Na revisão o autor indica um gradiente de estresse de temperatura, nutriente e água, em que espécies de leveduras foram isoladas repetidas vezes. *Cryptococcus vishniacii* e *C. antarcticus*, duas espécies psicrófilas, aparecem em locais mais estressantes, *Leucosporidium scottii* e *Mrakia frigida (=nivalis)* aparecem em área com um pouco mais de nutrientes. Em locais mais protegidos espécies cosmopolitas podem ser consideradas como nativas e já foram encontradas diversas vezes as espécies *Cryptococcus albidus*, *C. laurentii*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula minuta* e *R. mucilaginosa*.

Na tabela 2 está uma lista das espécies descritas como dominantes, nos levantamentos ecológicos encontrados na literatura e suas características de assimilação de açúcares da via de degradação da celulose como fonte de carbono.

Tabela 2: Listagem das espécies de leveduras comumente encontradas em levantamentos ecológicos de solo, rizosfera e filoplano, em diferentes ambientes e substratos, e suas características de assimilação. *

Identificação em Kurtzman e Fell (1998)	Identificação original	Referências	Substrato	Ambiente	Assimilação		
					xil	ara	cel
<i>Aureobasidium pullulans</i>	=	Vinovarova e Bab'jeva (1987)/ Robbs et al. (1989)/ Beh (2007)	S, F	A,P	+	+	nd
<i>Bullera alba</i>	=	Hogg e Hudson (1966)/ Pennycook e Newhook (1981)/ Gunasekera et al. (1997)	F	A,Fl	nd	nd	nd
<i>Bullera</i> ssp.	=	Chernov et al. (1997)	F	Ar	nd	nd	nd
<i>Candida etchellsii</i> ¹	=	Vital et al. (2002)	S	Fl	-	-	nd
<i>Candida maltosa</i> ¹	=	Slaviková e Vadkertiová (2003b)	S	A	+	-	nd
<i>Candida krusei</i> ¹	=	Kvasnikov et al. (1975)	F	A	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	=	Kvasnikov et al. (1975)	F	A	nd	nd	nd
<i>Cryptococcus</i> sp.	=	McBride e Hayes (1977)/ Andrews e Kenerley (1978)/ Andrews e Kenerley (1980)/ Gunasekera et al. (1997)/ de Jager et al. (2001)/ Inácio et al. (2002); Inácio (2003)/ Buck e Burpee (2002)	F	A,Fl	nd	nd	nd
<i>Cryptococcus aerius</i> ¹	=	Wuczkowski e Prillinger (2004)***	S	Vz	+	+	nd
<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Cryptococcus albidus/ diffluens/ terricolus</i>	Kerling (1958, <i>apud</i> Last e Price 1969)/ di Menna (1965)/ Kvasnikov et al. (1975)/ Flannigan e Campbell (1977)/ Bab'eva e Azieva (1980)/ Bab'eva e Sadykov (1980)/ Moawad et al. (1986)/ Vinovarova e Bab'jeva (1987)/ Vishniac (1996)**/ Chernov et al. (1997)/ Middelhoven (1997)/ Azeredo et al. (1998)/ Polyakova et al. (2001)/ Slaviková et Vadkertiová (2003a)/ Glushacova e Chernov (2004)/ Maksimova e Chernov (2004)/ Hong et al.(2006)***	S,R, F	A, FL, P, Po, T, V,	+	+	+
<i>Cryptococcus antarcticus</i>	=	Vishniac (1996)**	S	Po	+	-	nd

continua

Identificação em Kurtzman e Fell (1998)	Identificação original	Referências	Substrato	Ambiente	Assimilação		
					xil	ara	cel
<i>Cryptococcus capitatum</i>	=	Glushacova e Chernov (2004)	F	Fl	nd	nd	nd
<i>Cryptococcus curvatus</i>	<i>Candida curvata</i>	di Menna (1965)/ Moawad et al. (1986)	S	FL, P, V	+	v	+
<i>Cryptococcus flavescens</i> ¹	=	Hong et al.(2006)***	R	A	+	+	nd
<i>Cryptococcus flavus</i>	=	Robbs et al. (1989)/ Glushacova e Chernov (2004)	F	A	nd	nd	nd
<i>Cryptococcus gastricus</i>	=	Bab'eva e Azieva (1980)/ Hong et al. (2006)***	S	T	+	+	+
<i>Cryptococcus gilvenses</i>	=	Polyakova et al. (2001)	S	T	-	+	+
<i>Cryptococcus humicolus</i>	<i>Candida humicola</i>	di Menna (1965)	S	P, V	+	+	+
<i>Cryptococcus laurentii</i>	=	Kerling (1958, <i>apud</i> Last e Price 1969)/ di Menna (1959, 1971)/ Ruinen (1963)/ Hislop e Cox (1969)/ Kvasnikov et al. (1975)/ Flannigan e Campbell (1977)/ Bab'eva e Azieva (1980)/ Bab'eva e Sadykov (1980)/ Pennycook e Newhook (1981)/ Chernov (1985)/ Vinovarova e Bab'eva (1987)/ Robbs et al. (1989)/ Vishniac (1996)**/ Middelhoven (1997)/ Azeredo et al. (1998)/ Slaviková e Vadkertiová (2000, 2003a, 2003b)/ Vital et al. (2002)/ Inácio et al. (2002)/ Inácio (2003)/ Glushacova e Chernov (2004)/ Maksimova e Chernov (2004)/ Hong et al. (2006)***	S,R, F	A, FL, P, Po, T	+	+	+
<i>Cryptococcus luteolus</i>	=	Ruinen (1963)	F	Fl	nd	nd	nd
<i>Cryptococcus macerans</i> ¹	=	Flannigan e Campbell (1977)/ Bab'eva e Sadykov (1980)/ Hong et al. (2002)***/ Wuczkowski e Prillinger (2004)***	S, R, F	A, Vz	+	+	nd
<i>Cryptococcus nyarrowii</i> ^{1,3}	<i>Cryptococcus</i> sp.	Hong et al.(2002)***	R	A	-	-	nd
<i>Cryptococcus phenolicus</i> ¹	=	Hong et al.(2006)***	S,R	A	+	+	nd
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	<i>Candida podzolica</i>	Bab'eva e Reshetova (1975)/ Maksimova e Chernov (2004)/ Hong et al. (2006)***	S,R	A, FL, V	+	+	+
<i>Cryptococcus saitoi</i> ¹	=	Hong et al.(2006)***	S,R	A	+	+	nd
<i>Cryptococcus terreus</i>	=	di Menna (1965)/ Hong et al. (2006)***	S	P, V	+	+	+
<i>Cryptococcus terricola</i> ¹	=	Maksimova e Chernov (2004)	S	FL	+	+	nd
<i>Cryptococcus victoriae</i>	=	Wuczkowski e Prillinger (2004)***	S	Vz	+	+	nd

continua.

Identificação em Kurtzman e Fell (1998)	Identificação original	Referências	Substrato	Ambiente	Assimilação		
					xil	ara	cel
<i>Cryptococcus vishniacii</i> ¹	=	Vishniac (1996)**	S	Po	+	+	nd
<i>Cryptococcus waticus</i> ²	=	Hong et al.(2006)***	R	A	+	-	nd
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	=	Slaviková e Vadkertiová (2000,2003*)/ Maksimova e Chernov (2004)/ Glushakova e Chernov (2004)	S, F	FL, P	+	v	+
<i>Debaryomyces hansenii</i> ¹	= <i>Candida famata</i>	Vishniac (1996)**/ Middelhoven (1997)/ Azeredo et al. (1998)/ Polyakova et al. (2001)/ Vital et al. (2002)	S,R, F	A, FL, Po	+	+	nd
<i>Erythrobasidium hasegawianum</i>	=	Inácio et al. (2002)/ Inácio (2003)	F	Fl	nd	nd	nd
<i>Fellomyces horovitziae-like</i> ¹	=	Azeredo et al. (1998)	R	A	+	+	nd
<i>Filobasidium uniguttulatus</i>	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	Bab'eva e Azieva (1980)/ Inácio et al. (2002)/ Inácio (2003)	S, F	T, Fl	+	+	-
<i>Guehomyces pullulans</i> ^{1,4}	<i>Trichosporon pullulans</i>	Bab'eva e Sadykov (1980)/ Bab'eva e Chernov (1995)**/ Maksimova e Chernov (2004)/ Wuczowski e Prillinger (2004)***/ Hong et al.(2006)***	S	FL, Vz	+	+	nd
<i>Lalaria inositophila</i>	=	Inácio et al. (2002)/ Inácio (2003)	F	Fl	nd	nd	nd
<i>Leucosporidium scotti</i>	=	Chernov (1985)/ Vishniac (1996)**/ Slaviková e Vadkertiová (2000)/ Glushacova e Chernov (2004)/ Maksimova e Chernov (2004)	S, F	FL, Po, T	+	v	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> ¹	=	Kvasnikov et al. (1975)/ Slaviková e Vadkertiová (2003b)	S	A	+	-	nd
<i>Mrakia frigida</i>	= <i>Cd. curiosa/gelida</i>	Bab'eva e Azieva (1980)/ Chernov (1985)/ Vishniac (1996)**	S, F	Po, T	+	+	+
<i>Pseudozyma</i> sp.	=	Middelhoven (1997)	F	Ar	nd	nd	nd
<i>Rhodotorula</i> sp.	=	Hislop e Cox (1969)/ Andrews e Kenerley (1978)/ Andrews e Kenerley (1980)/ Robbs et al. (1989)/ Inácio et al. (2002)/ Inácio (2003)	F	A	nd	nd	nd
<i>Rhodotorula bacarum</i>	=	Inácio et al. (2002)/ Inácio (2003)	F	Fl	nd	nd	nd
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	=	Slaviková e Vadkertiová (2000)	S	FL	+	v	v
<i>Rhodotorula fujisanensis</i>	=	Glushacova e Chernov (2004)	F	Fl	nd	nd	nd
<i>Rhodotorula glutinis</i>	=	di Menna (1959, 1971)/ Ruinen (1963)/ Kvasnikov et al. (1975)/ Flannigan e Campbell (1977)/ McBride e Hayes (1977)/ Bab'eva e Sadykov (1980)/ Chernov (1985)/ Moawad et al. (1986)/ Vinovarova e Bab'eva (1987)/ Middelhoven (1997)/ Slaviková et Vadkertiová (2000)/ Vital et al. (2002)/ Glushacova e Chernov (2004)/ Maksimova e Chernov (2004)	S, F	A, FL, P, T, V	v	v	v

continua.

Identificação em Kurtzman e Fell (1998)	Identificação original	Referências	Substrato	Ambiente	Assimilação			
					xil	ara	cel	
<i>Rhodotorula graminis</i> ¹	=	di Menna (1959, 1971)/ (1963)/ Hong et al.(2002)***	Ruinen	R, F	A, P	+	+	nd
<i>Rhodotorula ingeniosa</i>	=	di Menna (1959, 1971)/ Flannigan e Campbell (1977)/ Pennycook e Newhook (1981)		F	A, P	nd	nd	nd
<i>Rhodotorula marina</i>	=	di Menna (1959, 1971)		F	P	nd	nd	nd
<i>Rhodotorula minuta</i> ¹	=	Robbs et al. (1989)/ (1996)**/ Maksimova e Chernov (2004)	Vishniac	S, F	A, Fl, Po	+	+	nd
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	=	di Menna (1959, 1971)/ (1963)/ Kvasnikov et al. (1975)/ Vishniac (1996)**/ Gunasekera et al. (1997)/ Middelhoven (1997)/ Azeredo et al. (1998)/ Polyakova et al. (2001)/ Vital et al. (2002)/ Maksimova e Chernov (2004)/	Ruinen	S,F	A, FL, P, Po, T	+	v	v
<i>Rhodotorula rubra</i>	=	Ruinen (1963)/ Bab'eva e Sadykov (1980)/ Pennycook e Newhook (1981)/ Robbs et al. (1989)		F	A	nd	nd	nd
<i>Rhodotorula slooffiae</i> ¹	=	Inácio et al. (2002)/ Inácio (2003)/ Hong et al. (2006)***		R, F	A, Fl	+	+	nd
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ¹	<i>Candida robusta</i>	Vital et al. (2002)		S	FL	-	-	nd
<i>Schizoblastoporiidium starkeyi-henricii</i>	=	di Menna (1965), Hong et al (2006)***		S,R	A,P, V	-	-	-
<i>Sporidiobolus</i> sp.	=	Gunasekera et al. (1997)		F	A	nd	nd	nd
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	=	Bab'eva e Sadykov (1980)		F	P	nd	nd	nd
<i>Sporobolomyces</i> sp.		Pugh e Buckley (1971)/ Lindsey e Pugh (1976)/ Andrews e Kenerley (1978)/ Andrews e Kenerley (1980)		F	A	nd	nd	nd
<i>Sporobolomyces coprosmae</i>	=	Inácio et al. (2002)/ Inácio (2003)/		F	Fl	nd	nd	nd
<i>Sporobolomyces gracilis</i>	=	Inácio et al. (2002)/ Inácio (2003)/		F	Fl	nd	nd	nd
<i>Sporobolomyces roseus</i>	=	Kerling (1958, <i>apud</i> Last e Price 1969)/ Hogg e Hudson (1966)/ Hislop e Cox (1969)/ Pugh e Mulder (1971)/ McBride e Hayes (1977)/ Flannigan e Campbell (1977)/ Breeze e Dix (1981)/ Pennycook e Newhook (1981)/ Vinovarova e Bab'eva (1987)/ Azeredo et al. (1998)/ de Jager et al. (2001)/ Polyakova et al. (2001)/ Glushacova e Chernov (2004)/ Maksimova e Chernov (2004)/ Wuczkowski e Prillinger (2004)***		S, F	T, Vz	v	v	v
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	=	Inácio et al. (2002)/ Inácio (2003)		F	Fl	nd	nd	nd
<i>Sporobolomyces ruineniae</i>	=	Ruinen (1963)		F	Fl	nd	nd	nd

continua

Identificação em Kurtzman e Fell (1998)	Identificação original	Referências	Substrato	Ambiente	Assimilação		
					xil	ara	cel
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> ¹	<i>S. odorus</i>	di Menna (1959, 1971)/ Gunasekera et al. (1997)/ Slaviková e Vadkertiová (2003a, 2003b)	S, F	A,P	+	-	nd
<i>Torulopsis</i> sp.	=	McBride e Hayes (1977)	F	Fl	nd	nd	nd
<i>Trichosporon</i> sp.	=	Azeredo et al. (1998)	F	A	nd	nd	nd
<i>Trichosporon cutaneum</i>	=	di Menna (1965)/ Flannigan e Campbell (1977)/ Slaviková e Vadkertiová (2000, 2003a)	S, F	P,FL, V	+	+	+
<i>Trichosporon dulcimum</i> ¹	=	Wuczkowski e Prillinger (2004)***	S	Vz	w	w	nd
<i>Udeniomyces pyricola</i>	=	Pennycook e Newhook (1981)	F	A	nd	nd	nd
<i>Williopsis californica</i> ¹	<i>Hansenula californica</i>	Kvasnikov et al. (1975)	R	A	+	-	nd
<i>Williopsis saturnus</i> ¹	<i>Hansenula saturnus</i>	Kvasnikov et al. (1975)/ Hong et al. (2006)***	S,R	A	+	-	nd

= - sem alteração na identificação original; F- filoplano; S - solo; R - rizosfera; A - agrícola; Ar - árido; Fl - floresta; P - pasto; Po - polar; V - vários; Vz - várzea; T - tundra; xil - xilose; ara - L-arabinose; cel - celobiose; nd - não disponível; + - positivo; - - negativo; v - variável; w - fraco.

* adaptada e ampliada de Botha (2006) e Fonseca e Inácio (2006);

** dados citados; *** Identificação da espécie por comparação da seqüência de rDNA com bancos de dados.

1 - dados de assimilação da estirpe padrão (*typo*) depositada na coleção do CBS;

2 - identificação da espécie e dados de assimilação em Guffog et al. (2004);

3 - possível nova espécie, seqüência com menos de 97% de similaridade com a espécie citada;

4 - identificação da espécie em Fell e Scorzetti (2004).

Utilizando metodologia para isolamento de leveduras patogênicas não-queratinolíticas com isolamento indireto em camundongo e queralinolíticas com isolamento em meio específico, Mok et al. (1984) isolaram em grande parte espécies do gênero *Candida*, de amostras de solos da região amazônica. Em menor quantidade, também foram encontradas espécies dos gêneros *Debaryomyces*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*. Os autores não encontraram relação entre distribuição geográfica e a diversidade de espécie encontrada. Na região amazônica também foi realizado um estudo para verificar a atividade de produção de micocina entre leveduras encontradas no solo. O levantamento da população de leveduras no solo sob floresta foi realizado na ilha fluvial da Estação Ecológica Maracá em Roraima (VITAL et al., 2002). Foram obtidos 240 isolados de leveduras distribuídos entre 16 gêneros e 66 espécies, sendo 82% isolados ascomicéticos. Nestas condições foi observada uma dominância em torno de 5% ou mais das espécies ascomicéticas *Candida etchellsii*, *C. famata*, *C. robusta* e *Debaryomyces hansenii*, e basidiomicéticas *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula mucilaginosa* na população encontrada. Os autores atribuem a grande predominância de leveduras ascomicéticas neste levantamento ao meio de cultura utilizado (YM-agar), que teria favorecido o isolamento deste tipo de organismo.

Em estudo com 180 amostras retiradas de solo de três tipos diferentes de floresta temperada, Sláviková e Vadkertiová (2000) encontraram menores quantidades de leveduras no inverno ($1,5 \times 10^3$ UFC.g de solo⁻¹) e maiores quantidades na primavera ($1,1 \times 10^4$ UFC.g de solo⁻¹). As espécies mais recorrentes no isolamento, independente do tipo florestal, foram *Cryptococcus laurentii*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Leucosporidium scotii*, *Rhodotorula aurantiaca* e *Trichosporon cutaneum* de um total de 18 espécies pertencentes a 11 gêneros. As mesmas autoras em 2003 publicaram mais dois levantamentos, um em solo de pastagem

(SLÁVIKOVÁ e VADKERTIOVÁ, 2003a) e o outro em solo cultivável (SLÁVIKOVÁ e VADKERTIOVÁ, 2003b), ambos de área temperada, Eslováquia. Nas pastagens foi observado que o período de maior quantidade de leveduras foi também na primavera, mas as variações foram de 4×10^2 a 8×10^4 UFC por grama de solo. As espécies *C. laurentii*, *C. albidus*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sporobolomyces salmonicolor* e *Trichosporon cutaneum* representaram 92% da contagem de um total encontrado de 11 espécies distribuídas em 8 gêneros. Em solo cultivável foi observada uma maior contagem de leveduras em campo de milho ($6,8 \times 10^3$ UFC.g de solo⁻¹) quando comparada com as de solo de cultivo de beterraba, batata e cereal (10 UFC.g de solo⁻¹). As espécies dominantes para as quatro culturas foram *C. laurentii*, *Candida maltosa*, *Metschnikowia pulcherrima*, e *Sporobolomyces salmonicolor*. Porém foram observadas diferenças na proporção destas espécies. Para beterraba e batata foram semelhantes com maior número de *M. pulcherrima* e *C. laurentii*, enquanto para milho *C. laurentii* era mais abundante e para o solo do campo de cereal *C. maltosa* foi mais numerosa. Segundo as autoras estas variações podem ter vários motivos sendo os mais importantes: as características das plantas e os trato culturais diferenciados, como aplicação de fertilizante e pesticidas que poderiam alterar as populações no solo.

Uma abordagem de estratificação do ecossistema foi utilizada por Maksimova e Chernov (2004). Os autores realizaram um interessante estudo nos três tipos florestais principais da região européia central da Rússia. Segmentando o ambiente verticalmente, foram coletadas amostras de folhas e galhos vivos, folhas e galhos secos na planta, folhas e galhos caídos em vários estágios de decomposição, material vegetal no folheto, e amostras de solo superficial (horizonte A) e até 40-50 cm de profundidade (horizonte B). Apesar da variação dos dados, nos três tipos florestais observa-se que o tamanho da população foi menor nas amostras de solo em comparação com as demais e a diversidade da camada superficial do solo era similar em número de espécies a do folheto e das folhas e galhos secos, porém menor do que as da superfície do vegetal vivo. A diversidade de espécies diminuía nas amostras da camada mais profunda. A prevalência de espécies dominantes nas populações de levedura é bastante alterada quando se compara solo com superfície vegetal. *T. pullulans*, *Cryptococcus terricola* e *C. podzolicus* dominam no solo e não foram encontrados em material vegetal, enquanto que *C. albidus*, *C. laurentii* e *L. scottii* predominavam em material vegetal e não foram encontrados no solo. As amostras de folheto apresentaram populações contendo espécies do solo e da planta e *C. albidus* com mais de 50 % e *Cystofilobasidium capitatum* com 15% de probabilidade de dominância. *C. capitatum* é a espécie que aparece dominante em todos os estratos estudados com exceção do horizonte B. A probabilidade de dominância aumenta do tecido vegetal vivo (4%) para o folheto e diminui na camada superficial do solo (10%).

Polyakova et al. (2001) estudando população de leveduras em solos alagados da Sibéria e do Alasca, com características físico-químicas semelhantes, encontraram diferenças na composição de espécies presentes nestas duas regiões. O solo da região da Sibéria era povoado principalmente por espécies de levedura basideomicéticas do gênero *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* e ascomicéticas do gênero *Candida* e *Debaryomyces* enquanto espécies dos gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula* dominavam completamente no Alasca. Os solos destas duas áreas são caracterizados pela formação de turfa, devido à demorada degradação da matéria orgânica, pelos baixos teores de oxigênio e pela acidez. A microbiota tem a sua atividade limitada principalmente pela temperatura no Alasca e pela baixa disponibilidade de minerais no solo na Sibéria. Embora estas limitações possam ser importantes na diferenciação das populações os autores acreditam que fatores geográficos, mais especificamente as regularidades zonais dependentes da latitude, sejam os responsáveis pelas diferenças observadas.

O levantamento de leveduras utilizando isolamento em meio e posterior identificação dos isolados por sequenciamento de DNA ribossômico foi realizado em solos aluviais do rio Danúbio na região da Áustria (WUCZKOWSKI e PRILLINGER, 2004). Foram obtidos 136 isolados e suas seqüências agrupadas em 36 tipos que foram relacionadas a 16 gêneros e mais dois tipos que não puderam ser identificados. O gênero mais comum foi o *Cryptococcus* (61 isolados pertencentes a 12 espécies). As leveduras basideomicéticas predominaram com 60% dos isolados obtidos. Sendo as espécies mais presentes *G. pullulans*, *Cryptococcus aerius*, *C. vitoriae*, *C. macerans*, *Sporobolomyces roseus* e *Trichosporon dulcitum*.

Em levantamento da diversidade de leveduras isoladas de amostras de plantas, água, solo e solo rizosférico em ambiente natural na Coreia (HONG et al., 2002) e identificação dos isolados por sequenciamento de DNA ribossômico, foi observado que as leveduras do solo eram predominantemente basideomicéticas, das classes *Uredynomicetes* e *Hymenomicetes* (39 em 41 isolados), enquanto que as ascomicéticas predominavam nas amostras de flores. Ao analisar as espécies em rizosfera de macieira (*Malus* sp.), ginsengue e balão chinês (*Platycodon grandiflorum*), uma planta da família das *Campanulaceae*, verificaram que enquanto as leveduras presentes em *P. grandiflorum* pertenciam aos seis maiores gêneros de basideomicetos, as de rizosfera de macieira se concentravam em *Filobasidiales* e as de ginsengue em *Tremellales*. Não há certeza sobre a causa desta variação que pode ter sido pelas espécies vegetais, por variações no solo ou por uma conjunção de fatores não controlados neste trabalho. Os autores também relatam que quase 40% das seqüências encontradas em amostras de solo rizosférico podem pertencer a espécies não descritas, pois estão abaixo dos 99% de identidade com as seqüências de espécies conhecidas.

O mesmo grupo em trabalho orientado para a prospecção de leveduras para controle biológico em ginsengue (HONG et al., 2006), realizou um levantamento da diversidade de leveduras presentes em campo de cultivo de ginsengue com 1, 3 e 5 anos na Coreia. As amostras de solo e solo rizosférico resultaram em 34 isolados que foram identificados por sequenciamento do DNA ribossômico como sendo 7 isolados pertencentes a 3 espécies de ascomicetos e os restantes 34 pertencentes a 14 espécies de basidiomicetos (12 de *Hymenomycetous* e 1 de *Uredinomycetous*). Das 12 espécies de *Hymenomycetous*, 2 pertencentes ao gênero *Cryptococcus* possuem variações na seqüência suficientes para que seus isolados sejam classificados como pertencentes a espécies de leveduras ainda não descritas. *Schizoblastosporion starkeyi-henricii*, *W. saturnus*, *C. laurentii*, *C. terricolus* e 3 das 4 prováveis novas espécies foram encontrados nos dois tipos de amostras, enquanto que *Rhodotorula slooffiae*, *C. flavescens* e *C. podzolicus*, *C. watticus* foram identificados apenas em amostra de rizosfera e *C. gastricus*, *C. terreus*, *Guehomyces pullulans* apenas em amostra de solo não rizosférico.

Trabalhos científicos de comunidades de leveduras que abordem o ambiente rizosférico, como estes dois citados anteriormente, são poucos e a primeira vez que é relatado o isolamento deste tipo de organismo de amostras de raízes foi em 1957. Na Nova Zelândia, di Menna (1957) descreve a presença predominante de *C. terreus* (57%), *S. starkeyi-henricii* (18%) e *C. curvata* (13%) em amostras de raízes de pastagem resistente à baixa fertilidade do solo. Estas mesmas espécies, em proporções semelhantes, foram dominantes no solo aonde as raízes foram coletadas. O assunto foi abordado na literatura pela escola russa de microbiologia do solo que se dedicava ao estudo das leveduras de solo e deve ter se deparado com questionamentos sobre as comunidades presentes nas raízes das plantas. Em 1966, foi publicado um artigo com o título “Leveduras na Rizosfera” por Bab’eva e Belianin (1966) que é uma das literaturas russas de difícil acesso. Uma idéia geral, dos resultados encontrados neste trabalho, pode ser compreendida pela revisão de Bab’eva e Chernov (1995). Nesta revisão os autores citam como uma das conclusões de uma tese de doutoramento sobre o assunto é que as populações de leveduras encontradas na rizosfera, pelos autores russos, não

diferenciavam das espécies encontradas na superfície das plantas e no folheto (GUZEVA, 1978 *apud*. BAB'EVA e CHERNOV, 1995).

Kvasnikov et al. (1975) descreveram que as espécies de leveduras do gênero *Cryptococcus* e *Hansenula* são mais freqüentes na rizosfera de plantas domesticadas enquanto que *Debaryomyces*, *Hanseniaspora apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida krusei* e *Trichosporon cutaneum* prevalecem em plantas silvestres. Em rizosfera de cana de açúcar cultivada na região de Campos dos Goytacazes - RJ (AZEREDO et al., 1998) foi observado uma maior quantidade de isolados basidiomicéticos (40 sendo 14 *C. albidus* e 9 *Fellomyces horovitziae*-like) em relação aos ascomicéticos (14 prevalecendo *D. hansenii* com 7 isolados). Ainda, como leveduras que podem ser encontradas na rizosfera temos *Saturnispora ahearnii*, isolada de uma gramínea do gênero *Spartina* em solo salino na Lusiana, EUA (KURTZMAN, 1991) e *Kluyveromyces piceae* isolada de *Picea abies* (abeto) (WEBER et al., 1992), em trabalhos de descrição de novas espécies.

Outras leveduras características do solo são as do gênero *Lipomyces*. Este gênero possui 10 espécies (Tabela 3), todas elas descritas de isolamento de solo. A coleção de cultura do CBS possui 105 estirpes de *Lipomyces* depositadas, todas elas vieram de amostras deste substrato (ROBERT, V. comunicação pessoal). Porém, nos levantamentos das populações de leveduras por isolamento em meio de cultura, comumente se utiliza concentrações de nutrientes em torno de 1% de fonte açúcar, normalmente glicose, e 1% de nitrogênio, entre peptona, extrato de levedura e extrato de malte. Estas concentrações impedem o isolamento destas espécies, e o meio de cultura desenvolvido para isolamento deste gênero de levedura não contém fonte de nitrogênio (STARKEY, 1946). A levedura cresce utilizando o nitrogênio fixado por bactérias (*Azotobacter*) que se desenvolvem na placa. As leveduras deste gênero são não-fermentativas e tem como característica o acúmulo de grânulos de lipídios no interior da célula. Possuem grande variabilidade metabólica que permite a assimilação de produtos da degradação de plantas por fungos e procariontes, e cápsula polimérica que ajudaria absorver nutrientes minerais escassos do ambiente. Por estas características e por ser isolado quase que exclusivamente de amostras de solo este gênero é considerado como sendo próprio deste ambiente (BOTH, 2006).

Os métodos clássicos de microbiologia promovem isolamentos preferenciais de determinadas espécies em detrimento de outras. Por diversas vezes, foi comprovada que a utilização de meios com composição diferente revelam diferentes estruturas de populações microbianas, por exemplo: de *Pseudomonas* (TABACCHIONI et al., 2000); de leveduras patogênicas (SILVA et al., 2004) e de bactérias em geral (DAVIS et al., 2005). Isto é uma das principais críticas à utilização dos métodos de isolamento em meio de cultura como ferramenta para descrever a diversidade microbiológica de um ambiente. Com o advento das técnicas de biologia molecular foi possível realizar a identificação das espécies em amostras ambientais sem a necessidade de cultivo prévio. Rapidamente estas técnicas se difundiram na área de Ecologia Microbiana, onde as metodologias clássicas além do problema do isolamento preferencial também eram consideradas demoradas. Mas, infelizmente, alguns anos foram suficientes para mostrar que as técnicas moleculares também sofrem de um problema semelhante, no caso, a amplificação preferencial das seqüências de DNA, como descrito para fungos por Anderson et al. (2003a). Ao invés de se considerar como um problema das técnicas, a identificação preferencial deve ser encarada como uma característica e explorada dentro de suas limitações. Na verdade, estas limitações já são exploradas através da utilização de meios seletivos, meios de enriquecimento, amplificação de grupos funcionais e de grupos taxonômicos.

Tabela 3: Espécies de *Lipomyces*, código da coleção de cultura do Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), local de seus isolamentos e algumas características de assimilação de açúcares.*

Código		Local do isolamento	Assimilação (dados da página do CBS)**							
CBS	Espécie		xil	ara	amido	xil- ol	ara- ol	glu -ol	man -ol	gal- ol
CBS 7729	<i>Lipomyces kockii</i>	África do Sul	-	-	+	+	-	-	+	+
CBS 2514	<i>L. kononenkoae</i>	Trinidade e Tobago	-	-	+	+	-	+	+	-
CBS 5608	<i>L. spencermartinsiae</i>	Nigéria	-	-	+	+	-	+	+	-
CBS 944	<i>L. lipofer</i>	Holanda	+	+	+	+	d	+	+	d
CBS 7661	<i>L. mesembrius</i>	África do Sul	-	-	-	-	-	d	d	-
CBS 10300	<i>L. orientalis</i>	Vietnam	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CBS 1807	<i>L. starkeyi</i>	EUA	+	+	+	+	+	+	+	+
CBS 5910	<i>L. tetrasporus</i>	Rússia	+	d	+	+	+	+	+	+
CBS 7532	<i>L. yamadae</i>	África do Sul, Cidade do Cabo	-	-	+	d	-	+	+	-
CBS 7557	<i>L. yarrowii</i>	Maurício	-	-	+	+	-	+	+	+

* Dados fornecidos por Vincent Robert, curador da base de dados do CBS.

** xil – xilose; ara – L-arabinose; xil-ol – xilitol; ara-ol – L-arabinitol; glu-ol – glucitol; man-ol – manitol; gal-ol – galactitol; + - positivo; - - negativo; d – assimilação lenta; nd – não disponível.

De qualquer forma, as técnicas de biologia molecular na identificação direta das populações de levedura no solo ainda foram muito pouco exploradas (Tabela 4). As técnicas moleculares foram utilizadas, também, por grupos de pesquisadores que trabalham com fungos filamentos e as leveduras apareceram quase que acidentalmente nestes trabalhos como em Smit et al. (1999) que relataram a presença de seqüências similares a *Cryptococcus albidus*, *Filobasidium floriforme* e *Bullera crocea* na rizosfera de trigo e em Anderson et al. (2003b) com *Sporopachydermia* sp. e *Trichosporon porosum* em solo de floresta de pinheiro. Em 2003, Gomes et al., em estudo da caracterização da população de fungos em milho cultivado em sistema agroecológico, utilizaram iniciadores específicos para fungos na amplificação de DNA extraído do solo e da rizosfera de milho. Os resultados mostraram a presença de leveduras basidiomicéticas na rizosfera de milho quando a planta estava senescente (90 dias), mas não quando jovem (20 dias). Alguns clones das bandas do perfil eletroforético de DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante) foram seqüenciados e resultaram em seqüências similares a *Cryptococcus magnus*, *C. luteolus*, *Sporidiobolus johnsonii* ou *S. salmonicolor*, *Bullera oryza*, *B. hanna*e e *B. unica*.

Um outro estudo utilizando iniciadores específicos para basideomicetos foi realizado para avaliar a população de fungos em solo sob diferentes manejos da Estação Biológica Kellog em Michigan, EUA, (LYNCH e THORN, 2006). As espécies de fungos foram identificadas através da extração, amplificação do DNA ribossômico e clonagem, os clones foram caracterizados por RFLP (polimorfismo pelo tamanho do fragmento) e para cada amostra de solo um representante de cada tipo de polimorfismo encontrado era selecionado para o sequenciamento. As leveduras encontradas pertenciam a diversas espécies do gênero *Cryptococcus*: *C. luteolus*, *C. macerans*, *C. podzolicus*, *C. tephrensis*, *C. terreus* e *C. terricola*, além de *Guehomyces pullulans* e *Trichosporon dulcitum*, este último com o maior número de clones entre as espécies de leveduras.

Ao avaliar a diversidade de fungos na rizosfera de plantas em uma ilha na região das Ilhas Canárias, Espanha, Zachow et al. (2008) encontraram 8 espécies de *Cryptococcus* (Tabela 4) em uma população dominada por fungos basideomicetos. Os autores utilizaram técnica de amplificação de ácido nucleico e posterior determinação de polimorfismo conformacional em gel (SSCP). Algumas bandas formadas foram seqüência das para identificação dos organismos presentes no ambiente.

Tabela 4: Porcentagem de identidade de seqüências de DNA ribossômico encontradas em amostras de solo e rizosfera com seqüências depositadas em banco de dados públicos.

Referência (amostra)	Espécie	Identidade (%)
Smit et al., 1999* ¹ (rizosfera de trigo)	<i>Cryptococcus albidus</i>	82,5
	<i>Dioszegia crocea</i>	86,4
	<i>Filobasidium floriforme</i>	83,7
Anderson et al., 2003b* ² (solo, plantio de <i>Pinus</i>)	<i>Sporopachydermia</i> sp.	70,7
	<i>Trichosporon porosum</i>	99,4
Gomes et al., 2003* ¹ (rizosfera de milho em agroecossistema)	<i>Bullera hanna</i>	99,5
	<i>Bullera oryzae</i>	99,7
	<i>Bullera única</i>	97,2
	<i>Cryptococcus luteolus</i>	99,8
	<i>Cryptococcus magnus</i>	99,8
	<i>Sporidiobolus johnsonii</i> / <i>S. salmonicolor</i>	100
Renker et al., 2004** ² (raiz e esporos de micorrizas)	<i>Cryptococcus aerius</i>	94,0
	<i>Cryptococcus cellulolyticus</i>	89,0
	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	99,0
	<i>Cryptococcus saitoi</i>	76,0
	<i>Cryptococcus statzelliae</i>	91,0
	<i>Cryptococcus victoriae</i>	100,0
	<i>Dioszegia crocea</i>	100,0
<i>Dioszegia hungarica</i>	84,0	
Lynch e Thorn, 2006** ³ (solo em agroecossistema)	<i>Cryptococcus luteolus</i>	>99,0
	<i>Cryptococcus macerans</i>	>99,0
	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	>99,0
	<i>Cryptococcus tephrensis</i>	>99,0
	<i>Cryptococcus terreus</i>	>99,0
	<i>Cryptococcus terricola</i>	>99,0
	<i>Guehomyces pullulans</i>	>99,0
<i>Trichosporon dulcimum</i>	>99,0	
Zachow et al., 2008* ² (rizosfera, várias plantas)	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	98
	<i>Cryptococcus phenolicus</i>	96-98
	<i>Cryptococcus aerius</i>	97-99
	<i>Cryptococcus albidus</i>	98-99
	<i>Cryptococcus antarcticus</i>	96
	<i>Cryptococcus friedmannii</i>	92
	<i>Cryptococcus vishniacii</i>	98
<i>Cryptococcus bhutanensis</i>	97-99	

1- domínio SSU (18S); 2- domínio ITS; 3 – domínio LSU-D1-D2.

Amostras amplificadas com primers universais para fungos* ou específicos para basideomicetos**.

Ao comparar as espécies encontradas por técnicas de biologia molecular (Tabela 4) com as espécies encontradas em levantamentos ecológicos que utilizaram técnicas de isolamento em meio de cultura, se observa que poucas espécies são comuns nos dois tipos de dados. As espécies comuns são do gênero *Cryptococcus*: *C. albidus* (?), *C. podzolicus* e *C. saitoi* (?). Porém, seqüências com menos de 99 % de identidade na região D1-D2 não são consideradas como sendo da mesma espécie. Era de se esperar que as técnicas moleculares pudessem detectar a presença de *C. albidus* e *C. laurentii* com a mesma frequência que as técnicas de cultivo, porque, de acordo com a literatura, estas espécies aparecem dominantes nos isolamentos em vários ambientes e substratos (Tabela 2).

A lista das espécies encontradas por estas metodologias é bastante diferente, mostrando que as espécies de leveduras, observadas por cada um destes tipos de técnicas pode ser complementar. O número de levantamentos ecológicos utilizando técnicas moleculares, ainda é bastante limitado para que se possa realizar comparações mais amplas entre os resultados destas técnicas. Além do mais, os levantamentos utilizando isolamento em meio de cultura se concentraram mais na análise de populações de solo enquanto que as moleculares estudaram mais as de rizosfera. O ideal é utilizar estas técnicas de forma complementar na identificação das populações de leveduras no solo.

2.6. Ecologia de Leveduras

Neste trabalho, entende-se como ecologia não só a distribuição das populações no espaço, mas também as interações entre estas populações e os componentes físico, químicos e biológicos presentes no ambiente. Em seguida, estão as informações encontradas na literatura sobre as interações com os componentes físico-químicos, orgânicos e as rochas e, mais detalhadamente com os componentes bióticos. Nos itens abaixo, os fungos que realizam simbioses micorrízicas foram separados dos fungos em geral, porque naqueles, o que está sendo destacado é a interação da levedura na simbiose entre o fungo e a planta e não só o que ocorre com fungo isoladamente, e também porque já havia um certo número de trabalhos direcionados para avaliar a influência de algumas leveduras sobre a interação micorrízica.

2.6.1. Solo

Algumas leveduras do solo, principalmente dos gêneros *Cryptococcus* e *Lipomyces*, produzem polissacarídeos extracelulares (EPS) e formam conjuntos contendo as células e as partículas minerais do solo (BOTHA, 2006). Os EPS produzidos pelas leveduras têm importância na formação de agregados e conseqüente melhora na estrutura do solo (BAB'EVA e MOAWAD, 1973; VISHNIAC, 1995). Em experimento em solo de deserto adicionado de rejeitos agro-industriais, Medina et al. (2004b) observaram significativa redução da condutividade elétrica do solo nos tratamentos que continham a levedura *Y. lipolytica*, algo que os autores acharam ser uma vantagem, pois a adição dos compostos elevava em demasia a condutividade nestes solos. A *Y. lipolytica* é capaz de promover em meio de cultura a solubilização de fosfato de rocha pela liberação de ácido cítrico (VASSILEVA et al., 2000). Embora não esteja comprovado que esta levedura possa efetuar a solubilização de fosfato *in vivo*, alguns trabalhos demonstraram que a co-inoculação desta levedura com fungos micorrízicos aumenta o crescimento da planta e a taxa de micorrização (ver item 2.6.5).

As leveduras constituem parte significativa da população microbiana que habita a superfície e o interior das rochas (BURFORD et al., 2003). A liberação de resíduos metabólicos como prótons e ácidos orgânicos contribuem para a dissolução e liberação dos nutrientes contidos em rochas ígneas, sedimentares e em filosilicatos (BOTHA, 2006). As leveduras e outros fungos presentes nestes substratos contribuem para a formação dos solos e o suprimento de nutrientes solúveis para as plantas e a microbiota. Leveduras ascomicéticas e basideomicéticas pertencentes aos gêneros *Candida*, *Lipomyces* e *Rhodotorula* estão presentes

nas rochas sedimentares. E as leveduras pretas pertencentes a vários gêneros, como *Aureobasidium*, *Lecythophora*, *Exophiala*, *Hortaea*, são isoladas da superfície de granito, rochas sedimentares, gnaíse, mármore e rocha calcária (BURFORD et al., 2003).

Em um estudo com comunidades microbianas após um incêndio de grandes proporções em um parque na África do Sul, Cilliers et al. (2005) apontam correlação entre a quantidade de leveduras no solo e intensidade do fogo e com algumas variáveis ambientais. A recuperação das populações de levedura levava em média um período de 13,5 meses após o incêndio. Para essa recuperação parece ter sido fundamental o aporte de matéria vegetal no outono e o período chuvoso do início do inverno, depois desta época a correlação anterior não foi mais encontrada. No inverno a textura do solo e os teores de Mg⁺⁺ e Na⁺ se correlacionaram com a recuperação da quantidade de leveduras no solo.

2.6.2. Plantas – rizosfera e filoplano

A rizosfera é um dos micro-ambientes no solo, onde há um contínuo fornecimento de energia na forma açúcares simples e boa parte dos fotossintetizados das plantas é fornecida através das raízes para a rizosfera. A quantidade e a composição dos exudados varia bastante dependendo da espécie vegetal e do estado fisiológico da planta (KUZYAKOV e DOMANSKY, 2000; NGUYEN, 2003). Os estudos de microrganismos que ocupam este ambiente sempre foram voltados para as bactérias, e com exceção das associações micorrízicas pouco se conhece sobre a ecologia de fungos na rizosfera sendo os estudos das populações de fungo no solo direcionados para decomposição da matéria orgânica. Dos poucos trabalhos encontrados com leveduras podem ser citados os de Kvasnikov et al. (1975) e de Azeredo et al. (1998). No primeiro os autores descreveram que as espécies do gênero *Cryptococcus* e *Hansenula* (atualmente *Wickerhamomyces*) são mais frequentes na rizosfera de plantas domesticadas enquanto que *Debaryomyces*, *Hanseniaspora uvarum* (*apiculata*), *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida krusei* e *Trichosporon cutaneum* prevalecem em plantas silvestres.

O segundo trabalho, Azeredo et al. (1998), relata um aumento da população total de leveduras na rizosfera de cana-de-açúcar dos 216 para 342 dias após o plantio, porém sem alteração da estrutura predominantemente basideomicética (74%) com *C. laurentii* (26%) e *Fellomyces horitizia* (16%) e também com uma proporção elevada (13%) de *D. hansenii* (ascomiceto). Ainda neste trabalho foram descritas diferenças na estrutura das populações de leveduras presentes em folha, colmo e rizosfera. Apesar da prevalência de basideomicetos nos três compartimentos, houve variação principalmente com relação às espécies raras, das 41 espécies encontradas dez eram comuns aos três compartimentos. Na revisão de Bab'eva e Chernov (1995), já extensivamente citada nesta revisão, os autores relatam que a estrutura das populações de leveduras presentes na rizosfera são semelhantes as do filoplano. Gomes et al. (2003) avaliando a população de fungos presentes em cultura de milho por técnicas moleculares, observaram que as leveduras basideomicéticas apareciam com mais frequência na rizosfera das plantas em estado de senescência, indicando uma alteração em relação à rizosfera da planta jovem e ao solo. As espécies identificadas por técnicas moleculares neste trabalho não foram as comumente encontradas no solo e na rizosfera por técnicas de cultivo em meio.

2.6.3. Animais

Os microartrópodes do solo utilizam diversos microfungos em sua dieta e são capazes de selecionar entre as espécies oferecidas quais são de sua escolha, não utilizando indiscriminadamente qualquer tipo de fungo (JORGENSEN et al. 2005). A preferência de seis espécies de colembola em se alimentar de oito espécies de fungo de solo foi testada por Jorgensen et al. (2003). Entre os fungos testados, *Cryptococcus albidus* apareceu como sendo

um dos menos preferidos, embora todas as espécies de colêmbola tenham se alimentado desta levedura. Os autores supõem que a predileção alimentar permite que espécies possam coexistir no mesmo local sem que haja grande competição por alimento entre as espécies. Embora, no trabalho, a espécie de levedura tenha sido uma das menos preferidas, colônias de microartrópodes se desenvolvem e multiplicam em condições de laboratório se alimentando unicamente de levedura (*S. cerevisiae*) (CHAMBERLAIN e BLACK, 2005). Foi também demonstrado que a composição dos ácidos graxos desses animais era alterada dependendo do estado nutricional em que a levedura foi cultivada e que em condições naturais esta composição é bastante variada indicando possível diferença na alimentação destes.

Men'ko, et al. (2006) avaliaram a predileção de duas espécies de colêmbolas por 24 leveduras obtidas de quatro ambientes diferentes: superfície de plantas vivas (epífitas), folheto (saprobiontes), solo (pedobiontes) e frutos ou locais com maior teor de açúcar (sacharobiontes). Os autores mostraram, que apesar da variação observada, *Vertagopus pseudocinereus* e *Protaphorura armata* possuem predileções diferentes pelas espécies de leveduras embora todas tenham sido consumidas. Nenhuma correlação entre o ambiente de obtenção da levedura e predileção foi observado.

No trabalho de Men'ko, et al. (2006) foi demonstrado também que as espécies de colêmbola que se alimentavam de folhas frescas de *Tilia cordata* não conseguiam sobreviver quando estas eram desinfetadas superficialmente, a não ser que sofressem um tratamento físico como congelamento ou secagem. Possivelmente algum composto inibidor presente nas folhas prejudicava os animais e a presença de fungos na superfície das folhas não desinfetadas, leveduras em sua maioria, de alguma forma revertem esta inibição. Diversas associações entre leveduras e invertebrados já foram descritas na literatura e várias espécies de leveduras associadas a estes animais foram descritas como espécies novas. Estas leveduras são conhecidas como leveduras-similar endossimbiontes (yeast-like endosymbiont-YLS) e desempenham papel na destoxificação de alimento e na reciclagem de nitrogênio para o animal. Embora a maior parte dos trabalhos com estas leveduras simbióticas tenha sido feito com animais que não são de solo, é de se esperar que este tipo de associação ocorra com a mesma frequência neste ambiente.

No solo esta associação foi mais bem estudada para os diplopodas. Byzov et al. (1993b) observaram que as espécies ascomicéticas *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspora delbrueckii* e *Zygowilliopsis (Williopsis) californica* possivelmente eram endossimbiontes da espécie de diplopoda *Pachyiulus flavipes*, pois elas permaneciam no intestino deste animal independente do tipo de alimentação. Os mesmos autores propuseram um modelo de distribuição das espécies de levedura no intestino de diplopodas (BYZOV et al., 1993a). Neste modelo, as leveduras ingeridas servem de alimento e são digeridas na porção média do intestino. Na porção terminal do intestino existe uma população de leveduras que utilizam substâncias excretadas pelo animal como resíduos de seu metabolismo entre elas ácido úrico, fosfato, sulfato, potássio, cloro e sódio. Parte destas leveduras intestinais é liberada no ambiente através das fezes e a outra parte, num movimento antiperistáltico, é lançada no intestino médio onde são digeridas e os nutrientes, agora em uma forma assimilável pelos animais, são reaproveitados. A quantidade de leveduras consumidas e liberadas nas fezes dos diplopodas é praticamente a mesma (BYZOV et al., 1998), porém o número de espécies típicas do folheto presente nos restos vegetais que estes animais consomem diminui no trato intestinal e uma outra população se faz presente nas fezes com espécies da porção terminal do intestino.

Ainda que poucas leveduras do solo tenham mostrado capacidade de realizar fermentação e produzir etanol, *S. cerevisiae* é capaz de estimular o crescimento de espécies de acetobacter em cultura conjunta pela produção de etanol (SMITH et al., 2004). As culturas destas bactérias, quando crescidas nestas condições, aumentam a patogenicidade contra

Caenorhabditis elegans, uma espécie de nematóide predador de fungos e bactérias. Uma ação direta contra esta espécie de nematóides foi descrita para *Cryptococcus neoformans*, uma levedura similar a *C. laurentii* que é comumente encontrada no solo. A ingestão desta levedura causa modificações no intestino do animal podendo levá-lo a morte (MYLONAKIS et al., 2002). Outras leveduras foram utilizadas como única fonte de alimento de *C. elegans*, e seu desenvolvimento foi considerado igual ao crescimento quando utilizado a ração própria para manutenção do animal em laboratório.

Uma espécie de protista do solo, a ameba *Acanthamoeba polyphaga*, é capaz fagocitar e diminuir a população de leveduras de *Cryptococcus neoformans* em mais de 90% em condições de laboratório (BUNTING et al., 1979). Apesar das leveduras serem capazes de manter os invertebrados de solo como única fonte de alimento em condições de laboratório, na natureza estes animais utilizam as leveduras como fonte secundária de recursos quando estão se alimentando. O total de biomassa destes microrganismos não é suficiente para manter a população de animais nas quantidades que se encontram no solo, mesmo quando estratégias de predileção alimentar observadas por Jorgensen et al. (2003) são utilizadas pelos animais. Na maior parte dos casos quando comparada à biomassa de fungos filamentosos a de leveduras é menor. Lachance e Starmer (1998) indicam que a principal função das leveduras é converter o nitrogênio, mineral ou o presente em formas simples, em proteínas e outros complexos nitrogenados na construção de suas células, tornando-os acessíveis de uma forma relativamente concentrada aos animais.

Outras interações importantes entre as leveduras e invertebrados do solo são de simbiose e mutualismo através de presença de leveduras no trato intestinal e superfície de diversos invertebrados. Auxiliando na destoxificação e reaproveitamento de nutrientes e na produção de substâncias voláteis de sinalização como descrito para drosófilas (BARKER et al., 1986) e para o sistema ecológico cacto-drosófila-levedura (STARMER et al., 1986; FOGLEMAN e FOSTER, 1989). Num ambiente heterogêneo como o solo e de difícil locomoção dispor de um sistema sinalizador para fonte de alimento, parceiro sexual e oviposição é uma vantagem no sucesso das espécies e em economia de recursos. Diversas leveduras, inclusive as isoladas de solo, produzem compostos voláteis orgânicos (VOC – *Volatile Organic Compounds*) (BUZZINI et al., 2003), embora ainda não tenha sido descrito é provável que estes mecanismos estejam presentes no solo funcionando como sinalizadores para estes animais, como o observado para os nematóides *Panagrellus redivivus* e *Rhabditis oxycerca* em laboratório (BALANOVÁ et al., 1979).

2.6.4. Fungos

A inibição de fungos filamentosos por leveduras é bastante conhecida e utilizada no controle de perdas na pós-colheita de frutos e legumes (WISNIESKI et al., 1991; PUNJA, 1997), no controle de doenças foliares (URQUHART e PUNJA, 2002; PUNJA e UTKHEDE, 2003, PICCININ et al., 2005) e perdas durante o estoque de grãos (PETERSSON e SCHNÜRER, 1998; DRUVEFORS e SCHNÜRER, 2005). Os mecanismos de ação de algumas leveduras já estão bastante estudados com relação aos patógenos nas folhas das plantas. Segundo El-Tarabily e Sivasithamparan (2006) os mecanismos utilizados nas folhas também estão presentes no solo e nos restos culturais e podem ser relevantes no biocontrole de patógenos na raiz das plantas. Estes mecanismos são: competição por nutrientes e espaço, produção de enzimas que degradam a parede celular dos fungos como quitinase e β -1,3-glucanase, produção de metabólitos voláteis e difusíveis com ação antifúngica, indução da resistência no hospedeiro e micoparasitismo. Ainda segundo os autores, as espécies de leveduras envolvidas nestes processos pertencem aos gêneros *Kloeckera*, *Debaryomyces*, *Sporotrix* (dimórfico), *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Metschnikowia*, *Thiletiopsis*,

Rhodotorula, *Cryptococcus*, *Aureobasidium* (levedura-similar), *Pichia* e *Candida*, e muitas delas estão presentes em amostras de solo.

O controle de fungos fitopatogênicos na raiz de plantas por leveduras foi bem menos estudado, até o momento apenas três trabalhos sobre o assunto foram publicados. El-Tarabily (2004) investigou a ação de três espécies de levedura, obtidas de rizosfera de beterraba, *Candida valida*, *Rhodotorula glutinis* e *Trichosporon asahii* contra *Rizoctonia solanii*. As leveduras reduziram o aparecimento de vários sintomas causados pelo patógeno às plantas de beterraba. As três espécies utilizadas não inibem uma a outra, pelo contrário, o tratamento mais eficaz foi com as três espécies em conjunto. Elas apresentam diferentes mecanismos contra *R. solanii*, *T. asahii* produz metabólitos antifúngicos, *R. glutinis* produz inibidores voláteis e *C. valida* além de produzir os dois compostos anteriores libera também β -1,3-glucanase que acaba desestruturando a parede celular e causando plasmólise das hifas de *R. solanii*. El-Mehalawy et al. (2004) relataram a aplicação única ou em conjunto das leveduras *Candida glabrata*, *C. maltosa*, *C. slooffiae*, *Rhodotorula rubra* e *Trichosporon cutaneum* era capaz de reduzir significativamente a murcha tardia do milho, causada por *Cephalosporium maydis*. O modo de ação das leveduras foi identificado como sendo a produção de metabólitos antifúngicos e enzimas de degradação da parede celular como β -1,3-glucanase e quitinase. A doença da murcha em feijões causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* tem seus sintomas reduzidos pela ação de metabólitos antifúngicos produzido pelas leveduras de rizosfera *Saccharomyces unispora* (*Kazachstania unispora*) e *Candida steatolytica* (*Zygoascus hellenicus* ou *Z. meyeriae*) (EL-MEHALAWY, 2004). Neste trabalho o autor relata um maior crescimento das plantas nos tratamentos em que as espécies de leveduras foram aplicadas ao solo contaminado com o patógeno quando comparado ao controle sem levedura.

Algumas leveduras apresentam uma estratégia especial de controle de suas populações que lhe confere grande competitividade na utilização de recursos, é a produção de micocinas ou o fenômeno “killer”. Este fenômeno foi descrito pela primeira vez em linhagens de *S. cerevisiae*. Estas linhagens conseguiam matar indivíduos sensíveis da mesma espécie pela secreção no meio de fatores protéicos tóxicos, as micocinas. Em seguida se descobriu que este fenômeno não era exclusivo desta espécie e está bem distribuído entre os gêneros de leveduras. Se a capacidade de produzir micocinas está bem distribuída também há um grande número de leveduras que perderam a virulência (produção de micocina), mas mantiveram a resistência a ela (SCHMITT e BRENIG, 2002). A base genética para a sua produção é bastante variada e existem vários tipos, mas todas elas parecem ter origem em vírus. Algumas micocinas produzidas têm efeitos contra fungos e mais raramente contra bactérias. Walker et al. (1995) verificaram a inibição *in vitro* de fungos *Hetrobasidion annosun*, *R. solani*, *Fusarium equiseti* e de outros fungos fitopatogênicos. Weiler et al. (2002), e Weiler e Schmitt (2003) reportaram a atividade antifúngica da zigocinina, uma micocina produzida por algumas espécies do gênero *Zygosaccharomyces* com amplo espectro contra fungos incluindo fungos fitopatogênicos.

Um tipo especial de predação célula a célula foi descrito em leveduras por Kreger-Van Rij e Veenhuis (1973). Segundo os autores, esta predação seria uma variação dos sistemas de anastomoses observados em hifas de fungos filamentosos. As células produzem um haustório, capaz de penetrar e matar a célula susceptível para obtenção de nutrientes. As espécies que demonstraram esta capacidade predadora pertencem ao clado *Saccharomycopsis* (LACHANCE et al., 2000) e têm como característica a deficiência em utilizar sulfato como a única fonte de enxofre. Embora não tenha sido observado diretamente no solo, duas espécies, *S. fermentans* e *S. javanensis*, foram isoladas deste ambiente indicando a possibilidade da ocorrência deste tipo de predação no solo. Ainda não estão bem entendidos todos os fenômenos envolvidos, mas sabe-se que condições de deficiência nutricional tornam a predação mais eficiente Lachance e Pang (1997). As presas podem ser leveduras de qualquer

espécie e não se encontrou alguma que fosse totalmente imune, inclusive células de culturas novas podem preda células da mesma espécie de culturas mais antiga.

2.6.5. Micorrizas

Renker et al. (2004), observaram ser bastante freqüente a presença de leveduras dos gêneros *Cryptococcus* e *Dioszegia* em micorrizas e esporos de fungos micorrízicos de diversas amostras ambientais. A identificação foi feita por amplificação do DNA extraído das hifas raízes e esporos e por amplificação de genes ribossômicos utilizando iniciadores específicos para basideomicetos. Mas, as interações de leveduras com micorrizas foram testadas pela primeira vez por Singh e Kapoor (1989) utilizando a inoculação de *S. cerevisiae* nas sementes de leguminosas. Foram testadas várias leguminosas e os resultados não foram conclusivos sobre a atuação direta da levedura sobre a associação, porém os tratamentos inoculados com leveduras possuíam maior tamanho de raiz. Em seguida num experimento muito parecido com o anterior Singh et al. (1991) testaram a influência da inoculação de células de *S. cerevisiae* vivas e mortas por autoclavagem, em micorrizas e na associação com rizóbios das leguminosas *Leucaena leucocephala*, *Glycine max*, *Cajanus cajan*, *Phaseolus mungo*, *Phaseolus aureus* e *Vigna unguiculata*. O tamanho da planta no tratamento com as células mortas, em alguns casos, mostrou diferença significativa em relação ao controle não inoculado. Porém, o tratamento com células vivas foi sempre significativamente maior ao tratamento de células mortas e ao controle, para os parâmetros número de vesículas encontradas nas raízes das leguminosas e número de esporos de fungo micorrízico na rizosfera.

A translocação de fósforo pelas hifas de *Glomus caledonium*, do solo para a planta *Trifolium subterraneum*, foi aumentada quando inoculado com a levedura comercial seca (*S. cerevisiae*). Em experimento com fonte de fósforo marcada com o isótopo P32, utilizando potes contendo uma membrana que excluía a passagem de raízes, mas não das hifas, para compartimentos laterais contendo o nutriente, Larsen e Jakobsen (1996) observaram que as hifas de *Glomus caledonium* eram maiores e o transporte de P, pelas hifas, aumentava no compartimento lateral que havia sido inoculado a levedura.

A co-inoculação de leveduras foi testada em alguns dos estudos de utilização de fungos micorrízicos imobilizados em esferas. A idéia destes sistemas de imobilização é utilizar a hifa do fungo, normalmente atraída em direção às raízes da planta, para atuar como uma ponte para os nutrientes contidos nas esferas, tornado melhorando a utilização de fertilizantes. Vassilev et al. (2001a) testaram a co-inoculação em tomateiro de *Yarrowia lipolytica* e *Glomus deserticola* neste sistema de fungo micorrízico imobilizado. Os resultados mostraram que a co-inoculação produzia melhoras significativas nos resultados de todos os parâmetros estudados, enquanto que, a utilização apenas do fungo imobilizado não diferiu do tratamento com o fungo não imobilizado. A levedura parece funcionar como um auxiliar da micorrização. Os autores acreditam que a utilização desta co-inoculação em sistemas de imobilização do fungo em esferas possa ser eficiente no estabelecimento e crescimento de plantas em solos com deficiência de nutrientes. Também em tomateiro este mesmo sistema foi testado com os fungos *G. deserticola* e *Glomus fasciculatum*, e os tratamentos com a presença da levedura aumentaram a taxas de micorrização observadas em *Trifolium repens* (VASSILEV et al., 2001b). Em co-inoculação tripla rizóbio (*Rhizobium trifoli*)-*G. deserticola*-*Y. lipolytica* (VASSILEV et al, 2001c) o tratamento com a levedura potencializou em 14% o benefício causado pela inoculação do *G. deserticola*.

Em gramíneas também foi observado o efeito sinérgico das leveduras na micorrização e no crescimento da planta (BHOWMIK e SINGH, 2004). As plantas dos tratamentos com co-inoculação de *Glomus mossea* e *S. cerevisiae* tiveram maior quantidade de raízes infectadas, maior peso seco da raiz e da parte aérea. Os valores dos tratamentos co-inoculados

diferiram significativamente dos controles sem inoculação, dos tratamentos com apenas *G. mossea* ou com apenas a levedura. Efeito semelhante, para o crescimento da planta mas não para a infecção, foi observado por Gollner et al. (2006) em milho co-inoculado com *G. mossae* ou *G. intraradices* com as espécies de leveduras *C. sake*, *C. aerius* ou *W. californica*. A presença de leveduras diminuiu a quantidade de hifas produzidas pela micorriza, sendo mais intensa com *C. sake* e *W. californica* para *G. intraradices* e com *C. aerius* e *W. californica* quando a associação foi com *G. mossea*.

A levedura *Y. lipolytica* foi classificada como levedura promotora do crescimento de planta (*plant-growth-promoting-yeast* - PGPY) por Medina et al. (2004a), após terem observado que a inoculação da levedura em conjunto com fungos micorrízicos nativos aumentava a micorrização e os teores de fósforo absorvidos por *Dorycnium pentaphyllum* um arbusto lenhoso da família *Fabaceae* plantados sobre solo de deserto. Esse aumento da colonização na planta foi potencializado quando era adicionado ao solo, rejeito agro-industrial, como fonte de nutriente. Inoculantes contendo microrganismos com capacidade de solubilização de fosfato, como a *Y. lipolytica*, e que promovam o crescimento da planta, normalmente possuem uma potencial função no controle de doenças (VASSILEV et al., 2006). Muitos destes microrganismos produzem uma série de substâncias que são utilizadas no controle biológico de diversas fitopatógenos. As formas de ação deste controle são a produção de sideróforos, de fitohormônios e de enzimas líticas. Isto é considerado por Vassilev et al. (2006) uma área de grande atuação da microbiologia e com possibilidade de variadas aplicações.

A inoculação de uma outra espécie de levedura, *Rhodotorula mucilaginosa*, aumentou significativamente o tamanho das hifas em *Glomus mosseae* e o número de esporos em *Gigaspora rosea* em experimentos em placas de Petri (FRACCHIA et al., 2003). Em experimentos em solo com soja (*G. max*) e trevo vermelho (*Trifolium pratense*), a inoculação de *R. mucilaginosa* só surtiu efeito quando era realizada antes do fungo micorrízico. Os exudados da levedura também aumentaram significativamente a micorrização nas plantas. Sampedro et al. (2004) verificaram também que o efeito da levedura era observado somente quando inoculada antes do fungo micorrízico e que os exudados líquidos e voláteis tinham um efeito positivo na simbiose embora com meio de ação diferenciado. Os autores observaram estes efeitos *in vitro* sobre *G. mosseae* e na simbiose em solo plantado com soja.

A inoculação conjunta de *G. mossae* e seis diferentes espécies de leveduras em caupi (*V. unguiculata*), em experimento de casa-de-vegetação, mostraram diferenças significativas entre os tratamentos de dupla inoculação com relação a inoculação somente de *G. mossae* e com o controle sem inoculação (BOBY et al., 2008). A combinação *G. mossae* e *R. mucilaginosa* rendeu os valores mais altos de crescimento e produtividade da planta, além de maior conteúdo de N, P e clorofila no tecido vegetal. A co-inoculação com *S. cerevisiae* rendeu os menores valores para os parâmetros estudados, porém ainda mais altos do que os valores obtidos no tratamento controle sem levedura.

2.6.6. Procariotos

Os procariotos promovem interações bastante variadas com qualquer tipo de eucarioto, e dificilmente pode se dizer que este tipo de interação não exista, independente de qual organismo se esteja referindo. As interações com leveduras também são variadas e as mais claras são a antibiose e o mutualismo. Assim, como algumas leveduras produzem antibióticos (VUSTIN et al., 1990; McCORMACK et al., 1994), bactérias também produzem substâncias que promovem a desestruturação e lise da célula de levedura. Aproximadamente, metade das espécies bacterianas encontradas em um levantamento, em diversos ambientes naturais, inclusive solo, possui esta capacidade (CHERNYAKOVSKAYA et al., 2004). As leveduras basidiomicéticas *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus albidus* e *Phaffia rhodozyma* e as

ascomicéticas de solo, a *Lipomyces kononenkoae* e a *L. tetrasporus*, foram as mais susceptíveis à lise pelas bactérias.

A aplicação de leveduras para controlar a patogenicidade causada por bactérias em repolho foi avaliada por Assis et al. (1999). Os autores testaram a capacidade de 20 isolados de leveduras de filoplano no controle da podridão preta causada por *Xanthomonas campestris*. Este tipo de podridão é uma das maiores causas de perda nos cultivos de crucíferas. Três isolados diminuíram a severidade da doença em mais de 70%. A época de aplicação da levedura foi um fator importante para esta proteção: a inoculação dos isolados de levedura diminuiu a severidade das lesões em cerca de 60 a 70 % quando as leveduras foram aplicadas pelo menos duas vezes na planta. Quando a inoculação foi realizada antes ou simultaneamente com o patógeno a diminuição ficou entre 20 e 60%. E quando realizada após o patógeno, a proteção caiu para menos de 20%. Não houve diferença significativa entre os seis cultivares avaliados.

Como associação mutualística entre leveduras e bactérias pode-se citar a observada entre as espécies do gênero *Lipomyces* e bactérias diazotróficas. Este gênero de leveduras de solo foi, por algum tempo, considerado como capaz de fixar nitrogênio (METCALF e CHAYEN, 1954; ROBERTS e WILSON, 1954; KVASHNIKOV, 1974), pois suas colônias foram vistas pela primeira vez em meios de cultura sem fonte de nitrogênio. Porém, não foi observado a capacidade de fixação biológica de nitrogênio por culturas puras de diferentes espécies de levedura quando analisado pelos métodos de isótopo estável de N ($^{15}\text{N}_2$) e pela redução do acetileno (MILLBANK, 1969). A fixação, observada anteriormente, foi atribuída à bactérias fixadoras presentes em culturas de leveduras não totalmente puras. As bactérias se desenvolvem em colônias liquescentes no meio, fixam o nitrogênio e permitem o desenvolvimento das colônias de leveduras. Atualmente, esta é a forma utilizada para isolar o gênero *Lipomyces* de amostras de solo.

Essa associação foi mensurada por Bab'eva et al. (1977) e as bactérias (*Pseudomonas*) fixavam 3,4 vezes mais em condições aeróbicas e 15 vezes mais em anaerobiose quando em presença da levedura. Neste trabalho, os autores, confirmaram as observações de Millbank (1969), e não foi observada capacidade de fixação de nitrogênio pelas leveduras do gênero *Lipomyces*. Kononkov et al. (1979) ressaltam que a fixação biológica pela bactéria é sempre menor em cultura isolada do que quando em associação com o fungo e indicam a possibilidade da existência de especificidade entre os componentes das associações de fixação de nitrogênio no solo envolvendo bactérias e fungos.

Sobre as bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas alguns poucos experimentos foram feitos para avaliar a influência de leveduras na fixação biológica de rizóbios com leguminosas. Tuladhar e Subba Rao (1987) testaram a co-inoculação de leveduras e rizóbios em trevo (*Trifolium alexandrinum*). Os autores mostraram os resultados para *Rhizobium trifolii* indicando que a co-inoculação com as leveduras *R. glutinis* e *Pichia ohmeri* aumentou significativamente o tamanho das plantas quando comparado com o a inoculação apenas com a bactéria, enquanto a co-inoculação com *S. cerevisiae* foi o tratamento que induziu a formação de maior número de nódulos. O filtrado do meio de cultura de *S. cerevisiae* induziu o mesmo efeito que a inoculação das células, indicando um possível composto extracelular da levedura que intensifica a nodulação. Resultados de aumento de número de nódulos foram obtidos também em co-inoculação de *Y. lipolytica* e *R. trifolium* em *Trifolium repens* (VASSILEV et al., 2001c) e de *S. cerevisiae* estimulando a nodulação de rizóbios nativos em leguminosas plantadas em vasos com solo não estéril (SINGH et al., 1991).

2.7. A Cultura da Cana-de-Açúcar no Brasil

A cana-de-açúcar sempre esteve ligada à história do Brasil, desde o início do período colonial, quando mudas foram trazidas de outras colônias portuguesas. Devido à sua rusticidade e ao clima brasileiro ser em sua maior parte semelhante ao de sua origem, o sudeste asiático, a cultura pode ser cultivada em todas as regiões do Brasil. Os cultivos comerciais, para produção de açúcar, foram iniciados na Zona da Mata do nordeste brasileiro, ainda no período colonial e, ainda hoje, os estados de Pernambuco e de Alagoas são importantes produtores. A cultura só se expandiu para os estados do sudeste após a crise do café na década de 1920 e posteriormente na década de 1980 para o centro-oeste (BRASIL/MAPA, 2007). São Paulo atualmente é o estado responsável por mais da metade da produção nacional, seguido de Minas Gerais, do Paraná e dos estados da região do centro-oeste (BRASIL/MAPA, 2007; IBGE, 2009). A cana-de-açúcar é a terceira maior cultura em área plantada no país, sendo que na safra de 2008 foram ocupados 8,1 milhões de hectares (Mha) com uma produção de 649 milhões de toneladas (Mt) e uma estimativa, para a safra de 2009, de 8,7 Mha, com uma produção de 690 Mt (IBGE, 2009). No mundo, os principais países produtores são Brasil, Índia, China, Tailândia e México com uma área plantada em 2007 superior a 22 Mha e produção de 1.500 Mt (BRASIL/MAPA, 2009).

No Brasil, a partir da década de 1970, devido à adoção de diversas políticas que visavam contornar a crise mundial do petróleo, entre elas a criação do Proalcool, a cana-de-açúcar passa a ganhar maior importância. Pelo volume de produção e negócios envolvidos ela é considerada um setor da economia, denominado Sucroalcooleiro. A inserção da cana-de-açúcar no setor energético brasileiro é considerado o mais bem sucedido programa de utilização de energia renovável do mundo, e em 2007, pela primeira vez, supera o setor hidrelétrico na matriz energética brasileira ocupando 15,9 % da OIE (Oferta Interna de Energia) sendo a fonte de energia que apresentou o maior crescimento, 9,6%, do ano de 2006 para o de 2007 (BRASIL/EPE, 2008). O setor sucroalcooleiro emprega hoje cerca de quatro milhões de pessoas e em 2007 foi responsável por 3,6% do PIB agrícola (EMBRAPA, 2008).

Apesar dos números grandiosos na parte econômica, muitos desafios existem em transformá-los em uma real melhoria nas condições de vida da grande maioria das pessoas vinculadas a este setor, pouca atenção é dada também à questão ambiental sendo que os principais problemas estão na destruição de ambientes naturais para os plantios e nas grandes extensões das monoculturas de cana plantadas continuamente. Neste cenário de baixa diversidade biológica é comum o aparecimento de doenças e pragas. Entre as doenças, causadas por bactérias, que mais incidem nos cultivos de cana estão a escaldadura da folha, a estria vermelha e o raquitismo da soqueira tendo os principais agentes etiológicos, respectivamente *Xanthomonas albilineans*, *Acidovorax avenae* e *Leifsonia xyli*. As principais doenças causadas por fungos são a ferrugem, causada por *Puccinia melanocephala*, o carvão, por *Ustilago scitamina*, a mancha parda, por *Cercospora longipes*, podridão abacaxi, por *Ceratocystis paradoxa*, podridão vermelha, por *Colletotrichum falcatum*, a podridão causada por *Fusarium moniliforme* e a mancha amarela causada por *Mycovillosiella koepkii* (EMBRAPA, 2008).

O plantio de cultivares resistentes ou tolerantes é a principal forma utilizada para controle das doenças em áreas afetadas e o controle da sanidade das mudas é o mais recomendado para áreas em que as doenças ainda não tenham aparecido. Os plantios desta cultura permitem, em média, 5 ou 6 cortes, com ciclo de 12 ou 18 meses entre os cortes. Quando os plantios estão estabelecidos, não há forma eficaz ou economicamente viável para controle destas doenças que podem causar perdas de até 50% da produção (EMBRAPA, 2008). Embora o controle biológico de pragas, mais notadamente de insetos pela utilização de fungos, tem sido bastante estudado e já seja empregado há décadas, o controle biológico de

doenças em cana-de-açúcar é praticamente inexistente. Blakeman e Fokkema (1982), indicaram que muitos dos organismos presentes no filoplano atuam inibindo e controlando as populações de patógenos, sendo necessário o entendimento da ecologia destes organismos para aumentar este antagonismo. Porém, estudos sobre a diversidade de fungos que ocupam a superfície destas plantas também são raros, com relação às leveduras apenas um levantamento foi realizado (AZEREDO et al., 1998), em Campos dos Goytacazes, já anteriormente mencionado nesta revisão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de Coleta das Amostras

As amostras utilizadas nos experimentos deste trabalho foram coletadas no Sistema Integrado de Produção Agropecuária-SIPA (Fazendinha do Km 47), Seropédica, RJ, uma iniciativa do convênio formado entre a Embrapa Agrobiologia, a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, a Pesagro-Rio e a Embrapa Solos. O SIPA foi iniciado em 1993 e suas atividades produtivas e experimentais estão pautadas na sustentabilidade e na exploração racional do local. A área está localizada na latitude 22° 45' sul e longitude 43° 40' oeste com altitudes variando entre 20 e 40 m. O clima da região é o Aw de acordo com a classificação de Köppen-Geiger, caracterizado por possuir verão úmido e inverno seco. Os solos do local são de baixa fertilidade, em sua maioria, formados pelas classes Planossolo e Argissolo.

Os dados meteorológicos da estação automática Ecologia Agrícola, código A160, foram obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia – INMET em sua página na rede mundial de computadores (<http://www.inmet.gov.br>). A estação reportada está localizada a 800 metros, aproximadamente, do SIPA. Para esta estação, o INMET disponibiliza informações sobre o balanço hídrico climatológico com dados da estação coletados por 30 anos entre 1961 e 1990 (Figura 2). Os dados meteorológicos do ano 2007/2008 (Figura 2), compreendendo o período das duas coletas de amostras para o estudo em cana-de-açúcar foram obtidos mensalmente na página do INMET. Para este estudo foram selecionados os dados de precipitação e de temperatura, máxima e mínima. Para os dados de temperatura foram calculados os valores médios mensais e para os dados de precipitação foram calculados os totais para cada mês.

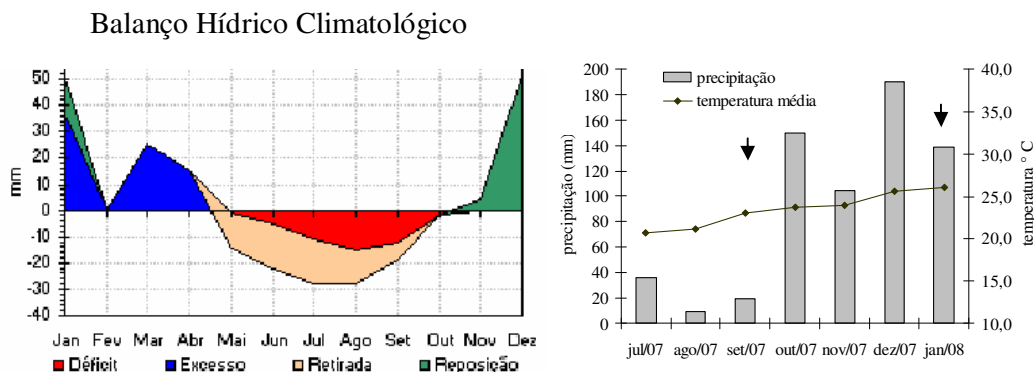


Figura 2: Balanço hídrico climatológico (1961 a 1990), fonte INMET, e dados de precipitação mensal total e temperatura média da estação meteorológica Ecologia Agrícola do período entre junho de 2007 a janeiro de 2008. As setas indicam a época das coletas no plantio de cana-de-açúcar.



Figura 3: Imagem de satélite de parte da área do SIPA. Em destaque os locais de coleta de amostras nos canteiros de hortaliças (H) e nos cultivos de milho (M) e cana-de-açúcar (C). Fonte: Google maps (<http://maps.google.com.br>).

3.2. Amostragem e Coleta

As amostragens de solo, para os testes de inibição do crescimento de fungos filamentosos em meio de cultura de isolamento de leveduras, foram realizadas nos canteiro de hortaliças (cebolinha) nos meses de maio e novembro de 2006. Um bloco de terra, com a planta, foi recortado do canteiro e removido para um pote plástico de $\pm 3,6$ L, com cuidado de se evitar a desestruturação. O pote foi transferido para o laboratório no mesmo dia e mantido sob a iluminação natural. A umidade foi mantida na capacidade de campo por adição de água esterilizada, sempre que necessário para manter a planta por algumas semanas. Amostras de solo foram retiradas do vaso com uma espátula estéril, a medida que se necessitava para a realização dos testes.

Os experimentos de avaliação de meios de cultura para o isolamento de leveduras foram realizados com amostras de solo da bordadura de um experimento de milho conduzido no SIPA. A bordadura foi composta por 4 linhas simples com 60 cm de distância entre as linhas e 30 cm entre as plantas. A coleta foi realizada em maio de 2007, quando as plantas estavam com 60 dias após o plantio. As amostras foram coletadas, com uma pequena pá, entre as plantas das linhas centrais da bordadura na camada de 2-10 cm de profundidade. Foram coletadas 10 sub-amostras de aproximadamente 200 g de solo entre as plantas e entre as linhas de plantio. A presença de raízes de planta foi comum a todas as sub-amostras. Estas, foram unidas e a amostra composta foi homogeneizada no campo em saco plástico estéril, transportada a temperatura ambiente para laboratório e processada em menos de 24 h.

A amostragem para o estudo ecológico de leveduras foi realizada em um cultivo orgânico de cana-de-açúcar, realizado em uma antiga área de pastagem em desuso. Foi realizado o plantio de toletes em sulco em janeiro de 2007, em uma área de aproximadamente 2.500 m². A área foi previamente preparada por gradagem e sulcador. Não houve qualquer tipo de emprego de fertilizantes químicos nem correção do solo. As roças manuais para a

retirada de plantas competidoras (invasoras) foram realizadas até o quarto mês após o plantio. Nenhum outro manejo cultural foi aplicado. As amostras foram coletadas em duas épocas distintas de oferta de água para a região, setembro de 2007, correspondendo ao período seco e janeiro de 2008 correspondendo ao período úmido (Figura 2).

A área do plantio de cana foi dividida em 4 sub-áreas iguais (Figura 4). Em cada uma destas sub-áreas foram amostrados três compartimentos ambientais: solo, filoplano e rizoplano. A realização da coleta foi baseada no trabalho de Robbs et al. (1989), em estudo de diversidade de leveduras em plantação de abacaxi, descrito com mais detalhe em Robbs (1986). Desta forma, foram coletadas amostras compostas formadas de cinco sub-amostras de terra, raízes e folhas de cana-de-açúcar. Os pontos de coletas das sub-amostras foram o centro da sub-área e a 15 m do centro em direção aos vértices (Figura 4). Em cada ponto, em um raio de 1m, foram coletadas cinco porções de 20 cm de folha maduras e ativas, 200 g de solo da camada de 2-10 cm de profundidade nas entrelinhas e raízes até a uma distância de 20 cm das plantas de cana.

As amostras foram transportadas para o laboratório em temperatura ambiente e processadas em menos de 24 h. Cada amostra de solo foi homogeneizada e tratada assepticamente, parte do volume da amostra foi separada, destorroada, seca, peneirada e destinada para análise das características químicas, de acordo com Embrapa (1997), no Laboratório de Solos da Embrapa Agrobiologia. Os resultados desta análise estão descritos na tabela 5.

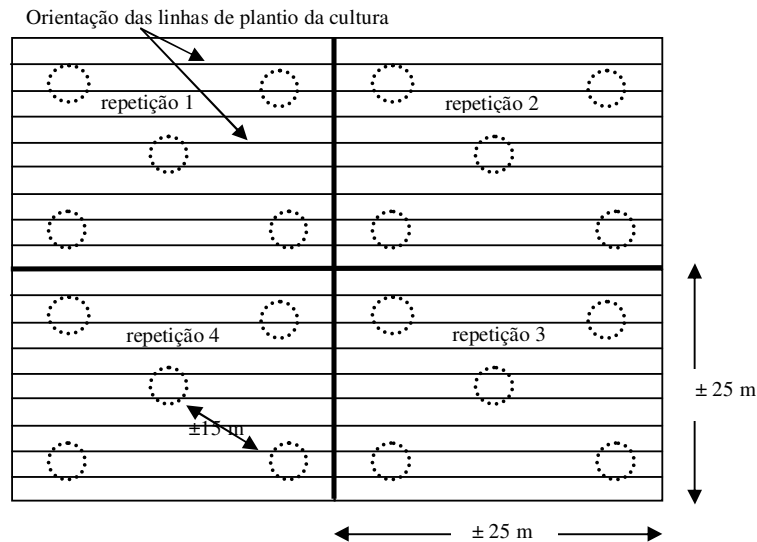


Figura 4: Desenho esquemático dos pontos de coleta das amostras no plantio de cana-de-açúcar. Os círculos pontilhados representam aproximadamente o local onde foram coletadas cada uma das 5 sub-amostras para cada repetição.

Tabela 5: Resultados da análise química de fertilidade das amostras de solo dos dois períodos de coleta.

Período	Amostra	pH*	Al	Ca+Mg	Ca	Mg	P	K	C	M.O.
			cmol.dm ⁻³			mg.dm ⁻³		g.Kg ⁻¹	%	
set/07	S1	5,8	0,1	1,5	1,0	0,5	21,7	147,5	12,0	2,1
	S2	6,0	0,0	2,6	1,8	0,8	32,5	162,5	5,0	0,8
	S3	6,2	0,0	2,0	1,4	0,6	30,3	162,5	3,0	0,5
	S4	6,0	0,0	1,5	1,0	0,5	41,0	122,5	3,0	0,5
jan/08	S1	5,7	0,1	2,3	1,7	0,6	18,5	92,5	2,0	0,3
	S2	5,9	0,0	2,3	1,5	0,8	24,5	152,5	6,0	1,0
	S3	6,1	0,0	1,7	1,2	0,5	29,0	147,5	4,0	0,7
	S4	5,8	0,0	1,3	0,9	0,4	12,8	92,5	3,0	0,6

* pH – pH em água, M.O. – matéria orgânica.

3.3. Análise da Diversidade de Leveduras em Cana-de-Açúcar

Um esquema, em forma de fluxograma, das metodologias aplicadas no estudo das populações de leveduras no plantio de cana-de-açúcar está descrito na figura 6. Raízes e folhas foram lavadas uma vez com água estéril no próprio saco plástico de coleta para retirada de partículas e células pouco aderidas. Para a extração das células foram pesados assepticamente 20 g de solo, 20 g de folhas lavadas e 5 g de raízes lavadas. As amostras foram imersas em 200 mL de solução salina com Tween 80 0,1 %, 20 g de esferas de vidro de 2-3 mm de diâmetro foram adicionadas para uniformizar a extração. Após um período de 20 min para a hidratação, as amostras foram agitadas a 150 rpm por 30 min. A extração do material das folhas foi imediatamente inoculada nos meios de cultivo enquanto que as de solo e raiz foram deixadas descansar por 5 min para a sedimentação das partículas maiores.

3.3.1. Plaquesamento, contagem e isolamento de leveduras

Cada extração e sua diluição de 10X foram inoculadas em triplicata em placas de Petri em cada um dos seguintes meios de cultura: meio batata-dextrose-agar (PDA), meio extrato de levedura-extrato de malte-agar (YM) e meio BIL-em (GARCIA, 2007). Para composição e referência dos meios de cultura utilizados ver item Meios de Cultura nos anexos. As extrações também foram inoculadas em tubos com os seguintes meios, para promover o enriquecimento de populações específicas de leveduras: fermentadoras, meio BIL (CARVALHO, 2007) com 6 % de etanol e 5 % de glicose (BIL-ge); basideomicéticas, meio BIL sem glicose e adicionado de 0,5 % de xilose e 0,5 % de lactose (BIL-lx) e leveduras resistentes ao ácido benzóico, meio BIL com 0,1% de ácido benzóico (BIL-bz). Nos meios sólidos, 0,1 mL por placa dos extratos e suas diluições foi inoculado e espalhado com alça de Drigalski, nos meios BIL-e e BIL-lx foi inoculado 1 mL por tubo e no meio BIL-bz foram inoculados 10 mL da extração por tubo. Todos os meios utilizados continham 0,04 % de cloranfenicol e 0,05 % de amoxicilina. Após a inoculação as placas e os tubos foram incubados a 26 ± 2 °C⁵ para crescimento das populações.

A contagem do número de UFC de leveduras e de fungos filamentosos por g de solo foi realizada após 3 dias de crescimento para os meios YM e PDA, e ao 5º dia para o meio BIL-em. Após a contagem as placas foram mantidas sob refrigeração (8 ± 4 °C) até que se

⁵ A partir deste ponto, caso não indicada outra temperatura, a incubação para o crescimento das culturas foi realizada a 26 ± 2 °C.

procedessem os isolamentos. Estes foram realizados com o auxílio de uma lupa estereoscópica para identificação dos tipos de colônias. Para as placas, de cada meio de cultura e de cada amostra, até 3 colônias de cada tipo identificado, foram isoladas por repasse e estriamento em placas novas contendo meio BIL-agar até obter culturas puras.

Os enriquecimentos foram estriados por esgotamento em placas de Petri com meios sólidos BIL e BIL-em. As retiradas dos meios de esgotamento para as placas foram realizadas após 4, 21 e 42 dias de incubação. Nestas placas até dois isolados de cada tipo de colônia foram repassados para novas placas com meio BIL como o realizado para os isolados dos plaqueamentos nos meio sólidos. A pureza dos isolamentos foi verificada pelas suas características de uniformidade das colônias formadas e quando necessário, pelas características celulares por microscopia ótica. Os isolados de leveduras foram então estocados a temperatura ambiente em tubos contendo 2,5 ml de meio GYMP-agar inclinado e o crescimento coberto por uma camada de óleo mineral 3 a 5 dias após a inoculação.

Os isolamentos de cana-de-açúcar foram identificados por um código composto do número da tentativa de isolamento seguido da época de coleta (s – setembro de 2007; j – janeiro de 2008), do tipo de material coletado (F - folha; R - raiz; S - solo), da repetição (1, 2, 3, ou 4), e no final do meio de cultura de origem (pda - PDA; ym – YM; em – BIL-em; e - BIL-e; xl – BIL-xl). Para identificar as retiradas tardias dos meios de enriquecimento (21 e 42 dias) uma letra 'l' foi acrescentada após o identificador do meio (*e.g.* el para os enriquecimentos BIL-e com retiradas aos 21 e 42 dias).

3.3.2. Triagem dos isolados

Os isolados obtidos foram triados de acordo com metodologia desenvolvida nesta tese, ver item 3.11 pág. 50. As características de cada isolado nos diferentes meios foram observadas de acordo com a metodologia estabelecida. Para complementar a avaliação da triagem, foram realizados juntamente, com os meios diferenciais, os testes de assimilação de glicose (C1), maltose (C11), lactose (C18), mio-inositol (C31), nitrato (N1) e nitrito (N2), com os seu controles negativos (C0) e (N0). Assim como a triagem estes testes foram realizados em placas de Petri de 15 cm e as culturas inoculadas com o carimbo de 96 ponteiros. Estes testes de assimilação de fontes de carbono foram realizados utilizando o meio BIL modificado ao invés do YNB (meio padrão da metodologia). As culturas oriundas de uma mesma amostra e que apresentaram colônias com o mesmo padrão morfofisiológico na triagem foram consideradas como isolamentos redundantes.

3.3.3. Identificação dos isolados

Após a triagem, representantes de cada grupo foram identificados por metodologia padrão, conforme descrito no item 3.5, pág. 38. Esta identificação resultou na formação de novos grupos de acordo com o perfil fisiológico e características morfológicas. Cada grupo possuindo uma hipótese de identificação. Representantes destas hipóteses tiveram suas identificações confirmadas por caracterização e identificação molecular conforme descrito no item 3.8, pág. 43. A cultura considerada como isolamento redundante, e que não foi avaliada quanto ao perfil fisiológico, foi considerado por comparação como pertencente à mesma hipótese de identificação do representante de seu grupo nos testes morfofisiológicos.

3.4. Cultivo e Manuseio de Culturas de Leveduras

Os meios utilizados para o cultivo e verificação da pureza das culturas de levedura em placa de Petri foram o meio GYP-agar ou BIL-agar. As composições destes e de outros meios utilizados nesta tese estão detalhadas nos anexos. A cultura retirada do estoque era repassada por esgotamento por estriamento com alça e incubadas por três dias. Procedia-se a verificação

da pureza da cultura, e posteriormente era repassada com alça para tubo com rolha de algodão contendo o meio GYMP-agar inclinado, incubada por dois dias e mantida a 4 °C, como estoque de trabalho. Sempre que necessário este estoque foi renovado e a pureza da cultura checada novamente.

3.5. Caracterização e Identificação de Leveduras: Metodologia Clássica

3.5.1. Características morfológicas das células

Para os isolados de levedura obtidos neste trabalho, a cultura a partir do estoque de trabalho foi crescida em meio sólido, e preparado uma lâmina a fresco para observação à microscopia ótica. As células foram observadas em aumentos de 400X e 1000X. As técnicas de contraste de fase, contraste interferencial e campo claro foram utilizadas sempre que necessário a fim de se obter uma melhor observação das estruturas celulares. As células foram observadas quanto a sua forma e tamanho, foi observado também a presença e tipo de brotamento, hifas, asco e esporos.

Em alguns casos para a melhor observação da formação de filamentos (pseudo-hifas e hifas verdadeiras) foi realizado o microcultivo em lâmina de microscopia com uma camada de meio CMA (YARROW, 1998). A cultura foi inoculada com agulha em três riscos longitudinais no meio e coberta com uma lamínula. O microcultivo foi incubado por 7 dias. O crescimento obtido e as estruturas formadas foram observadas ao microscópio.

3.5.2. Testes fisiológicos

A caracterização do perfil fisiológico das culturas dos isolados foi realizada segundo YARROW (1998). Exceto quando especificado, os testes foram realizados em meios sólidos em placas de Petri, com 10 cm de diâmetro e fundo plano, as culturas foram inoculadas pela técnica de inoculação de placas réplicas com carimbo de inox de 32 pinos. A temperatura de crescimento foi de 26 ± 2 °C e as leituras feitas na 2ª e 3ª semanas após a inoculação. O meio de cultura base para testar a assimilação de fontes de carbono é o YNB – base de nitrogênio para levedura (WICKERHAM, 1948; YARROW, 1998) e para fontes de nitrogênio o YCB – base de carbono para leveduras (WICKERHAM, 1946; YARROW, 1998). O agar utilizado para os meios sólidos foi anteriormente lavado por decantação por 3 vezes com água destilada para retirada de traços de nutrientes (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1978). Depois da última lavagem o agar foi ressuspensionado em um volume conhecido, geleificado por aquecimento e fracionado para cada um dos testes.

Para a inoculação das placas réplicas foi utilizado um multi-inoculador de aço inoxidável com um carimbo de 32 pinos de inoculação. Este multi-inoculador foi desenvolvido pelo Laboratório de Taxonomia de Leveduras do Instituto Prof. Paulo de Góes IMPPG da UFRJ, e é composto por uma base com poços e um “carimbo” inoculador contendo os pinos. A base é composta por 32 poços com a mesma distribuição dos 32 pinos do carimbo (CARVALHO, 2007).

As culturas testadas foram inicialmente crescidas em meio YM-agar ou GYP-agar por um período entre 3 e 6 dias. Com o uso de uma alça o crescimento foi então passado para meio líquido de esgotamento (YNB com 0,1 %⁶ de glicose) e crescidas sem agitação por 5 a 7 dias ou sob agitação de 180 rpm por 3 dias. Esta etapa foi realizada para promover uma diminuição das reservas de nutrientes presentes nas culturas e desta forma, não interferir no resultado dos testes. Para a inoculação, um volume de 0,3 mL do crescimento, de cada

⁶ Nesta tese foi adotado o sistema internacional de unidades (SI) ou unidades aceitas por este. Exceto quando indicado, as concentrações dos reagentes e meios de cultura sintéticos utilizados estão na notação de peso por volume (p/v).

cultura, foi transferido para um dos poços da base do multi-inoculador onde cerca de 3 μ L foram repassados pelo carimbo para o meio sólido na placa de Petri. Esta operação é repetida para cada nova placa contendo o teste a ser inoculado.

3.5.3. Assimilação de fonte de carbono

Os testes de assimilação de fontes de carbono, com exceção da rafinose utilizada na concentração final de 1 % possuem a seguinte composição: YNB, fonte de carbono 0,5 % e agar 2 %. Uma placa onde não foi adicionada fonte de carbono foi utilizada como controle (C0). As fontes de carbono foram utilizadas na identificação estão descritas na tabela do perfil de assimilação nos anexos. A codificação entre parênteses, dos testes, segue a utilizada pelo CBS. Os teste de etanol e metanol foram feitos em tubos de 13 x 100 mm, a cultura do tubo de esgotamento foi passada com uma alça para 1 mL de uma solução YNB 2X e em seguida acrescentado 1 mL do álcool a 1 % (v/v). Os tubos foram incubados sob agitação, 180 rpm por 3-4 dias.

3.5.4. Assimilação de fonte de nitrogênio

Foi avaliada a capacidade das culturas de assimilar nitrato (N1) e nitrito (N2). Para o teste N1 foi utilizado nitrato de potássio na concentração de 0,078 % e para o teste N2, nitrito de sódio a 0,028 %, nos meios com YCB e agar 2 %. O controle (N0) foi realizado com o mesmo meio sem fonte de nitrogênio. A cultura que demonstrou crescimento positivo no teste em placa foi então repassada para um tubo de ensaio 13 x 100mm contendo 2 ml do meio líquido com a fonte de nitrogênio e incubado sob agitação de 180 rpm por 1 semana. Caso houvesse crescimento, a cultura era repassada para um novo tubo para confirmação da assimilação.

3.5.5. Fermentação de fontes de carbono

A fermentação dos açúcares foi testada em tubo de ensaio de 13x100 mm com tubo de Durhan. Em cada tubo de ensaio foi colocado 2 ml de caldo base de fermentação suplementada com 2 % do açúcar testado. O caldo base é composto de peptona 0,75 % e extrato de levedura 0,45 %. Além da capacidade de fermentar a glicose (F1) testada para todas as culturas, foi realizado testes com galactose (F2), xilose (F14), D- arabinose, L-arabinose, ramnose e sacarose (F5) quando as culturas eram positivas para fermentação da glicose e positivas para assimilação destes açúcares nos testes em placa.

As culturas a serem testadas foram inoculadas neste meio e a formação de gás, capturado no tubo de Durhan, observada do 2º ao 5º, ao 7º e ao 8º dia após a inoculação. Resultado considerado positivo para o teste de fermentação é quando a ocupação por gás no tubo está igual ou acima de 1/3 de seu volume. Qualquer formação de gás perceptível até volumes menores que 1/3 do tubo é considerada fermentação fraca. E negativos, quando a formação de gás não é observada.

3.5.6. Teste de reação ao corante azul de diazonium B (DBB-diazonium blue B)

O teste de reação ao DBB foi realizado de acordo com o descrito por Hagler e Mendonça-Hagler (1991). As culturas foram transferidas para uma placa com o meio GYP-agar e crescidas por 3 semanas. Após este período, sobre cada colônia foram colocadas 2 a 3 gotas da solução DBB (tampão Tris 0,25M pH 7 e 0,1 % azul de diazonium B). Devido ao caráter instável do corante, esta solução era preparada na hora do uso e mantida em banho de gelo. O resultado positivo era observado pelo aparecimento de cor violeta, vinho ou vermelho nas colônias.

A reação positiva ao DBB indica a presença de compostos celulares característicos das leveduras basideomicéticas. Os resultados duvidosos e negativos no testes em placa foram confirmados pelo método de Hagler e Ahearn (1981) com as seguintes adaptações para míni tubos. Após o crescimento por um mínimo de 7 dias em meio GYP-agar o crescimento foi transferido com uma agulha de inoculação para um míni tubo plástico de 0,6 mL contendo 0,5 mL de NaOH 0,5 M, a suspensão de células foi agitada, aquecida a 100 °C por 1 h e centrifugada 1000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi retirado e o precipitado lavado uma vez por agitação e centrifugação com o mesmo volume de etanol comercial (~96 %). O sobrenadante foi descartado e 0,2 mL da solução DBB foi adicionada sobre as células para reação de mudança de cor. O resultado foi observado pela alteração das cores do precipitado conforme descrito para o resultado dos testes em placa.

3.5.7. Outros testes

Além dos testes de assimilação de fontes de carbono, nitrogênio, fermentação e reação ao DBB, para complementar os dados para composição do perfil fisiológico foi ainda testado a capacidade da cultura de crescer na presença de NaCl, resistência ao antibiótico ciclohexamida (actidiona), crescimento em diferentes temperaturas e formação de amido. Utilizando-se da mesma preparação de inóculo e do mesmo método de inoculação, as culturas foram repassadas para placas com o meio GYP-agar com 10 e 15 % de NaCl, o com o meio YNB 0,77 % com 0,5 % de glicose com as concentrações de 0,1 e 0,01 % de ciclohexamida e com o meio GYP-agar. Esta última placa foi incubada por até 5 dias a $36 \pm 0,5$ °C. A cultura que demonstrou crescimento a 36 °C, foi repassada para tubo contendo 2 ml de meio GYP e incubada em banho-maria a $38 \pm 0,5$ °C por até 3 dias. Desta forma, sempre excluindo as culturas que apresentavam crescimento negativo, foi realizado o teste para as temperaturas de 40, 42 e 45 °C. Nos testes de temperatura é aceitável uma variação de até 0,5 °C.

A produção de amido foi verificada pela adição de solução de lugol diretamente sobre a placa do teste de assimilação de glicose (C1) até que se cobrissem as colônias. Isto foi realizado após a última leitura dos testes de assimilação (3 semanas). As culturas que tiveram a sua cor natural tornada para cores como azul, azul escuro ou violeta, pela adição do lugol, foram consideradas positivas para produção de amido. A colônia que não teve sua cor alterada ou que assumiu a coloração marrom foi considerada como negativa para este teste.

3.5.8. Controle dos experimentos

Nos testes de caracterização do perfil fisiológico foram utilizadas culturas específicas como controle para todo o experimento. Estas culturas, pertencentes à coleção do Laboratório de Taxonomia de Leveduras, são rotineiramente testadas e possuem o perfil fisiológico estável e bem conhecido. Por possuir um perfil de assimilação de poucas fontes de carbono a cultura IMUFRJ-50148 de *Candida krusei* foi utilizada como controle negativo para a maioria dos testes em placa réplica com exceção de temperatura, C23 e C39 que nestes casos ficou como controle positivo.

A cultura IMUFRJ-50369 de *Cryptococcus uniguttulatus* foi utilizada como controle positivo para C31, C32 e para teste de reação com o DBB e como controle negativo para os demais testes. A cultura IMUFRJ-51707 de *Rhodotorula mucilaginosa* para controle positivo de C5, C6, C7, C8, C10, C11, C12, C14, C17, C19, C20, C38, como controle positivo de basideomicetos com pigmento para reação com o DBB e controle negativo de resistência a ciclohexamida nas duas concentrações. Os testes em tubos de assimilação do etanol e metanol tiveram como controle as culturas IMUFRJ-P85 ou IMUFRJ-P63 de *Candida boidinii* como controle positivo para etanol e metanol, a cultura IMUFRJ-50606 de *Saccharomyces cerevisiae* como controle negativo para metanol e positivo para etanol.

3.5.9. Leitura dos testes realizados em placa

O crescimento das culturas é observado diretamente e a característica a ser notada é a produção de massa celular. Por isso, a densidade e a profundidade do crescimento são elementos mais relevantes a serem considerados do que o diâmetro da colônia. O crescimento ralo e espalhado das culturas filamentosas, por exemplo, é interpretado como um crescimento de fundo devido a provável presença de traços de nutrientes no meio de cultura ou no inóculo, e não deve ser considerado como um crescimento positivo (Tabela 6).

Tabela 6: Pontuação atribuída ao crescimento das culturas em teste de placa réplica.

Pontuação	Crescimento observado da inoculação
ND	Se nenhuma marca for notada na superfície do agar no local de crescimento da colônia então a inoculação foi feita sem sucesso e o resultado da leitura passa a ser ND (não determinado).
0	O valor 0 (zero) é atribuído quando confirmada a presença da marca deixada pelo pino inoculador e/ou da marca deixada pela gota do inóculo no ágar, mas nenhum crescimento for observado.
0,5	A pouca quantidade de crescimento observada indica a provável presença de traços de nutrientes no meio de cultura ou no inóculo ou concentração baixa do inibidor. Este é um resultado considerado negativo. Em testes confiáveis, o crescimento no YNB sem fonte de carbono (controle negativo) deve resultar numa leitura de no máximo 0,5.
1	Um crescimento fraco, porém maior que o esperado para um crescimento de fundo. É interpretado como um resultado dúbio, fraco ou negativo nas chaves taxonômicas que não consideram respostas fracas para testes com fonte de nutrientes. Resultado positivo para teste com inibidores, a concentração testada é insuficiente para inibir um pequeno crescimento da cultura.
1,5	Um crescimento fraco a ser considerado dúbio positivo nas chaves taxonômicas que não consideram respostas fracas. Resultado positivo para teste com inibidores.
2	Crescimento semelhante à resposta + 3 sendo um pouco menor ou menos denso, porém claramente uma resposta positiva.
3	Crescimento denso no ponto de inoculação típico das culturas padrão que normalmente crescem bem no meio. Por exemplo, culturas tipo ou autênticas de <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. krusei</i> ou <i>Pichia anomala</i> crescem desta forma em YNB com 0,5% de glicose.
4	Crescimento notadamente maior do que em 3.
S	Colônias puntiformes ou pequenas pontos de crescimento forte aparecem dentro da marca de inoculação. Este deve ser considerado um resultado negativo que ocorre, provavelmente, devido à presença no inóculo de uma pequena população contaminante.

Outro resultado falso positivo pode ocorrer quando uma colônia cresce como resultado da liberação de nutrientes por outra colônia na placa. É necessário observar cuidadosamente as colônias que crescem próximas às colônias que apresentam crescimento fortemente positivo para verificar se há um crescimento muito mais forte nas porções da colônia mais próximas daquela que pode estar liberando nutrientes. Isto vale especialmente para placas contendo fontes de carbono do tipo di, tri ou polissacarídeos. Este é um problema comum

para os testes com sacarose e rafinose devido à produção e liberação de invertase no meio por algumas leveduras.

A interpretação das leituras realizadas é feita de acordo com a tabela 6, onde leituras claramente positivas são aqueles que recebem pontuação igual ou maior que 1 para testes com inibidores e igual ou maior que 2 para testes com fonte de nutriente. Leituras negativas são as que recebem pontuação menor que 1. Para as características importantes na identificação de uma cultura (e não para características que podem ser variáveis na descrição da espécie), leituras intermediárias entre 1 e 1,5 devem ser confirmadas pelo cultivo em tubo contendo meio líquido com o nutriente, uma vez que os métodos padrões são tradicionalmente feitos desta forma. Os resultados para cada teste, de acordo com as leituras obtidas, estão descritos na tabela 7, e são baseados na Escala de Wickerham (WICKERHAM, 1951).

Tabela 7: Pontuação atribuída ao crescimento, validade do teste e respectivo resultado para utilização em chaves taxonômicas de leveduras de cada pontuação e tipo de teste.

Tipo de teste		Pontuação atribuída ao crescimento								
		ND	0	0,1	0,5	1	1,5	2	3	4
fontes de nutrientes	validade	inválido ou não efetuado	válido	válido	válido	dúbio	dúbio	válido	válido	válido
	resultado	repetir	-	-	- ou w	repetir	repetir	+	+	+
inibidores	validade	inválido ou não efetuado	válido	válido	válido	válido	válido	válido	válido	válido
	resultado	repetir	-	-	-	w	w	+	+	+

w – crescimento fraco (*weak*) utilizado em algumas chaves taxonômicas.

3.5.10. Leitura dos testes realizados em tubos

Os testes realizados em meio líquido foram interpretados utilizando a Escala de Wickerham (WICKERHAM, 1951; YARROW, 1998). A temperatura e o tempo de incubação foram realizados conforme descrito em cada teste. A escala de Wickerham consiste em uma pontuação atribuída a turbidez do meio líquido, medida pela capacidade do observador de visualizar em um cartão de papel branco 3 linhas de 0,75 mm de largura (aproximadamente o traço feito com uma caneta comum), distribuídas em intervalos de 5 mm. A leitura, de acordo com o descrito na tabela 8, é realizada colocando-se o tubo à frente do papel um cartão e perpendicularmente a estas linhas. O resultado é interpretado como na tabela 7.

Tabela 8: Escala de Wickerham (WICKERHAM, 1951) para crescimento em meio líquido.

Pontuação	Crescimento observado da inoculação
0	Nenhuma turbidez observada
w (0,5)	Nota-se alguma turbidez, mas as linhas podem ser vistas com nitidez
1	As linhas podem ser visualizadas, mas suas margens não são nítidas.
2	As linhas aparecem como bandas difusas
3	As linhas não podem ser observadas ou não se pode distingui-las

3.6. Identificação de Atividade Micocinogênica

A atividade micocinogênica dos isolados foi avaliada em testes contra uma cultura (IMUFRJ 50083 de *Candida glabrata*) sensível à toxinas (micocinas). A cultura sensível foi crescida em caldo GYP por 3 dias e, com um *swab*, aplicada em três sentidos sobre a superfície de uma placa de Petri de 15 cm com o meio YM com tampão citrato 0,05 M pH 4,2 e azul de metileno 0,0028 % (STUMM et al., 1997). As culturas dos isolados foram crescidas em caldo de fermentação e transferidas para as placas com o carimbo inoculador de 96 pinos. A transferência das culturas para a placa foi realizada em até 30 min após a inoculação da cultura sensível. As placas foram incubadas por 3-4 dias.

3.7. Assimilação de Ácidos Orgânicos pelos Isolados

A capacidade de utilizar ácidos orgânicos como fonte de carbono foi avaliada por testes em placa réplica em experimento conjunto aos testes de caracterização do perfil fisiológico das culturas. Foram testados os ácidos málico, oxálico e acético nas concentrações de 0,2 e 0,5 %. Uma solução a 10 % de cada ácido orgânico foi preparada anteriormente. As soluções de ácido málico e acético tiveram o pH ajustado para 5,5, enquanto que a de ácido oxálico permaneceu em seu pH original, sendo este, ajustado após a adição ao meio de cultura. Os meios para o testes foram preparados conforme descrito no item 3.10.3, página 49. Para cada teste foi adicionado um volume dessas soluções para a concentração final de 0,2 ou de 0,5 % do ácido orgânico. A assimilação de ácido orgânico pelos isolados foi avaliada conforme os demais testes de assimilação de fontes de carbono.

3.8. Caracterização Molecular das Culturas

A caracterização molecular das culturas de leveduras foi realizada por estudo da região D1-D2 do gene codificador da sub-unidade maior do ribossoma (LSU), das regiões espaçadoras intergênica (ITS1 e ITS2) e do gene codificador da sub-unidade ribossomal 5.8 S (Figura 4). Foram realizados algumas adaptações, experimentos e testes das metodologias

comumente utilizadas na caracterização molecular de leveduras com a finalidade de adaptar as técnicas às condições do laboratório e otimizar a caracterização molecular.

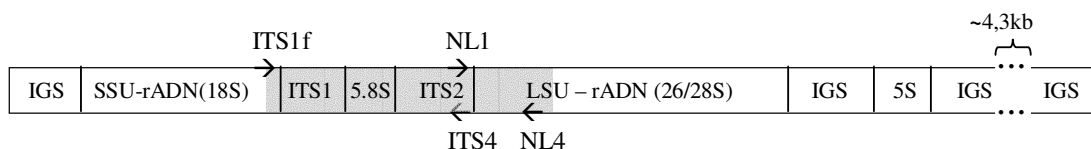


Figura 5: Esquema representativo da posição dos genes ribossomais e das regiões utilizadas na caracterização molecular de leveduras (em cinza), com os locais de anelamento dos iniciadores NL1, NL4, ITS1f e ITS4.

3.8.1. Extração de ácidos nucléicos (ADN)

Os ácidos nucléicos das culturas foram extraídos de acordo com o protocolo do sistema MasterPure Yeast DNA Purification da Epicentre Biotechnologies. Foi realizado um experimento de alteração do volume da solução de lise fornecida. Além do volume de 300 μL indicado no protocolo do fabricante, foram testados os volumes de 250 e 200 μL e a complementação ou não destes volumes com água até o volume final de 300 μL para a etapa de lise celular. O material extraído pelas diferentes condições foi submetido à amplificação, conforme descrito no próximo item, para avaliar sua qualidade. De acordo com o teste de variação do volume da solução de lise e com o manual fornecido, a extração dos ácidos nucléicos foi realizada conforme descrito a seguir. Esta extração está descrita em forma de protocolo de laboratório nos anexos, pág. .

As culturas foram estriadas em placa de meio YM e incubadas por um período de 3 a 4 dias. Uma colônia foi coletada com agulha e ressuspensa em 100 μL de água esterilizada em míni tubo plástico de 0,6 mL. À suspensão de células, foi adicionado 200 μL da solução de lise celular, agitada por 10 s e incubada a 65°C por 15 min. Após a lise o tubo foi colocado em gelo por 5 min. Após o resfriamento da amostra, foi adicionado no tubo 150 μL da solução de precipitação de proteínas. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi coletado cuidadosamente com micropipeta e transferido para um micro tubo plástico de 1,5 mL. Ao sobrenadante foi adicionado 0,5 mL de isopropanol, a mistura foi agitada por inversão do tubo e centrifugada a 10000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado cuidadosamente com 0,5 mL de etanol 70% através de expulsão e retomada do líquido com micropipeta. Ao final o líquido de lavagem foi descartado e o tubo centrifugado rapidamente para a retirada do etanol restante. Os ácidos nucléicos extraídos foram ressuspensos em 35 μL de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7,5) e mantidos a -20 °C. A extração foi checada por eletroforese em gel de agarose de 0,8 % (p/v) em TAE 0,5X (2 mM tampão Tris-acetato, 0,5 mM EDTA, pH 8,0) aplicando 5 μL do material extraído da amostra, e sob uma voltagem de 5V.cm⁻¹ por 1 hora. Para acompanhamento da eletroforese foi aplicado, em paralelo às amostras, 5 μL do marcador de peso molecular 1kB (Invitrogen). Os géis foram corados com uma solução de brometo de etídeo e o material extraído visualizado com iluminação ultra-violeta.

A presença de ácidos nucléicos contaminantes foi checada pela realização de uma reação de extração sem a colocação de células. A extração foi checada em gel, e submetida à reação de amplificação, como descrito anteriormente para as demais amostras.

3.8.2. Amplificação de fragmentos da região estudada

As regiões gênicas estudadas foram simetricamente amplificadas com as seqüências iniciadoras NL1 e NL4 para a região D1-D2 (O'DONNELL, 1993 *apud* KURTZMAN e ROBNETT, 1998), IT1f (GARDES e BRUNS, 1993) e ITS4 (WHITE et al., 1990 *apud* GARDES e BRUNS, 1993) para a região intergênica e ITS1f e NL4 para todo o fragmento. Na figura 5 estão os locais de posicionamento e na tabela 9 as características de cada seqüência iniciadora. Os protocolos de amplificação que serviram de ponto de partida para os estudos nesta tese foram os de Boekhout et al. (1995) e Kurtzman e Robnett (1998, 2003). Nestes trabalhos o ciclo de amplificação utilizado foi uma etapa inicial de 94 °C por 5 min, seguidos de 36 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 52 °C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min, e uma etapa final de extensão de 72° C por 10 min.

Tabela 9: Características das seqüências iniciadoras utilizadas neste estudo.

Nome	Seqüência (5' - 3')	n° bases	Tm °C
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	24	59,3
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	19	56,1
ITS1f	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	22	56,5
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	56,4

Foram realizados experimentos de otimização da amplificação com NL1 e NL4, sendo que inicialmente foi testado o número de ciclos da reação. Um experimento utilizando o material extraído de dois isolados de leveduras foi amplificado utilizando 25, 30 e 35 ciclos de amplificação enquanto as demais condições foram iguais. O resultado das reações com os diferentes números de ciclos de amplificação foi visualizado em gel de agarose 1%, conforme descrito anteriormente. A temperatura de anelamento da reação também foi testada em experimento utilizando termociclador com gradiente de temperatura Thermo Hybaid PCR Express. A não ser nos experimentos de variação da temperatura de anelamento as demais reações de amplificação desta tese foram realizadas em termociclador ABI/PE 9700. Neste experimento as temperaturas de anelamento variaram de 52 a 57,9 °C, de acordo com a possibilidade do equipamento. As demais condições da reação e do ciclo se mantiveram as mesmas para todos os tratamentos.

A partir dos resultados obtidos nos testes de otimização da reação de amplificação, foi estabelecido o protocolo para as amplificações simétricas realizadas com os isolados obtidos nesta tese: uma etapa inicial de 94 °C por 5 min e 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s; anelamento por 30 s, sendo que a 57 °C para NL1-NL4 e 55°C para ITS1f-NL4 e ITS1f-ITS4; e uma etapa de extensão a 73 °C por 1 min para a região D1-D2 e ITS1f-ITS4 e 1,5 min para todo o fragmento. Os resultados das amplificações foram checados em gel de agarose 1 % conforme descrito anteriormente.

Os fragmentos amplificados foram purificados, para eliminação dos iniciadores e enzima utilizados na amplificação, com o sistema de purificação de resina de ligação e filtração em coluna, Ilustra GFX PCR DNA & Gel Band da G&E Healthcare, de acordo com as instruções do fabricante. O produto amplificado foi misturado a 500 µL da solução de ligação e aplicado em uma coluna fornecida pelo sistema de purificação, montada sobre um micro tubo e centrifugado a 10000 rpm por 1 minuto. O eluído foi descartado e 500 µL da solução de lavagem foram aplicados sobre a coluna. Foi realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições da anterior. A coluna foi então repassada para um novo míni tubo e adicionado 30 µL do tampão para sequenciamento fornecido pelo sistema de purificação. As amostras foram incubadas por 5 min a temperatura ambiente e centrifugadas a 13000g por 2 min. O material eluído foi mantido a -20 °C.

3.8.3. Quantificação e determinação do tamanho do fragmento amplificado

Após a purificação, 2 µL do material amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,75 % em TAE 0,5X, sob voltagem de 5 V . cm⁻¹ por 2 horas. Um marcador de peso molecular (100 pb DNA Lader Invitrogen) para a determinação do tamanho do fragmento amplificado e um de quantificação (Low Mass, Invitrogen) foram aplicados em paralelo às amostras. A quantificação do material amplificado foi realizada por comparação de intensidade das bandas formadas de acordo com as instruções do fabricante do marcador. O tamanho da região ITS+D1D2 foi determinado utilizando a ferramenta de análise de géis de uma dimensão (1D) do programa LabWorks UVP.

3.8.4. Reação de sequenciamento

As amostras quantificadas foram submetidas à reação de sequenciamento com sistema DYEnamic ET, de acordo com as instruções do fabricante, e a eletroforese e leitura dos fragmentos foram realizadas em um sequenciador automático capilar MegaBACE 1000. Para a região D1D2 foram utilizadas as seqüências iniciadoras NL1 e NL4 e para a região intergênica foram utilizados os iniciadores IT1f e ITS4. Os eletroferogramas gerados foram analisados utilizando os programas Phred, Phrap e Consed (EWING et al., 1998; EWING e GREEN, 1998; GORDON et al., 1998) para montar as seqüências e gerar os *contig*⁷ e as seqüências consenso. Para as seqüências que se procurou obter toda a extensão do fragmento amplificado, mas que não foi possível montar as regiões ITS e D1D2 foram adicionados 100 bases N entre as duas regiões.

3.8.5. Análise das seqüências

A partir das seqüências consenso a região dos iniciadores foi retirada e as seqüências resultantes foram checadas quanto à presença de artefatos de amplificação com os programas Mallard (ASHELFOR et al., 2006) e Bellerophon (HUBER et al., 2004). As seqüências isentas de artefatos, para as regiões ITS e D1D2, foram comparadas com seqüências depositadas em base de dados públicas utilizando a ferramenta Fasta3 na página do Instituto Europeu de Bioinformática (EMBL-EBI) em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/nucleotide.html>. As seqüências então foram alinhadas por alinhamento múltiplo em uma base de dados atualizada (PRUESSE et al., 2007).

Para este tese foi montada uma base dados constituída de uma base principal contendo todas as seqüências curadas do gene LSU rRNA maiores do que 1300 bases presentes no último lançamento das bases de dados do projeto SILVA versão 96 em <http://www.arb-silva.de/> (PRUESSE et al., 2007). A esta base principal foram adicionadas 3.128 sequencias de estirpes tipo (*typo*) de espécies de fungos e cerca de 1000 seqüências mais próximas às seqüências obtidas dos isolados ao comparar com as seqüências de bases de dados curadas, independente do tamanho da seqüência. Ao final, a base de dados onde foram alinhadas as seqüências das leveduras continha mais de 18.000 seqüências curadas do gene correspondente a maior sub-unidade ribossômica (LSU-26S).

Após o alinhamento as seqüências foram filogeneticamente alocadas na base de dados. O alinhamento e a análise filogenética foram efetuados utilizando o pacote de programas ARB (LUDWIG et al., 2004). O modelo de reconstrução filogenética utilizado foi de Máxima Parsimonia. A topologia da árvore foi resultante da análise com valor de bootstrap (CAMIN e

⁷ *Contig* – o termo foi criado para determinar a série de leituras dos fragmentos gerados pela reação de sequenciamento relacionados um ao outro, assumindo a sobreposição da seqüência dos fragmentos, e gerando uma seqüência de bases. Um *contig* possui pelo menos uma leitura e é formado por todas as leituras dos fragmentos gerados. Portanto, o tamanho de um *contig* depende do número de leituras realizadas em diferentes posições de um molde.

SOKAL, 1965) em 100 réplicas (FELSENSTEIN, 1985). Após esta análise, as seqüências consenso foram depositadas no EMBL-Bank (Base de Dados de Seqüências Nucleotídicas do Laboratório Europeu de Biologia Molecular).

3.9. Identificação a partir dos Perfis Morfo-fisiológicos

Iniciou-se a identificação das culturas a partir da formação de grupos de acordo com o perfil apresentado. No início, todos os isolados pertenciam a um só grupo (levedura), e ao final ou estavam sozinhos (grupo com um só componente) ou pertencendo a grupos com mais de um componente. Estes grupos foram formados pelos perfis idênticos ou que se diferenciavam por até dois testes, que não os de assimilação de xilose, maltose, lactose, rafinose, mio-inositol e nitrato, o de reação ao DBB, o de fermentação da glicose e os de resistência a ciclohexamida. Os grupos foram separados de forma hierárquica, pois alguns testes têm mais importância ou peso do que outros nas decisões de agrupamento. Ainda, à medida que se avança na formação dos grupos alguns testes perdem a importância enquanto outros irão se tornar decisivos para a continuação da separação de novos grupos. Esta forma inicial de formação de grupos obedece ao descrito nas chaves taxonômicas para leveduras, porém o objetivo não é chegar à identificação final das culturas. Após este primeiro agrupamento seguiu-se uma etapa de checagem de cada indivíduo do grupo formado com a descrição das espécies que podem se encaixar no perfil fisiológico. Caso haja discrepância que impeça determinada cultura ser considerada uma das possíveis espécies para aquele perfil, a cultura é retirada e passa a constituir um novo grupo. Isto foi feito em rodadas até que se esgotaram as possibilidades de formação de novos grupos.

Após a formação dos grupos os perfis fisiológicos somados aos dados de morfologia da colônia e da célula foram utilizados na identificação dos gêneros por chaves taxonômicas e por comparação do perfil das espécies de leveduras conhecidas, em especial aos perfis das culturas tipo descritas para cada espécie em Barnett et al. (1990), KURTZMAN e FELL (1998) e na base de dados disponível na página do Central Bureau Von Schimmelkulture - CBS (em <http://www.cbs.knaw.nl/yeast>). Quando necessário, as identificações das culturas foram confirmadas com os dados moleculares de similaridade das seqüências das regiões D1D2 e ITS.

3.10. Desenvolvimento de Método para Isolamento de Leveduras

3.10.1. Resistência das leveduras ao NaCl

Para avaliar a resistência das leveduras a presença de NaCl no meio de cultura, foram testadas 302 culturas pertencentes ao Laboratório de Taxonomia de Leveduras do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade do Rio de Janeiro (IMUFRJ), sendo que destas 37 são leveduriformes (yeast-like) e 265 culturas de leveduras distribuídas em 65 espécies e 27 gêneros. Das 302 culturas, 217 foram recentemente isoladas de área de restinga, sendo em sua maioria basideomicetos, e as demais 85 pertencem à coleção sendo predominantemente ascomicetos. As culturas foram previamente crescidas em placas. Após 48-72 h, o crescimento foi transferido com alça para 1 mL de água estéril em tubo de ensaio e as células ressuspensas por agitação. As culturas foram passadas para as placas de teste através da utilização do multi-inoculador de 32 pinos, pelo método de inoculação de placas réplicas. Foram testadas as concentrações de 0 (controle), 3, 4, 5, 6, 8, 10 e 15 % de NaCl adicionado ao meio GYP. As placas foram incubadas e a formação da colônia de cada cultura foi acompanhada por até 10 dias. Ao crescimento observado foi atribuída uma pontuação e o resultado interpretado conforme descrito no item 3.5.9, página 41 (Tabela 6 e Tabela 7).

3.10.2. Inibição do crescimento de fungos filamentosos em isolamento de leveduras

Os experimentos de inibição de fungos filamentosos foram realizados em série, onde, o resultado do anterior orientava o desenho do próximo experimento. Foram testadas concentrações de NaCl até 6 %, utilização de corantes nos meios de plaqueamento, métodos de extração das células e filtragem da extração. Todos os experimentos desta série foram realizados com amostras de solo de canteiro de hortaliças do SIPA. A extração das células foi realizada como descrito em cada experimento abaixo, e o inóculo foi espalhado com alça de Drigalski por toda a superfície da placa a fim de se obter um crescimento homogêneo. Os experimentos foram realizados em placas de Petri de 10 cm de diâmetro em estufa de crescimento e com o desenho experimental inteiramente casualizado. Sempre que necessário e como indicado em cada caso, os dados foram transformados para atender ao pressuposto de distribuição Normal e posteriormente realizada a Análise de Variância dos dados.

a) Utilizando diferentes concentrações de NaCl

Nos quatro primeiros experimentos desta série, 10 g de solo foram ressuspensas em um volume final de 100 mL de água estéril. Esta mistura foi agitada por 30 min a 75 rpm e então, deixada em repouso por 1 min, para decantar as partículas maiores. A suspensão, considerada a diluição 10^{-1} , foi diluída sucessivamente. Foi utilizado para inoculação em cada placa um volume de 0,1 mL de forma que se obtinha para cada placa o referente a 10 mg de solo (peso úmido) para a diluição de 10^{-1} , 1 mg para a diluição 10^{-2} e 0,1 mg para a 10^{-3} . Os diferentes tratamentos foram espalhados em placa com 3 repetições em meio BIL-agar, com cloranfenicol ($400\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e amoxicilina ($500\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). A suspensão de solo foi diluída sucessivamente até 10^{-3} e as três diluições foram inoculadas em placas de Petri com meio de cultura BIL-agar nas concentrações de 0, 3, 4, 5 e 6 % de NaCl, de acordo com o obtido no teste de resistência das leveduras ao sal. Os diferentes tratamentos foram incubados por 72 h. As colônias de fungos filamentosos e de leveduras que cresceram no meio foram contadas separadamente. A contagem de unidades formadoras de colônias por grama de massa fresca ($\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1} \text{mf}$) de fungos filamentosos, de $\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1} \text{mf}$ de leveduras e a relação entre estes dois parâmetros foram utilizadas para avaliar o efeito das diferentes concentrações de NaCl sobre o crescimento micelial.

b) Utilizando NaCl e filtragem

Neste experimento, foi avaliado a utilização da filtragem da extração de células em filtro de papel comum (filtro de café) e a adição de NaCl nas concentrações de 0, 3 e 6 % no meio de cultura BIL-agar. Foram testados também os períodos de incubação de 72 e de 120 h após a inoculação. Com exceção do 1º experimento, onde a variável foi UFC de fungos filamentosos e leveduras, as fotografias das placas foram feitas especialmente para se determinar a porcentagem de ocupação da superfície pelas colônias de fungos filamentosos. As placas foram fotografadas individualmente utilizando a maior definição de uma câmera de 3,2 megapixels. As fotos, posteriormente, foram analisadas no programa de análise de imagem LabWorks 4.6 Acquisition & Analysis Program da UVP (UltraViolet Products®). Neste programa foi utilizada uma ferramenta para determinar a área das colônias de fungos filamentosos e a área total da placa de Petri. O percentual de ocupação da superfície da placa foi determinado por uma razão entre estes dois valores. Os dados de inibição do crescimento de fungos foram analisados após transformação da porcentagem de ocupação da placa para $\log(n)$ e aplicado o teste de médias de Tukey.

c) Utilizando NaCl, filtragem e dois períodos de incubação

Foi realizado um terceiro experimento aonde além do NaCl, foi utilizado a filtragem da suspensão em papel de filtro comum e em peneira granulométrica com poro de 34nm. Com base nos dados do experimento anterior foram utilizadas as diluições 10^{-1} para a inoculação e as concentrações de 0, 3 e 6 % de NaCl no meio de cultura BIL-agar. A extração de células foi preparada conforme anteriormente descrito e filtrada em papel de filtro comum. Após a filtragem a suspensão foi inoculada por espalhamento nas placas, incubadas e fotografadas após 72 h. O crescimento das colônias foi mensurado e os dados analisados conforme o experimento anterior.

d) Utilizando NaCl e corantes

A utilização de corantes conjuntamente com diferentes concentrações de NaCl na formulação do meio de extração foi avaliada em um 4º experimento. Foi utilizado o meio BIL-agar sem corante e com duas formulações de corantes distintas (GARCIA, 2007): 1) verde de bromocresol 0,02 % (BIL-vbc); e 2) eosina 0,04 % e azul de metileno 0,0065 % (BIL-em). As concentrações de NaCl utilizadas no meio foram 0, 1, 2, 3 e 6 %. Como meios padrões nos estudos de fungos que possuem corantes em sua formulação, foram ainda inoculadas placas com o meio de enumeração de fungos de Martin (1950) e o meio para enumeração de fungos em alimentos DRBC (KING et al., 1979) (Dicloran-RosaBengala-Cloranfenicol). Nestes dois meios foram adicionados cloranfenicol (400 mg.mL^{-1}) e amoxicilina (500 mg.mL^{-1}), na mesma concentração utilizada no meio BIL-agar. A solução de extração foi preparada conforme descrito anteriormente, filtrada em papel comum e inoculada em triplicata. As placas foram incubadas por 72 h e fotografadas. O crescimento das colônias foi mensurado e os dados analisados conforme anteriormente descrito.

3.10.3. Teste de meios para isolamento de leveduras

Para a extração das células 50 g de terra foram ressuspensas em um volume final de 500 mL da solução de dissociação (Tween 80 0,1 % em salina fisiológica) com 50 g de esferas de vidro de 2-3 mm de diâmetro. Esta mistura foi agitada vigorosamente por cinco min e depois por 30 min a 75 rpm e então, deixada em repouso por cinco min, para decantar as partículas minerais maiores.

A suspensão foi inoculada nos diferentes meios líquidos e a todos os meios foi adicionado os antibióticos cloranfenicol ($400 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e amoxicilina ($500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) para evitar o crescimento bacteriano. A composição do meio base de isolamento de leveduras (BIL) é 0,5 % de glicose, 0,05 % de extrato de levedura, 0,1 % de sulfato de amônia, 0,2 % de fosfato de sódio, 0,04 % cloreto de potássio e 0,01 % sulfato de magnésio. Este meio base foi utilizado na composição de diversos meios sólidos (Tabela 10) e em todos os meios de enriquecimento (Tabela 11) utilizados nos testes de meios para isolamento de leveduras de solo. Os meios de enriquecimento foram preparados em concentrações diferentes para que ao final da inoculação todos possuíssem a mesma concentração de nutrientes, uma vez que o volume dos inóculos variou de acordo com o tratamento realizado. Na tabela 11, estão descritas as siglas de identificação dos meios de enriquecimento utilizados, indicando os volumes em mL de H_2O , do caldo BIL sem glicose, etanol e das soluções de sais, ácidos orgânicos e açúcares utilizada para a preparação de cada meio, além da quantidade de solo em gramas, quando utilizado. Os tratamentos sob agitação foram preparados em frascos (Erlenmeyer) de 50 ml e os sem agitação em tubos de ensaio de 3x20 cm.

A suspensão (10^{-1}) e uma diluição em 10 vezes (10^{-2}) desta suspensão foram utilizadas na inoculação dos meios sólidos. Nestas inoculações foi utilizado um volume de 0,1 mL de forma que se obtinha para cada placa o referente a 10 mg de solo para a diluição de 10^{-1} e 1

mg para a diluição 10^{-2} . Os diferentes tratamentos foram plaqueados com 4 repetições. O inóculo foi espalhado com alça de Drigalski. Os experimentos foram realizados em placas de Petri de 10 cm de diâmetro em estufa de crescimento a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 dias. As colônias de leveduras (UFC . g^{-1}mf) foram contadas no 3^o, 5^o e 7^o dia após a inoculação, foi observado também a incidência do crescimento de fungos filamentosos nas placas.

Nos enriquecimentos o volume de inóculo variou entre 1, 5 ou 10 mL de acordo com o tratamento como descrito na tabela 11. Após a inoculação os frascos foram mantidos sob agitação a 120 rpm, enquanto que os tubos permaneceram sem agitação em estantes. Os fungos filamentosos que cresceram na superfície do meio líquido nos tubos estáticos foram retirados com alça ou pinça, para evitar grande proliferação destes organismos. Ao 7^o, 14^o e 28^o dia de incubação cada cultivo em tubo foi estriado em placa nos meios BIL e BIL-em. E o enriquecimento em frascos sob agitação foram estriado por esgotamento em meio GYP-agar, ao quarto dia de incubação. Após o estriamento em meio sólido as placas foram incubadas por cinco dias.

Os tipos de colônias de leveduras que se desenvolveram no espalhamento em placa direto e nas placas após o estriamento dos enriquecimentos foram classificados de acordo com suas características de morfologia e cor das colônias. Esta classificação foi realizada com o auxílio de um microscópio estereoscópico utilizando os aumentos de 10 a 16X. Alguns representantes de cada tipo de colônia observado, tanto do plaqueamento quanto do enriquecimento foram isolados e estocados em tubos com 2,5 mL de meio GYMP inclinado, incubados por cinco a sete dias e o crescimento celular coberto com uma camada de óleo mineral.

Tabela 10: Composição e sigla dos meios sólidos utilizados nos testes de isolamento de levedura de solo.

Sigla	composição dos meios sólidos (todos com 2% de agar)
BIL	Base de isolamento com 0,5% de glicose e 0,05% de extrato de levedura (BIL)
BIL-s	BIL com 4% de NaCl e filtração da extração antes do plaqueamento
BIL-em	BIL com 0,04% de eosina e 0,0065% de azul de metileno
BIL-bz	BIL com 0,1% de ácido benzóico
BIL-cpr	BIL com 0,2% de propionato e 100 ppm de cobre na forma de sulfato de cobre
BIL-pr	BIL com 0,2% de propionate
BIL-ac	BIL com 0,5% de acetato
BIL-fr	BIL com 0,5% de formato
BIL-lc	BIL com 0,5% de lactato
BIL-ox	BIL com 0,5% de oxalato
BIL-ml	BIL com 0,5% de malato
BIL-ct	BIL com 0,5% de citrato
YNB	base nitrogenada de cultivo de leveduras (YNB) com 0,5% de glicose
YM	0,3% de extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 0,5% de peptona e 1% de glicose (YM)
YM-s	YM com 4% de NaCl
GPA	2% de glicose, 0,3 extrato de levedura, 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,02% de K_2HPO_4 , 0,01% de KH_2PO_4 , 0,02% MgSO_4 , 0,02%, de NaCl, 0,01% de K_2SO_4 (GPA)
GPA-s	GPA com 4% de NaCl
W	meioWort Difco s/ dextrina (W)
W-s	W com 4% de NaCl

Tabela 11: Composição e sigla de identificação dos meios de enriquecimento utilizados nos teste de isolamento de leveduras, o BIL foi utilizado como base para a composição dos meios. Volume de inóculo da extração aplicado a cada frasco e volume final do enriquecimento. NaOH 1M foi adicionado para correção do pH para 5,5.

Sigla de Identificação		BIL 4X	H ₂ O	etanol	glicose 10%	xilose 10%	lactose 5%	CuSO ₄ 5%	ác. benz. 5%	ács. orgs. *	NaCl 25%	NaOH 1M	terra (g)	inóculo	vol. final (ml)
G	tubo	2,5	5,5	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	10
GO	frasco	5	4	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	10	20
GOF	frasco	5	4	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	10	20
GE	tubo	2,5	3,9	0,6	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	10
XL	tubo	2,5	5	-	-	0,5	1	-	-	-	-	-	-	1	10
XLO	frasco	5	2	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	10	20
Bz	frasco	5	4,6	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	10	20
NaCl	frasco	5	0,8	-	1	-	-	-	-	-	3,2	-	-	10	20
XBZ	frasco	5	3,6	-	-	1	-	-	0,4	-	-	-	-	10	20
PR	tubo	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	10	20
LC	tubo	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	10	20
Cu ⁺⁺	frasco	5	4,3	-	1	-	-	0,15	-	-	-	0,5	-	10	20
AC	tubo	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	10	20
ML	tubo	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	10	20
CT	tubo	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	10	20
OX	tubo	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	10	20
FR	tubo	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	10	20
PRS	tubo	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	10	10	20
LCS	tubo	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	10	10	20
ACS	tubo	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	10	10	20
MLS	tubo	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	10	10	20
CTS	tubo	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	10	10	20
OXS	tubo	5	3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	10	10	20
FRS	tubo	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	10	10	20
PRO2	frasco	5	4,6	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	10	20
PRO5	frasco	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	10	20
LCO	frasco	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	10	20
ACO	frasco	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	10	20
MLO	frasco	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	10	20
CTO	frasco	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	10	20
OXO	frasco	5	3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	10	20
FRO	frasco	5	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	10	20
BILS	frasco	2,5	0,4	-	0,5	-	-	-	-	-	1,6	-	5	5	10
PROS	frasco	2,5	0,4	-	-	-	-	-	-	0,5	1,6	-	5	5	10
LCOS	frasco	2,5	0,4	-	-	-	-	-	-	0,5	1,6	-	5	5	10
ACOS	frasco	2,5	0,4	-	-	-	-	-	-	0,5	1,6	-	5	5	10
MLOS	frasco	2,5	0,4	-	-	-	-	-	-	0,5	1,6	-	5	5	10
CTOS	frasco	2,5	0,4	-	-	-	-	-	-	0,5	1,6	-	5	5	10
OXOS	frasco	2,5	-	-	-	-	-	-	-	0,5	1,6	0,4	5	5	10
FROS	frasco	2,5	0,4	-	-	-	-	-	-	0,5	1,6	-	5	5	10

• Uma solução para cada ácido orgânico adicionado de acordo com o meio. Soluções de ácidos orgânicos a 10%, com pH ajustado para 5,5: PR (propiónico), LC (lático), AC (acético), ML (málico), CT(cítrico) e FR (fórmico). OX (oxálico) teve o pH ajustado após esterilização. S-solo; E-etanol; Cu⁺⁺ sulfato de cobre; BZ-ác. Benzóico.

3.11. Desenvolvimento de Método de Triagem de Isolados de Leveduras

3.11.1. Meios diferenciais

A composição de cada meio utilizado e a característica da colônia a ser observada está descrita na tabela 12, para uma descrição mais detalhada ver o item Meios de Cultura no anexo (pág. 126). A triagem dos isolados foi desenvolvida a partir dos meios diferenciais para leveduras utilizados em Garcia (2007). Deste trabalho foram utilizados os meios BIL-em e BIL-vbc. As seguintes modificações foram realizadas nestes meios: com o objetivo de aumentar a diferenciação da morfologia das colônias, o meio BIL-em, além de sua composição original com extrato levedura a 0,5%, foram avaliadas as com concentrações de 0,1 e 0,05 %. E para diminuir a influência do crescimento de colônias vizinhas no meio de avaliação do pH, o meio BILvbc, foi adicionado tampão malato 0,5 % (ml) e testados dois níveis de pH 4,0 (BIL-vbml pH 4) e pH 5,5 (BIL-vbml pH5,5) (Tabela 12).

Tabela 12: Composição dos meios de cultura utilizados na triagem dos isolados de leveduras. Todos os meios com 2% de agar. Ver também nos anexos.

Meio de cultura	Característica verificada	Composição
BIL	pigmentos naturais	BIL (0,5% glicose, 0,5% extrato de levedura)
BILvbml pH5,5	acidificação	BIL + ácido málico 0,5%, verde de bromocresol 0,04% (pH5,5)
BILvbml pH4	neutralização	BILvbml (pH4)
CMA	morfologia da colônia	extrato de milho
DBB – urease	diferenciação entre asco e basideomicetos, presença de urease	YCB, uréia 2%, fucsina acida 0,002%
BILem	coloração das colônias pela composição de eosina e azul de metileno com diferentes concentrações da fonte de nitrogênio	BIL, eosina 0,04%, azul de metileno 0,065%, 0,5, 0,1 e 0,05 % de extrato de levedura
YM-m (micocina)	redução do azul de metileno	YM, ácido cítrico, azul de metileno (pH 4,3)
GYP 36 °C e 40 °C	crescimento a 36 e 40 °C	glucose 2%, extrato de levedura 0,5%, peptona 1%
GYP 10 e 15 %	crescimento com 10 e 15 % de NaCl	Mesmo que anterior com 10 e 15% de NaCl

Inicialmente foram realizados testes de triagem com os meio BIL, BILvbml pH4, BILvbml pH 5,5, BILem 0,5, 0,1 e 0,05 % de extrato de levedura, extrato de milho - CMA (YARROW, 1998), meio para o teste de reação ao azul de diazonium - DBB-urease (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1991) e crescimento a 36 °C em meio GYP. Os meios sólidos foram vertidos em placas de Petri de 15 cm de diâmetros. Um conjunto de culturas de leveduras, sendo 32 espécies pertencentes a 15 gêneros distintos, foi selecionado da coleção de cultura para avaliar a capacidade de diferenciação destas culturas pelo método de triagem.

As culturas foram inicialmente crescidas em meio sólido e repassadas para tubos de ensaio com 3 mL de caldo BIL para crescimento celular e incubadas por 3 dias.

As inoculações das culturas nos meios diferenciais foram realizadas pela técnica de placa réplica. Para esta inoculação foi utilizado um carimbo adaptado que permite a transferência de 96 culturas por vez para o meio de teste. Este carimbo (Figura 5) é uma adaptação utilizando as ponteiras de 10 µL, a parte interna e a tampa da caixa para estas ponteiras. A distribuição das ponteiras na caixa obedece à mesma orientação dos poços das micro placas de 96 poços. De forma que se pode fazer a transferência das 96 culturas de uma só vez para o meio de cultura em placa de 15 cm. Este multi-inoculador foi utilizado apenas na etapa de triagem das culturas. Para a inoculação, um volume ($\pm 100 \mu\text{L}$) do crescimento de cada cultura no tubo foi transferido para um poço da micro placa. Após a transferência de 96 culturas, a inoculação nos meios diferenciais foi realizada com um carimbo de 96 pinos (ponteiras). Após a inoculação as placas foram incubadas a $26\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotografadas ao 3º e 5º dia. As imagens foram trabalhadas e analisadas comparativamente. Foi assumido que qualquer variação observada, com relação à cor e morfologia da colônia seria considerado como diferença.

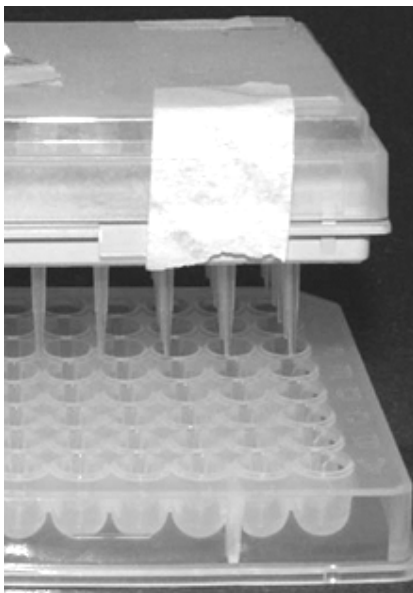


Figura 6: Carimbo inoculador adaptado de 96 pinos. A parte inferior onde ficam as suspensões das culturas é uma micro placa de 96 poços e a parte superior é formada utilizando-se 96 ponteiras de 10 uL em seu suporte e cobertas com tampa da caixa de ponteiras. A disposição das ponteiras na caixa possui o mesmo padrão de disposição dos poços da micro placa.

Após os dados obtidos nos primeiros testes com 36 culturas da coleção e com a etapa de validação optou-se por não mais utilizar o meio BIL-em com 0,1% de extrato de levedura e também ampliar os meios utilizados, adicionando aos testes já descritos, o crescimento a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ em meio GYP, resistência a 10 e 15 % de NaCl em meio GYP, e a coloração em meio com azul de metileno utilizado para avaliação da produção de micocinas (STUMM et al., 1977), ver tabela 12.

3.11.2. Morfologia das colônias e fermentação

Além dos testes nos meio diferenciais, como complementação as características fisiológicas obtidas nos meio de triagem, foram utilizadas as características morfológicas e a coloração das colônias, e a capacidade de fermentar a glicose. Quanto à morfologia de colônia foi observado se a borda era inteira, irregular ou filamentosa, se a superfície era lisa, rugosa, filamentosa ou raiada, se a forma era convexa, achatada, borda elevada, centro elevado e se a textura era butírica, filamentosa ou mucóide. A cor foi discriminada em quatro classes: branco/creme, rosa/laranja, marrom e preto. Com exceção da textura, que em alguns casos foi verificada ao toque com alça ou com agulha de inoculação, as demais características foram observadas diretamente ou com o auxílio de uma lupa estereoscópica com aumento de 10 a 16X ou, posteriormente, observando as fotografias. A avaliação da capacidade de fermentar a glicose foi realizada conforme descrito no item 3.5.5, página 39.

3.11.3. Teste de inóculo para a triagem

Para avaliar a influência do preparado do inóculo para a triagem, na morfologia e característica das colônias, foi realizado um experimento com 5 formas diferentes de preparo. Os inóculos foram preparados em tubos de 13 x 100 mm. Foram testados: a água, caldo GYP, meio base de fermentação com 2% de glicose, caldo BIL e meio de esgotamento (YNB com 0,1% de glicose). O volume utilizado foi de 2 ml para cada tratamento. Para este teste foram utilizados cinco culturas da coleção: J29-IMUFRJ (*Pichia membranifaciens*), 50656-IMUFRJ (*Sporopachidermia lactativora*), 51534-IMUFRJ (*Kodamea ohmeri*), 51629-IMUFRJ (*Candida valida*) e 51707-IMUFRJ (*Rhodotorula mucilaginosa*), e cinco isolados recentes 1081, 1082, 1126, 1147 e 1148. As culturas em meio GYP sólido foram passadas para os meios de inoculação. Após cinco dias de incubação, 0,1 mL do crescimento foi colocado no poço da micro placa e repassado com o multi-inoculador de 96 pinos para os meios de triagem. As características morfofisiológicas das colônias formadas foram observadas e anotadas, após 3 dias de crescimento, e as placas fotografadas.

3.11.4. Validação do método de triagem

Duas pequenas coleções, compostas de isolados de leveduras ainda não identificados, e obtidas de origem diferentes foram utilizadas para validar o método de triagem desenvolvido. Uma coleção era formada pelos 77 isolados obtidos da amostra de solo sob plantio de milho, obtidos nos testes de seleção de meios para isolamento de leveduras desta tese. E a outra por 39 isolados de amostra de sedimento e alga de outro projeto do laboratório. As culturas foram passadas diretamente dos tubos de estoque para tubos de teste de fermentação e incubados. O resultado foi observado do 2° ao 5°, ao 7°, 10° e 14° dia após a inoculação. O crescimento no meio de fermentação serviu como inóculo para os meios diferenciais. Um volume de 0,1 mL do crescimento foi passado para o poço na micro placa. Este volume foi utilizado como inóculo para todos os meios testados sendo repassado pelo carimbo de ponteiros para os meios sólidos vertidos em placas de Petri de 15 cm de diâmetro. As placas foram incubadas por 3 dias e após este período fotografadas. As características de cada isolado nos diferentes meios foram observadas de acordo com a metodologia estabelecida.

As culturas dessas duas coleções, de isolados de milho e de isolados de sedimento, foram identificadas por testes morfofisiológicos conforme descrito no item 3.5, pág. 38. Os resultados da triagem e desta identificação foram comparados para validar o método de triagem. A validação da metodologia de triagem foi realizada por comparação entre os grupos de isolados formados com os dados dos meios de triagem e com os grupos formados com dados dos testes de assimilação.

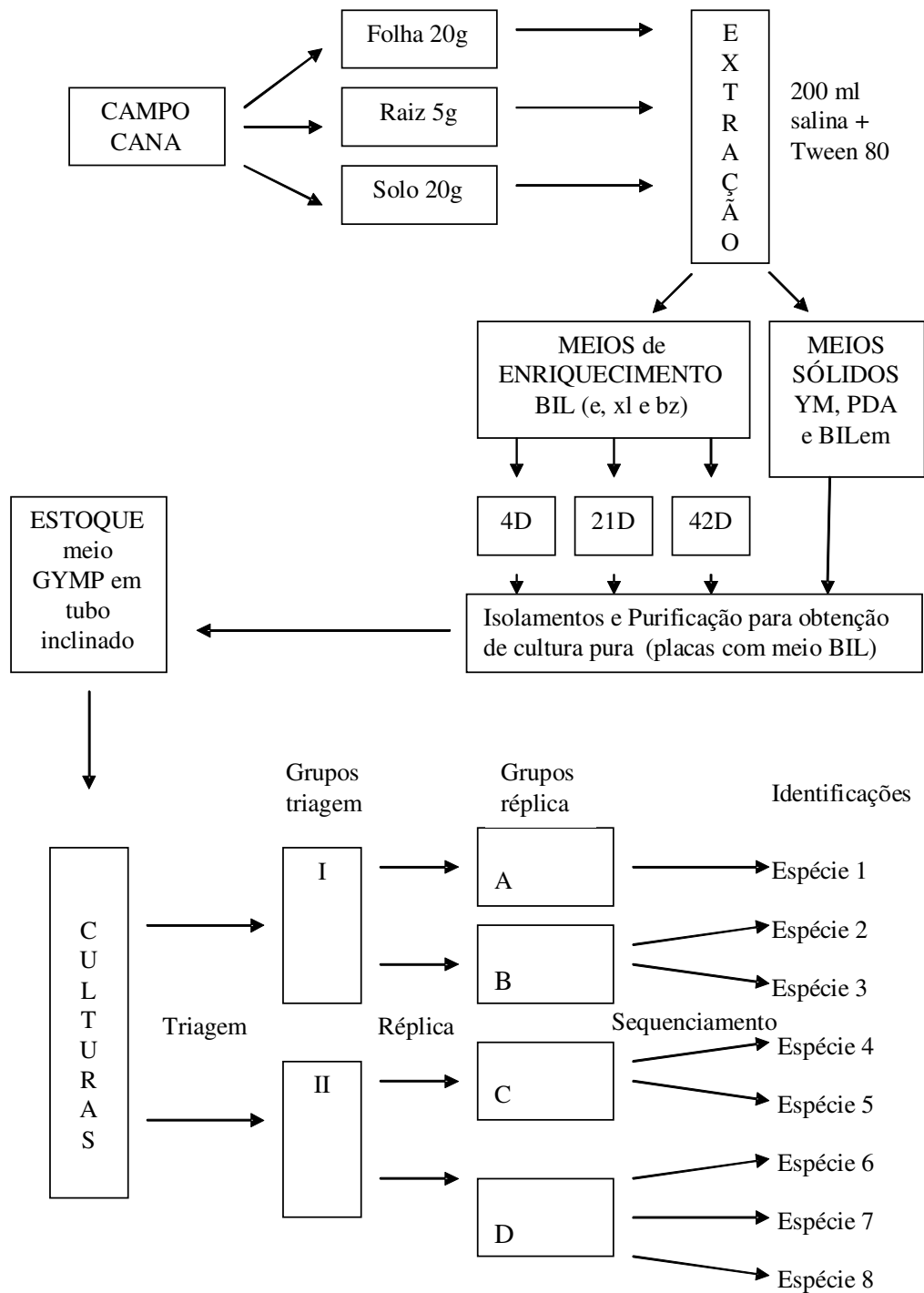


Figura 7: Fluxograma dos protocolos utilizado para o levantamento da diversidade de leveduras em cana-de-açúcar. 4D (4 dias), 21D (21 dias) e 42 D (42 dias).

4. RESULTADOS

4.1. Diversidade de Leveduras em Cana-de-Açúcar

A quantidade (UFC . g⁻¹mf) de leveduras e fungos filamentosos obtidas nos diferentes meios de culturas para as amostras de solo, raiz e folha de cana-de-açúcar está descrita na tabela 13. Para a raiz as contagens de leveduras por grama ficaram entre 8,9 . 10³ e 3,3 . 10⁴ para o período seco e 1,3 . 10⁵ e 4,9 . 10⁵ para o período chuvoso, enquanto para os fungos filamentosos a contagem ficou entre 4,6 . 10⁵ e 6,6 . 10⁵ para o período seco e 6,0 . 10⁴ e 1,7 . 10⁵ no período chuvoso. No solo as populações se mantiveram na mesma ordem de grandeza independente da época de coleta, no caso, 10³ para leveduras e 10⁴ para fungos filamentosos, com exceção do período chuvoso observado no meio BIL-em onde as contagens caíram em uma ordem de grandeza. Para as amostras de folha as contagens se mantiveram na ordem de 10⁴ UFC . g⁻¹mf para leveduras e fungos filamentosos no período seco e houve um aumento de uma ordem de grandeza para as leveduras no período chuvoso.

Tabela 13: Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC . g⁻¹mf) nos meio YM, PDA e BIL-em de fungos filamentosos e leveduras por grama das amostras de rizoplano, solo e filoplano de cana-de-açúcar.

Coleta meio	Compartimento amostral					
	rizoplano		solo		filoplano	
Set/07	fungo filam.	levedura	fungo filam.	levedura	fungo filam.	levedura
YM	4,9.10 ⁵	8,9.10 ³	5,7.10 ⁴	1,5.10 ³	5,7.10 ⁴	3,0.10 ⁴
PDA	6,6.10 ⁵	1,0.10 ⁴	5,0.10 ⁴	1,6.10 ³	5,7.10 ⁴	2,6.10 ⁴
BILem	4,6.10 ⁵	3,3.10 ⁴	2,3.10 ⁴	5,5.10 ³	2,0.10 ⁴	2,2.10 ⁴
Jan/08						
YM	1,7.10 ⁵	4,9.10 ⁵	4,9.10 ⁴	2,1.10 ³	1,6.10 ⁴	3,4.10 ⁵
PDA	1,5.10 ⁵	1,3.10 ⁵	4,5.10 ⁴	1,8.10 ³	1,2.10 ⁴	1,7.10 ⁵
BILem	6,0.10 ⁴	1,6.10 ⁵	5,2.10 ³	5,3.10 ²	4,5.10 ³	1,3.10 ⁵

Os valores são médias de 4 repetições.

Os tipos de colônias que se desenvolveram a partir dos isolamentos por meios de enriquecimentos após 4, 21 e 42 dias de incubação para as duas coletas estão contabilizados na tabela 14. De todos os plaqueamentos de enriquecimentos realizados, apenas em um, meio com xilose e lactose da amostra quatro de solo de janeiro de 2008, o crescimento de fungo filamentoso impediu a identificação das colônias de levedura formadas e seu posterior isolamento. Os tipos de colônias variaram de dois a 11 na primeira coleta e de dois a 10 na segunda coleta para os enriquecimentos com glicose-etanol (ge) e com xilose-lactose (xl). O enriquecimento com xilose-lactose possibilitou a maior variedade de tipos de colônias em diferentes tempos de cultivo e para as duas coletas. Neste enriquecimento foram observados para as amostras de terra entre cinco e nove tipos, na primeira coleta, e entre cinco e oito, na segunda, para as amostras de folha entre seis e onze, na primeira coleta, e entre cinco e dez tipos, na segunda, e para as amostras de raiz entre sete e nove tipos na primeira e entre quatro e dez na segunda coleta.

No enriquecimento glicose-etanol (BIL-e) a quantidade de tipos de colônias para as amostras de solo ficou entre 2 e 5 na primeira coleta e entre 2 e 6 na segunda. Em duas amostras de folha, na primeira coleta, nenhuma colônia se desenvolveu e para as outras duas amostras, 2 e 4 tipos foram identificados. Na segunda coleta, apenas 2 tipos puderam ser observados para todas as amostras. Nas amostras de raiz foram obtidos de 3 a 9 tipos de colônias, na primeira coleta, e de 2 a 7 na segunda coleta.

Nas retiradas dos enriquecimentos contendo ácido benzóico só pode ser observado crescimento na última, aos 42 dias, e resultaram os menores números de tipos totais de colônias para a maior parte das amostras (tabela 14). Na coleta de setembro, em uma amostra de raiz e em todas as de folha, não pode ser observado colônias para efetuar o isolamento. Após análise, ao microscópio, das colônias isoladas deste enriquecimento nenhuma se confirmou como sendo de levedura. Algumas eram bactérias baciliformes e a maioria actinomicetos. Na coleta de janeiro, novamente, as poucas colônias observadas possuíam o mesmo formato das colônias de actinomicetos ou bactéria da primeira coleta e não foram descartadas.

De um modo geral foi observado que o crescimento das hifas dos fungos filamentosos inicia-se com 2 ou 3 dias após a inoculação, período da contagem das colônias, e atinge um tamanho praticamente estável até quatro ou cinco dias, mesmo a temperaturas mais baixas ($\pm 8^\circ \text{C}$), quando provavelmente se esgotam os nutrientes disponíveis. Depois de sete dias, pouco ou nenhum crescimento das colônias filamentosas pôde ser observado, mesmo para as colônias pequenas. Alguns fungos, como os *Trichoderma* spp., promovem crescimentos miceliais posteriores que podem ocupar toda a placa, mesmo depois de duas semanas de aparente inatividade.

Com relação aos meios de enriquecimento, o crescimento de fungos filamentosos na superfície do meio foi observado com mais frequência e mais rapidamente, quatro dias, no meio BIL-xl. Porém, os isolamentos foram realizados sem grandes dificuldades a quantidade de colônias de leveduras era grande e, aparentemente, controlava o crescimento das hifas. Os fungos filamentosos mais frequentes nos enriquecimentos foram *Penicillium* spp. e um pouco menos *Trichoderma* spp. e um outro não identificado (hifa hialina sem esporos). No BIL-e este crescimento só foi observado mais tardiamente e a maioria não o apresentou. Os crescimentos em meios sólidos a partir deste meio contendo etanol apresentavam, quase que, exclusivamente colônias de leveduras.

Tabela 14: Resultado dos enriquecimento com glicose 5 % + etanol 6 % (ge), xilose 0,5 % + lactose 0,5 % (xl) e ácido benzóico 0,1 % (bz) das 4 repetições das amostras de solo (S), folha (F) e raiz (R), nos períodos de setembro de 2007 e janeiro de 2008. após 4, 28 e 42 dias, em quantidade de tipos de colônias encontrados nas placas de BIL e BILem.

Coleta incub. enriq.	Setembro de 2007						tipos totais	Janeiro de 2008						tipos totais
	4 dias		28 dias		42 dias			4 dias		28 dias		42 dias		
	BIL	BILem	BIL	BILem	BIL	BILem		BIL	BILem	BIL	BILem	BIL	BILem	
R1ge	1	1	2	2	2	1	4	2	3	2	2	2	2	6
R1xl	2	4	2	2	1	1	8	2	3	3	4	3	3	10
R1bz	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	0
R2ge	-	-	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	2
R2xl	2	3	2	2	2	2	7	1	2	4	3	3	2	9
R2bz	-	-	-	-	1	-	0	-	-	-	-	-	-	0
R3ge	1	1	1	1	1	1	3	1	2	2	2	1	2	7
R3xl	3	4	1	2	1	1	9	1	2	2	3	1	2	6
R3bz	-	-	-	-	2	-	2	-	-	-	-	-	-	0
R4ge	1	1	1	2	1	1	5	1	2	2	2	1	1	4
R4xl	2	5	2	2	1	1	8	1	1	1	3	1	2	4
R4bz	-	-	-	-	2	-	2	-	-	-	-	-	-	0
S1ge	-	-	2	2	1	1	5	1	1	1	1	1	1	2
S1xl	3	2	3	4	2	2	9	2	4	1	2	1	1	5
S1bz	-	-	-	-	5	-	5	-	-	-	-	-	-	0
S2ge	-	2	1	1	1	1	4	2	2	1	1	1	1	4
S2xl	1	1	2	2	1	2	4	2	1	2	2	1	1	7
S2bz	-	-	-	-	5	-	5	-	-	-	-	-	-	0
S3ge	-	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	6
S3xl	1	3	1	3	1	1	5	2	2	2	2	2	2	8
S3bz	-	-	-	-	5	-	5	-	-	-	-	-	-	0
S4ge	-	-	-	1	1	2	4	-	-	1	1	1	1	2
S4xl	3	2	2	1	2	2	9	ff	1	1	2	1	2	5
S4bz	-	-	-	-	6	-	6	-	-	-	-	-	-	0
F1ge	-	-	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2
F1xl	2	3	2	2	3	3	6	5	4	2	3	2	3	10
F1bz	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0
F2ge	-	-	-	-	-	-	0	1	1	1	1	1	1	2
F2xl	1	2	3	1	3	1	7	1	3	1	1	1	2	5
F2bz	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0
F3ge	-	-	-	-	-	-	0	1	1	1	1	1	1	2
F3xl	3	5	1	4	3	3	11	3	3	2	2	2	2	8
F3bz	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0
F4ge	-	-	-	-	2	2	4	1	1	1	1	1	1	2
F4xl	2	5	4	3	3	2	12	3	2	1	1	2	1	5
F4bz	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0

- não houve crescimento; ff – intenso crescimento de fungo filamentosos.

Os isolamentos foram efetuados para os tipos distintos de colônias que se desenvolviam nos meios sólidos e de enriquecimento, sendo que de um total de 1082 tentativas de isolamento realizadas foram obtidos 710 isolados de leveduras das amostras de raiz, folha e terra do cultivo de cana-de-açúcar. Os números de tentativas de isolamento e de isolados obtidos para cada amostra, em cada meio utilizado e para as duas épocas de coleta estão descritos na tabela 15. Apesar da utilização de dois antibióticos em concentrações relativamente altas, algumas poucas bactérias chegaram a ser isoladas dos meios de plaqueamento, principalmente em isolamentos tardios. Em todos os casos foram bacilos gram-positivos com colônias pequenas, mucóides e brilhantes.

Tabela 15: Número de tentativas de isolamento e isolamentos obtidos (valores entre parênteses) por amostra em cada meio de cultura; sub-totais por amostra e por meio utilizado; e totais por período de amostragem (setembro de 2007 e janeiro de 2008).

Meios*	Número de isolamentos obtidos (tentativas de isolamento)												total:
	compartimento amostral												
	raiz (R)***				solo (S)				folha (F)				
Set./07	R1	R2	R3	R4	S1	S2	S3	S4	F1	F2	F3	F4	Isol.
PDA	5(14)	9(19)	19(33)	15(31)	6(16)	7(10)	10(14)	6(18)	16(20)	3(18)	5(23)	16(16)	117(232)
YM	5(10)	12(19)	18(22)	8(19)	8(13)	13(15)	7(12)	9(17)	2(16)	1(20)	2(24)	13(20)	98(207)
BILem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enr BILe	8(8)	3(3)	4(6)	4(5)	6(4)	4(4)	2(4)	3(3)	2(2)	0(-)	0(-)	4(4)	40(43)
Enr BILxl	7(10)	10(11)	10(11)	8(9)	10(14)	4(4)	6(6)	10(10)	12(12)	9(12)	18(20)	12(19)	116(138)
Enr BILbz	0(1)	0(-)	0(2)	0(2)	0(5)	0(6)	0(5)	0(7)	0(-)	0(-)	0(-)	0(-)	0(28)
Total/coleta	25(43)	34(52)	51(74)	35(66)	30(52)	28(39)	25(41)	28(55)	32(50)	13(50)	25(67)	45(59)	371(648)
Jan./08	R1	R2	R3	R4	S1	S2	S3	S4	F1	F2	F3	F4	Isol.
PDA	21(25)	12(17)	10(17)	5(9)	5(8)	6(8)	4(10)	5(13)	10(12)	7(8)	20(21)	8(9)	113(157)
YM	17(21)	24(26)	13(16)	10(20)	5(8)	4(14)	3(6)	9(18)	9(15)	6(12)	23(26)	10(12)	133(194)
BILem	-	-	-	-	-	8(8)	9(9)	8(14)	-	-	-	-	25(31)
Enr BILe	7(7)	3(3)	2(3)	2(2)	1(1)	2(2)	3(3)	3(3)	1(1)	1(1)	3(3)	3(3)	31(32)
Enr BILxl	6(6)	3(4)	2(3)	5(5)	4(4)	3(3)	4(5)	3(3)	7(9)	5(5)	8(8)	3(4)	53(59)
Enr BILbz	0(-)	0(-)	0(-)	0(-)	0(-)	0(-)	0(-)	0(-)	0(-)	0(-)	0(-)	0(-)	0(0)
Total/coleta	51(59)	42(50)	27(39)	22(36)	15(21)	23(35)	23(33)	28(51)	27(37)	19(26)	54(58)	24(28)	355(473)

* - PDA-agar dextrose batata, YM-extrato de malte agar, BIL-base de isolamento de leveduras, em - agar com eosina e azul de metileno, Enr- enriquecimento, e - etanol 6 % e glucose 5 %, xl - xilose 0,5 % e lactose 0,5 %, bz - ácido benzóico 0,1 %. *** - R - raiz, S - solo, F - folha.

A distribuição das características fisiológicas entre os isolados obtidos nas duas coletas e para os três compartimentos está descrita na tabela 16. Os testes relativos às características de assimilação de fontes de carbono foi realizada em meio BIL (CARVALHO, 2007) e não pela metodologia estabelecida para estes testes (YARROW, 1998). Além disso,

as inoculações para este teste foram feitas com o carimbo de 96 pinos ao invés do carimbo estabelecido pela metodologia do laboratório (CARVALHO, 2007). Com este carimbo de 96 pinos as colônias formadas ficam mais próximas e com o tamanho menor quando comparadas com o carimbo de 36 pinos. Os fatores de variação não foram avaliados independentemente. Portanto, a interferência de cada um destes fatores de alteração introduzidos no teste não foi determinado independentemente. Analisando todos os fatores em conjunto foi observado um percentual de 89,1 % de coincidência dos resultados obtidos utilizando os dois protocolos, o estabelecido (YARROW, 1998) e o modificado. De um total de 836 resultados nos testes, 745 foram idênticos para as duas metodologias, e 91 foram diferentes, sendo, 17, 18, 27 e 29 resultados, respectivamente para as assimilações de xilose, maltose, lactose e inositol. Cada teste de assimilação possuiu 209 culturas testadas, ou verificações.

O número de isolados obtidos para cada compartimento variou entre 88, para o solo no período chuvoso, e 142 para o rizoplano no período de seca. Os perfis fisiológicos da população de leveduras do rizoplano indicaram que no período de seca, metade da população isolada foi de leveduras que fermentaram a glicose, enquanto no período de chuva este percentual aumentou para 2/3 da população (Figura 8). No filoplano foram encontradas as menores proporções de leveduras fermentadoras, nos dois períodos. No solo esta população se apresentou em números intermediários entre os outros dois compartimentos.

A capacidade de assimilação de nitrato também foi diferenciada entre os conjuntos de isolados dos três compartimentos (Tabela 16 e Figura 8). Foi observado que em setembro e em janeiro esta característica foi mais freqüentes nos isolados de filoplano (~30%) e menor nos de rizoplano (~10%) e nos de solo (~5%). O crescimento a 36° C foi uma característica menos freqüente entre os isolados de filoplano, enquanto que os de solo em setembro e os de rizoplano em janeiro apresentaram mais freqüentemente esta característica. Para os demais testes realizados foi observada uma distribuição semelhante entre os compartimentos e entre as épocas de coleta. Com relação à atividade micocinogênica, foi observado que no período de seca a partir das amostras de solo pode ser obtido o maior número (13) de isolados com esta atividade, e no período úmido isso foi observado no rizoplano (9) (Tabela 16).

Tabela 16: Número de isolados obtidos para cada repetição e por compartimento amostral nos dois períodos avaliados e quantidade destes isolados que apresentaram determinadas características fisiológicas.

Compartimento Amostr.*	n° de isolados (n)	F. glicose (origem enriq.)	pigmento	36°C	NaCl 10%	Atv. micocin.	Assimilação**					
							nitrato	nitrato	xilose	maltose	lactose	inositol
R1	23	17(14)	0	19	17	0	1	2	21	19	4	4
R2	33	21(10)	0	22	22	1	3	9	30	30	9	9
R3	51	15(5)	4	34	41	1	5	9	50	51	24	28
R4	34	15(9)	0	22	27	0	6	2	30	30	14	15
R set	141	68(38)	4	97	107	2	15	22	131	130	51	56
F1	32	6(5)	3	10	20	2	5	7	30	30	21	19
F2	13	7(7)	0	8	8	0	2	4	13	13	4	6
F3	22	2(2)	2	12	16	3	6	7	18	18	14	14
F4	43	4(4)	4	10	24	0	14	11	37	37	28	23
F set	110	19(18)	9	40	68	5	27	29	98	98	67	62
S1	30	14(9)	0	20	11	8	1	8	21	20	16	15
S2	27	13(8)	1	14	12	0	3	12	25	25	12	11
S3	23	13(6)	1	18	15	1	1	5	21	21	7	7
S4	28	5(3)	2	13	12	4	2	9	22	22	18	18
S set	108	45(26)	4	65	50	13	7	34	89	88	53	51
total set. /07	359	132	17	202	225	20	49	85	318	316	171	169
R1	51	41(12)	1	42	32	0	5	5	27	27	4	10
R2	42	24(4)	3	37	31	3	2	10	36	35	2	2
R3	27	24(4)	0	26	25	3	0	0	23	24	0	1
R4	22	5(3)	2	11	11	3	5	4	13	15	5	7
R jan	142	94(23)	6	116	99	9	12	19	99	101	11	20
F1	23	4(4)	2	11	14	0	7	8	20	19	11	9
F2	18	3(3)	1	6	7	0	7	4	17	16	11	7
F3	56	6(5)	10	17	26	0	21	17	42	44	32	33
F4	24	5(4)	2	12	14	0	9	8	22	22	8	9
F jan	121	18(16)	15	46	61	0	44	37	101	101	62	58
S1	15	8(2)	0	12	10	0	0	0	13	13	6	6
S2	22	5(2)	1	7	6	0	1	7	19	20	14	15
S3	23	7(5)	0	9	7	1	2	6	19	18	15	14
S4	28	8(4)	0	12	7	2	0	6	20	20	17	17
S jan	88	28(13)	1	40	30	3	3	19	71	71	52	52
total janeiro/08	351	140	22	202	190	12	59	75	271	273	125	130
total	710	272	39	404	415	32	108	160	589	589	296	299

* Set – setembro/2007, jan – janeiro/2008, F- folha, R-raiz, S-solo, 1, 2, 3 e 4 repetições, (n) número amostral, (origem enriq.)- número de isolados do enriquecimento, pigmento – presença de pigmentos naturais. ** - os testes de assimilação de fontes de carbono foram realizados em meio BIL.

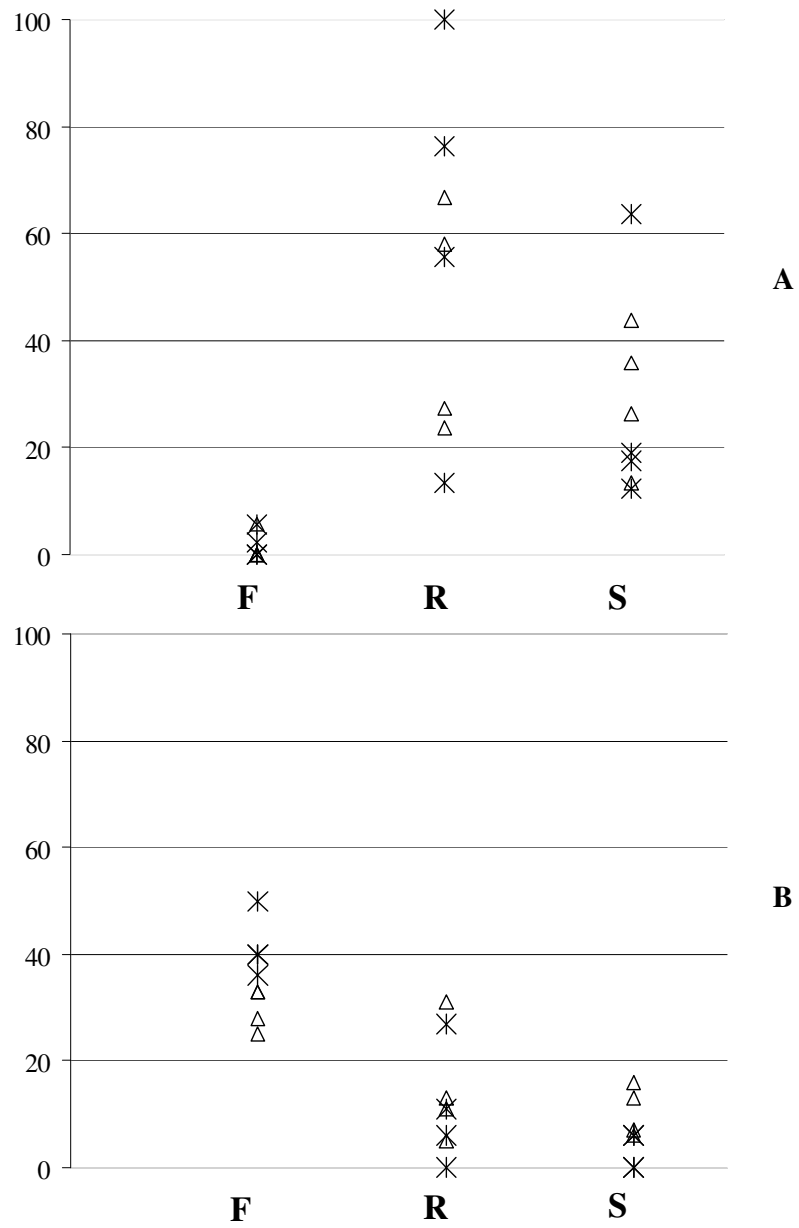


Figura 8: Dispersão da porcentagem da capacidade de fermentar glicose (A) e assimilar nitrato (B) dos isolados por plaqueamento dos três compartimentos estudados: folha (F), raiz (R) e solo (S). Δ - setembro de 2007 e ✱ - janeiro de 2008.

Tabela 17: Característica dos isolados presentes nos enriquecimentos e no espalhamento em placa em cada um dos ambientes amostrados e para as duas épocas de colheita. 0 – não detectado, 1- 4 presença em 1 a 4 repetições. Valores médios absolutos da presença das mesmas características para os isolados obtidos por plaqueamento, entre parênteses valores relativos.

Enriquecimento														
Amostra*	Ferment.	ñ .Ferment	pigmento	ñ. pigmento	micocina	ñ. micocina	nitrato	ñ nitrato	nitrito	ñ nitrito	xilose	ñ xilose	inositol	ñ inositol
Set. F	4	4	1	4	2	4	3	4	4	4	4	4	4	4
Set. R	4	4	0	4	0	4	1	4	2	4	4	4	4	4
Set. S	4	3	0	4	2	4	0	4	3	4	4	4	2	4
Jan. F	4	4	1	4	0	4	3	4	3	4	4	4	4	4
Jan. R	4	2	0	4	0	4	1	4	1	4	4	4	4	4
Jan. S	4	4	0	4	0	4	2	4	2	4	4	3	4	4

Plaqueamento								
Amostra*	Ferment.	pigmento	micocina	Nitrato	Nitrito	Xilose	Inositol	
Set. F (n)13,7	0,2 (2)	1,7 (13)	0 (0)	4,2 (31)	3 (22)	12,2 (89)	9 (65)	
Set. R (n)22	8 (36)	1 (5)	0,5 (2)	3,2 (15)	4,2 (19)	20,2 (92)	10,5 (48)	
Set. S (n)16	4,7 (30)	1 (6)	0,7 (5)	1,7 (11)	7 (44)	14 (88)	9,2 (58)	
Jan. F (n)22,2	0,5 (2)	3,2 (15)	0 (0)	9,2 (42)	7,7 (35)	18,5 (83)	13 (58)	
Jan. R (n)28	17,7 (63)	1,5 (5)	2,2 (8)	2,5 (9)	4,2 (15)	19,5 (70)	3 (11)	
Jan. S (n)16,2	4 (25)	0,2 (2)	0,7 (5)	0,5 (3)	4,5 (28)	14 (86)	11 (68)	

* - Set – setembro/2007, jan – janeiro/2008, F- folha, R-raiz, S-solo,

Os dados da distribuição da frequência dos táxons entre os compartimentos estudados, pelos dois protocolos de isolamento e para os dois períodos de coleta estão descritos na tabela 18. Foram identificados um total de 74 táxons, sendo 25 de ascomicetos, 44 de basidiomicetos, dois de fungos filamentosos não identificados e três de *Prototheca*. Para uma frequência total máxima de 296, sendo 100 para ascomicetos e 176 para basidiomicetos. As amostras de folha apresentaram maior riqueza, 33, de táxons totais nos dois períodos, seguidas pelas amostras de raiz, 26 táxons nos dois períodos, e pelas amostras de solo com 23 táxons em setembro e 17 em janeiro. Com relação a frequência total em que estes táxons aparecem, as amostras de folha apresentam os maiores valores, 59 vezes, independente do período, as amostras de raiz e de solo no período seco apresentam valores em torno de 40 vezes e a de solo em janeiro, 30 vezes. De uma maneira geral, os táxons mais frequentes encontrados nos dois períodos foram *Pichia caribbica* e *Cryptococcus laurentii* (considerando também *C. aff. laurentii*). Estes táxons estavam presentes em praticamente todas as amostras estudadas. Em contrapartida, do total de táxons identificados, 25 só puderam ser observados em uma única repetição de apenas uma amostra, sendo que destes nove táxons foram de ascomicetos e 14 de basidiomicetos.

Tabela 18: Frequencia absoluta dos táxons encontrados em folha, raiz e solo, nas coletas de setembro de 2007 e janeiro de 2008 em plantio de cana-de-açúcar. Frequencias totais (T) e por protocolo de isolamento: plaqueamento (pl.), enriquecimento (en.) em cada compartimento amostral nos dois períodos estudados. Frequencia e riqueza de táxons totais e separada para ascomicetos, basideomicetos e principais clados.

Período de coleta Amostra (n=4) Táxon (espécie) ¹	setembro 2007						janeiro 2008											
	folha		raiz		solo		folha		raiz		solo							
	pl.	en.	T	pl.	en.	T	pl.	en.	T	pl.	en.	T						
Clado Saccharomyces²																		
<i>Candida glabrata</i> *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-		
<i>Torulaspota globosa</i> *	-	-	-	-	-	3	2	4	-	-	-	-	-	-	3	2	4	
<i>Candida incommunis</i> *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	
<i>Pichia aff. fermentans</i> *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	
<i>Candida aff. colliculosa</i> #	-	-	-	-	2	2	1	-	1	-	-	-	-	2	2	-	-	-
<i>Candida tartarivorans</i> *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	
<i>Candida aff. tsuchiyae</i> *	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	1	-	1	1	-	1	
<i>Candida cf. sorbophila</i> #	-	2	2	-	-	-	-	-	1	1	1	2	2	3	-	-	-	
<i>Candida aff. azyma</i> #	-	-	-	2	-	2	-	-	-	-	-	3	-	3	-	-	-	
<i>Candida aff. drosophilae</i> *	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Clado Wickerhanomyces																		
<i>C. fermentati/Pichia caribbica</i> *	1	4	4	4	4	4	4	2	4	2	4	4	4	4	4	3	4	
<i>Williopsis saturnus</i> *	-	1	1	-	1	1	1	-	1	-	-	-	-	1	1	-	1	1
Saccharomycetales incertae sedis																		
<i>Zygoascus meyeriae</i> *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	1	1
Clado Pichia																		
<i>C. kruseii /P. kudriavzevii</i> *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1
<i>Candida valida</i> #	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-
Clado Metschnikowia																		
<i>Candida bentonensis</i> *	-	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida aff. bentonensis</i> ^{tr.}	1	-	1	1	-	1	-	-	-	1	1	2	-	-	-	-	-	-
<i>Candida cf. bentonensis</i> ^{tr.}	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pezizomycotina																		
<i>Aureobasidium pullulans</i> *	3	3	3	2	-	2	-	-	-	3	1	3	-	-	-	-	-	-
<i>Mycosphaerella graminicola</i> *	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Lecyt. aff. decumbens</i> *	-	-	-	-	-	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lecythophora</i> sp. 1 ^{tr.}	-	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lecythophora</i> sp. 2 ^{tr.}	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Exophilia spinifera</i> *	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hymenomycetous																		
<i>Bullera aff. coprosmaensis</i> *	3	-	3	2	-	2	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus aff. gilvescens</i> *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	4	-	-	-	-	-	-
<i>Crypt. aff. taibaiensis</i> *	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus podzolicus</i> *	1	-	1	4	1	4	4	2	4	-	-	-	2	1	2	4	-	4
<i>Cryptococcus cf. podzolicus</i> ^r	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus aff. luteolus</i> *	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus cellulolyticus</i> *	3	1	3	-	1	1	1	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus flavus</i> *	-	-	-	1	-	1	-	-	-	4	-	4	-	-	-	1	-	1
<i>Cryptococcus flavescens</i> *	-	3	3	1	1	1	-	1	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-
<i>Cryptococcus aff. laurentii</i> *	1	1	2	-	1	1	2	2	2	-	-	-	1	-	1	-	3	3
<i>Cryptococcus laurentii</i> *	1	2	3	3	2	4	3	2	3	-	-	-	2	1	2	1	1	1
<i>Cryptococcus nemorosus</i> *	1	4	4	1	1	1	1	-	1	1	2	2	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp. 1 ^{tr.}	-	1	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp. 2 ^{tr.}	-	1	1	1	-	1	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-

Período de coleta	setembro 2007									janeiro 2008									
	folha			raiz			solo			folha			raiz			solo			
	pl.	en.	T	pl.	en.	T	pl.	en.	T	pl.	en.	T	pl.	en.	T	pl.	en.	T	
Amostra (n=4)																			
Táxon (espécie) ¹	pl.	en.	T	pl.	en.	T	pl.	en.	T	pl.	en.	T	pl.	en.	T	pl.	en.	T	pl.
<i>Cryptococcus</i> sp. 3 ^{tr.}	-	-	-	-	-	-	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp. 4 ^{tr.}	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp. 5 ^{tr.}	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp. 6 ^{tr.}	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp. 7 ^{tr.}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp. 8 ^{tr.}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tremella</i> aff. <i>globispora</i> *	-	2	2	1	1	1	-	2	2	-	-	-	1	-	1	1	-	1	1
Uredinomycetous/ lev. rosa																			
<i>Occultifur</i> aff. <i>externus</i> *	-	-	-	1	-	1	1	-	1	1	-	1	2	-	2	-	-	-	-
<i>Rhodotorula</i> <i>marina</i> *	2	-	2	-	-	-	-	-	-	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula</i> aff. <i>marina</i> *	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp. 1 ^{tr.}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-
<i>Rhodotorula</i> sp. 2 ^{tr.}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp. 3 ^{tr.}	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp. 4 ^{tr.}	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Erythrobasidium</i> <i>hasegawian</i> *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodosporidium</i> aff. <i>paludigenum</i> *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-
<i>Rhosp.</i> aff. <i>sphaerocarpum</i> *	1	-	1	-	-	-	1	-	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
Ustilaginomyces/ Pseudozyma																			
<i>Pseudozyma</i> sp. 1 ^{tr.}	1	1	2	1	-	1	-	-	-	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudozyma</i> sp. 2 ^{tr.}	1	-	1	-	-	-	-	-	-	3	2	4	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudozyma</i> sp. 3 ^{tr.}	-	-	-	1	-	1	4	-	4	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudozyma</i> sp. 4 ^{tr.}	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudozyma</i> sp. 5 ^{tr.}	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudozyma</i> sp. 6 ^{tr.}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudozyma</i> aff. <i>prunii</i> *	3	-	3	1	-	1	-	-	-	4	1	4	1	-	1	-	-	-	-
<i>Pseudozyma</i> <i>jejuensis</i> *	2	-	2	1	-	1	-	-	-	3	-	3	1	-	1	1	-	1	1
Ustilaginales																			
<i>Ustilago</i> <i>spermophora</i> *	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
fungos não identificados																			
Basidiomiceto sp. 1 ^{tr.}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-
Basidiomiceto sp. 2 ^{tr.}	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Basidiomiceto sp. 3 ^{tr.}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Basidiomiceto sp. 4 ^{tr.}	-	-	-	1	1	2	-	-	-	1	1	2	1	-	1	-	-	-	-
<i>Candida</i> sp. 9 ^{tr.}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-
fung filam sp. 1 ^{tr.}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
fung filam sp. 2 ^{tr.}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
Prototheca (Algae)																			
<i>Prototheca</i> <i>zopfii</i> [#]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
<i>Prototheca</i> <i>wickerhamii</i> [#]	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	2	-	2	2	-	2	2
<i>Prototheca</i> sp. 1 [#]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Frequencia de táxons³																			
Total (maxF=296)⁴	37	30	61	32	17	40	36	15	41	49	19	59	31	18	39	20	15	30	
ascomicetos (maxF=108) ⁴	7	13	16	12	7	15	12	5	14	9	9	14	15	14	22	8	8	12	12
basidiomicetos (maxF=168) ⁴	30	17	45	20	10	25	23	10	26	40	10	45	14	4	15	10	4	13	13
Clado <i>Saccharomyces</i>	-	3	3	2	2	4	4	3	6	1	2	2	9	5	12	4	2	5	5
Clado <i>Debaryomyces</i>	1	5	5	4	5	5	5	2	5	2	4	4	4	5	5	4	4	5	5
<i>Saccharomycetales incertae sedis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	1	1	1
Clado <i>Pichia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	2	-	1	1	1
Clado <i>Metschnikowia</i>	1	1	2	3	-	3	-	-	-	1	1	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pezyzomycotina</i>	5	4	6	3	-	3	3	-	3	4	1	4	1	-	1	-	-	-	-

Período de coleta	setembro 2007									janeiro 2008								
	folha			raiz			solo			folha			raiz			solo		
	pl.	en.	T	pl.	en.	T	pl.	en.	T	pl.	en.	T	pl.	en.	T	pl.	en.	T
<i>Hymenomyces</i>	16	15	27	14	9	18	15	10	18	13	5	16	6	3	7	7	4	10
<i>Uredinomyces</i>	5	-	5	1	-	1	3	-	3	6	2	7	4	-	4	1	-	1
<i>Ustilaginomyces/ Pseudozyma</i>	9	1	10	4	-	4	4	-	4	18	3	19	2	-	2	1	-	1
<i>Ustilaginales</i>	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Prototheca</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	2	-	2	2	3	5
Riqueza de táxons⁵																		
Total (maxR=74)⁶	25	17	35	21	12	26	20	9	23	29	14	33	21	12	26	11	9	17
ascomicetos (maxR=27) ⁶	5	7	10	7	3	9	6	3	7	5	5	6	9	8	13	3	5	6
basidiomicetos (maxR=42) ⁶	20	10	25	14	9	17	13	6	15	24	9	27	11	4	12	7	2	8
<i>Clado Saccharomyces</i>	-	2	2	1	1	2	2	2	3	1	2	2	6	3	7	2	1	2
<i>Clado Debaryomyces</i>	1	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2
<i>Saccharomycetales incertae sedis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	1	1
<i>Clado Pichia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	2	-	1	1
<i>Clado Metschnikowia</i>	1	1	2	3	-	3	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-
<i>Pezyzomycotina</i>	3	2	4	2	-	2	2	-	2	2	1	2	-	-	-	-	-	-
<i>Hymenomyces</i>	10	8	12	8	8	11	8	6	10	7	4	9	4	3	5	4	2	5
<i>Uredinomyces</i>	4	-	4	1	-	1	3	-	3	5	2	6	3	-	3	1	-	1
<i>Ustilaginomyces/ Pseudozyma</i>	6	1	6	4	-	4	1	-	1	8	2	8	2	-	2	1	-	1
<i>Ustilaginales</i>	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Prototheca</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-	1	1	2	3

(-) não detectado na amostra pela metodologia utilizada.

¹ - Identificação do táxon por abordagem polifásica (*), fenotípica (#) ou táxon por agrupamento dos isolados pela triagem (tr);

² - Clados de acordo com Kurtzman e Fell (2006);

³ - Frequência dos táxons total e por clado para os compartimentos estudados;

⁴ - maxF = máximo de frequência possível para o número de táxons encontrados nas 4 repetições, para ascomicetos, basidiomicetos e total;

⁵ - Riqueza dos táxons total e por clado para os compartimentos estudados;

⁶ - maxR= número máximo de táxons possíveis, para ascomicetos, basidiomicetos e total.

Na tabela 19 estão relacionadas algumas características fisiológicas dos principais táxons encontrados nas amostras de solo, folha e raiz de cana-de-açúcar. Para a relação completa das características fisiológicas estudadas nos isolados de cana ver Tabela 3 nos anexos.

Tabela 19: Propriedades fisiológicas dos táxons em fermentar (F.) e assimilar (A.) açúcares, ácidos orgânicos e fontes de nitrogênio, e crescimento a 10 e 15% de NaCl, a 36 e a 40° C, no meio GYP.

Táxon (espécie)	F. glicose	F. galactose	F. sacarose	A. galactose	A. ribose	A. xilose	A. L-arabinose	A. D-arabinose	A. rarnnose	A. celobiose	A. salicina	A. lactato	A. succinato	A. citrato	A. malato	A. oxalato	A. acetato	A. nitrato	A. nitrito	NaCl 10%	AnCl 15%	36 °C	40 °C
<i>Candida glabrata</i>	+	n	n	-	-	-	-	-	-	-	n	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>Torulaspota globosa</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	+	-	v	-	-	-	-	+	+
<i>Candida incommunis</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>Pichia aff. fermentans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>C. aff. colliculosa</i>	+	n	n	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	n	+	-	-	-	-	+	n
<i>C. tartarivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	n	-	+	+
<i>C. aff. tsuchiyaee</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	n
<i>C. cf. sorbophila</i>	-	n	n	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>Candida aff. azyma</i>	-	n	n	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	n
<i>C. aff. drosophilae</i>	-	n	n	+	-	-	-	-	-	-	n	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Pichia caribbica</i>	+	+	+	+	v	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	v	+	-	-	+	-	+	+
<i>Williopsis saturnus</i>	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	n
<i>Candida krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
<i>Candida cf. valida</i>	-	n	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	n
<i>C. aff. bentonensis</i>	-	n	n	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	n
<i>Candida bentonensis</i>	-	n	n	-	+	+	+	-	+	+	n	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	n
<i>A. pullulans</i>	-	n	n	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	v	-	-	n
<i>M. graminicola</i>	-	n	n	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	v	-	+	-	-	-	-	n
<i>L. aff. decumbens</i>	-	n	n	+	-	+	v	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	v
<i>Lecytophora sp. 1</i>	-	n	n	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	n
<i>Exophilia spinifera</i>	-	n	n	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-
fungo filam. sp. 1	-	n	n	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	n
Basidiomiceto sp. 1	-	n	n	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	v	+	+	+	-	-	+	-
Basidiomiceto sp. 2	-	n	n	+	-	+	-	-	-	n	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Basidiomiceto sp. 3	-	n	n	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	n	-	+	+	+	-	+	n
Basidiomiceto sp. 4	-	n	n	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
<i>B. aff. coprosmaensis</i>	-	n	n	+	v	+	+	+	+	+	-	-	v	-	+	-	-	-	+	-	-	-	n
<i>C. aff. gilvescens</i>	-	n	n	v	v	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n
<i>C. aff. luteolus</i>	-	n	n	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	n
<i>C. aff. taibaiensis</i>	-	n	n	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	n
<i>C. cellulolyticus</i>	-	n	n	+	+	+	+	+	+	+	-	-	v	-	+	-	-	-	-	v	-	-	n
<i>C. flavescens</i>	-	n	n	+	+	+	+	+	+	+	v	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	n
<i>Cryptococcus flavus</i>	-	n	n	+	+	+	+	v	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	n
<i>C. aff. laurentii</i>	-	n	n	+	-	+	+	v	+	+	v	v	v	-	+	-	-	-	-	+	-	+	n
<i>C. laurentii</i>	-	n	n	+	-	+	+	+	+	+	-	v	v	-	+	-	-	-	-	+	-	+	n
<i>C. nemorosus</i>	-	n	n	+	+	+	+	v	+	+	v	-	-	-	v	-	-	-	-	v	-	-	n
<i>C. podzolicus</i>	-	n	n	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	n	-	-	+	-	-	-	n

Táxon (espécie)	F. glicose	F. galactose	F. sacarose	A galactose	A. ribose	A. xilose	A. L-arabinose	A. D-arabinose	A. rarnose	A. celobiose	A. salicina	A. lactato	A. sucinato	A. citrato	A. malato	A. oxalato	A. acetato	A. nitrato	A. nitrato	NaCl 10%	AnCl 15%	36 °C	40 °C
<i>Cryptococcus</i> sp. 1	-	n	n	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	n
<i>Cryptococcus</i> sp. 2	-	n	n	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	v	-	+	+	+	-	-	n
<i>Cryptococcus</i> sp. 3	-	n	n	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	v	+	-	-	-	n
<i>Cryptococcus</i> sp. 5	-	n	n	+	-	+	+	+	+	+	n	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	n
<i>Cryptococcus</i> sp. 7	-	n	n	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	n	-	-	-	-	-	-	n
<i>T. aff. globispora</i>	-	n	n	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	v	-	v	v	-	-	v	n
<i>O. aff. externus</i>	-	n	n	v	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	n
<i>R. aff. marina</i>	-	n	n	+	-	+	+	+	v	+	-	v	+	-	v	-	-	-	-	v	-	v	-
<i>Rhodotorula marina</i>	-	n	n	+	-	+	+	v	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n
<i>Rhodotorula</i> sp. 1	-	n	n	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	n
<i>Rhodotorula</i> sp. 4	-	n	n	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n
<i>E. hasegawian</i>	-	n	n	n	-	+	+	-	+	-	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n
<i>R. aff. paludigenum</i>	-	n	n	-	-	+	-	+	-	-	n	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	n
<i>R.aff. sphaerocarpum</i>	-	n	n	+	+	+	+	+	v	+	-	-	+	-	v	-	-	+	+	v	-	+	n
<i>Pseudozyma</i> sp. 1	-	n	n	+	+	+	+	v	-	-	+	-	-	-	v	-	-	+	+	v	-	+	n
<i>Pseudozyma</i> sp. 2	-	n	n	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	n
<i>Pseudozyma</i> sp. 3	-	n	n	+	v	+	+	+	+	+	v	-	-	-	+	-	-	v	+	-	-	-	n
<i>Pseudozyma</i> sp. 6	-	n	n	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	n	-	+	+	-	-	+	n
<i>P. aff. prunii</i>	-	n	n	v	+	+	+	+	-	v	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	n
<i>P. jejuensis</i>	-	n	n	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	v	-	-	-	n
<i>U. spermophora</i>	-	n	n	+	+	+	+	v	-	-	-	-	-	-	v	-	-	+	+	v	-	v	n
<i>Prototheca zopfii</i>	-	n	n	-	-	-	-	-	-	-	n	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>P. wickerhamii</i>	-	n	n	+	-	-	-	-	-	-	n	-	-	-	+	-	v	v	v	-	-	-	n
<i>Prototheca</i> sp. 1	-	n	n	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-

Resultados (+) positivo, (-) negativo, (v) variável e (n) não realizado ou duvidoso.

As ampliações da região ITS+D1D2 revelaram grande variação, entre os isolados, do tamanho dos fragmentos gerados. Na figura 9, está a imagem do gel com o posicionamento das bandas dos fragmentos de algumas culturas isoladas de cana-de-açúcar. O tamanho em pares de bases da região ITS+D1D2 das culturas analisadas variou entre 889 pb para a cultura 813 de *Candida bentonensis* e 1583 pb para a cultura 1088 de *Candida glabrata*. No anexo, tabela 4, estão descritos os isolados que foram seqüenciados, e, para cada isolado seqüenciado, o tamanho do fragmento obtido pela amplificação, os números de depósito da cultura do isolado na coleção de cultura do IM-UFRJ e os resultados da análise de similaridade das seqüências feitas no programa FASTA, com a similaridade em percentual, o tamanho considerado para a análise de similaridade e as sequencias mais similares encontradas nos bancos de dados (EMBL, NCBI, JCI) para a região D1D2 e ITS. As seqüências obtidas foram depositadas no EMBL-Bank com os seguintes números de acesso: seqüências apenas da região D1D2-LSU, números de FN428858 a FN428876 e seqüências compreendendo as regiões ITS1, 5.8S, ITS2 e D1D2-LSU, números de FN428877 a FN428949 (anexos - Tabela 4).

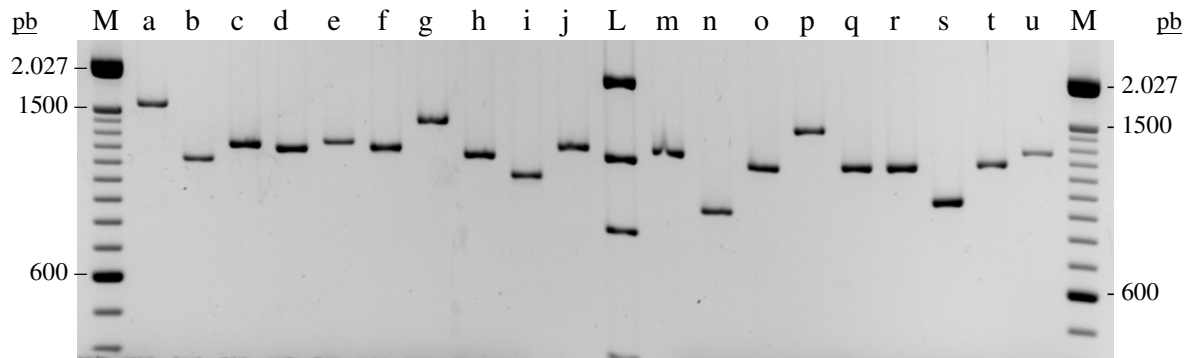


Figura 9: Variação do tamanho da região ITS+D1D2 de culturas isoladas de cana-de-açúcar. Cultura (linha): 1088 (a); 1059 (b); 1050 (c); 1044 (d); 1012 (e); 1011 (f); 950 (g); 945 (h); 933 (i); 922 (j); 917 (m); 813 (n); 839 (o); 738 (p); 903 (q); 719 (R); 1113 (s); 1130 (t) e 1150 (u); (M) marcador de peso molecular 100 pb; (L) - marcador LowMass.

As análises filogenéticas das sequências da região D1D2 do LSU rDNA obtidas dos isolados estão na Figura 10, ascomicetos, e Figura 11, basideomicetos. Sequências de estirpes *typo* próximas as sequências dos isolados foram incluídas na análise. Os números de acesso nos bancos públicos de sequências (EMBL/NCBI) dos isolados e das estirpes *typo* foram incluídos nas figuras. O código, nas coleções de cultura, das estirpes *typo* também foi incluído. Para o código de depósito dos isolados de cana-de-açúcar na coleção de cultura do IM-UFRJ ver tabela 3 nos anexos.

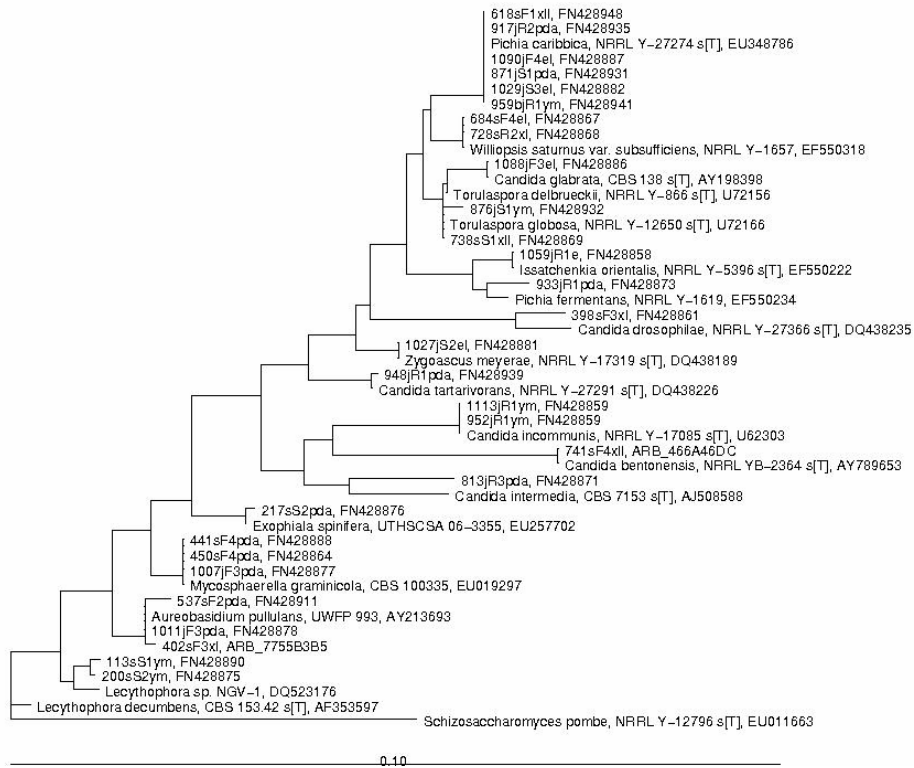


Figura 10: Análise filogenética das sequencias da região D1/D2 do gene da região maior do ribossoma (LSU rDNA) dos isolados de ascomicetos encontrados em cana-de-açúcar e das estirpes tipo (s[T]) mais próximas, utilizando o método de Máxima Parsimonia. Número de acesso (EMBL) e o código da coleção de cultura originária informados para cada sequencia.

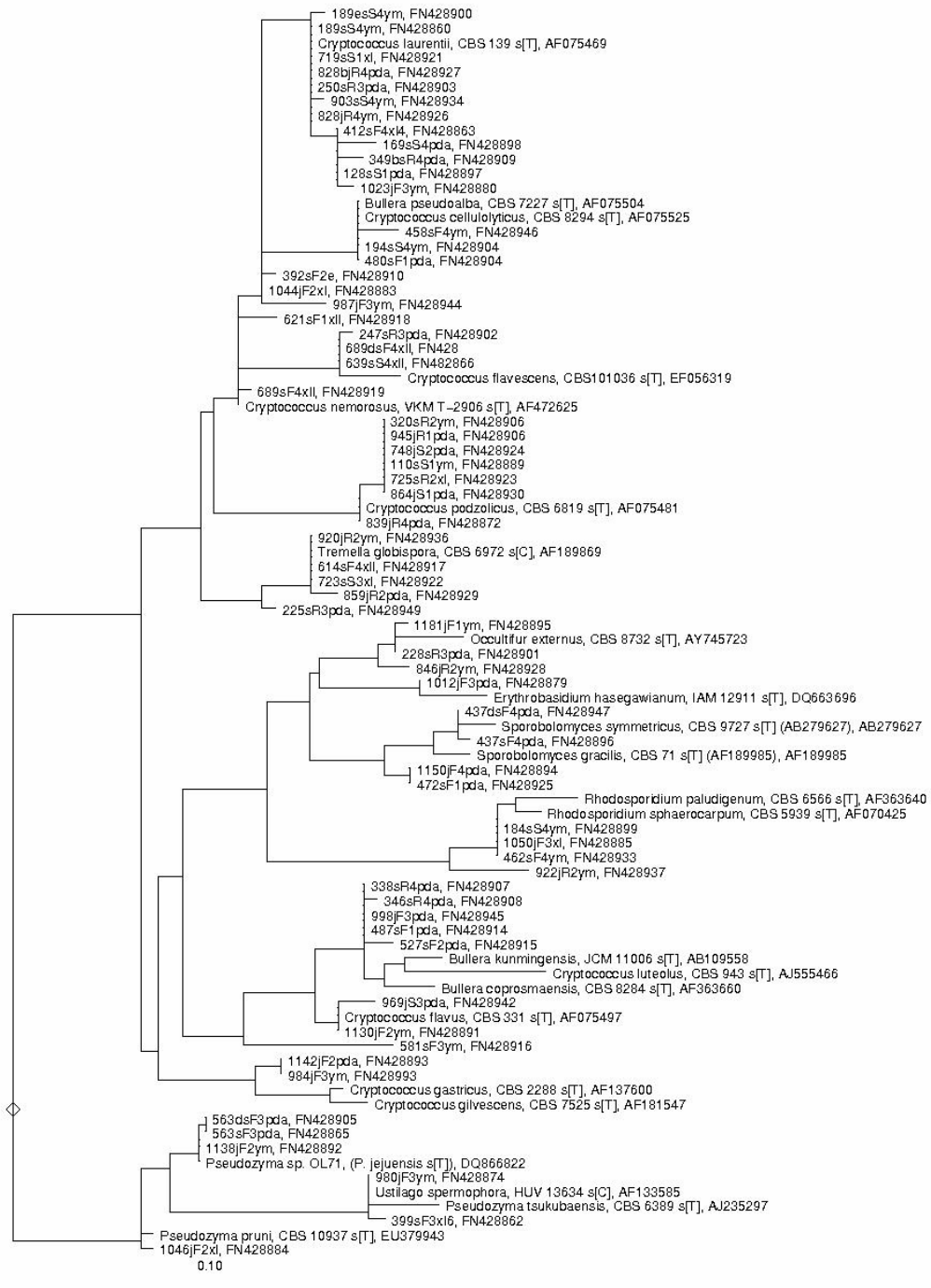


Figura 11: Análise filogenética das sequências da região D1/D2 do gene da região maior do ribossoma (LSU rDNA) dos isolados de basidiomicetos encontrados em cana-de-açúcar e das estirpes tipo (s[T]) mais próximas, utilizando o método Máxima Parsimonia. Número de acesso (EMBL) e o código da coleção de cultura originária informados para cada sequência.

4.2. Otimização das Condições de Extração e da Reação de Amplificação

4.2.1. Extração de ácidos nucleicos

Os resultados da extração com os testes de alteração dos volumes da solução de lise celular (SLC), realizados com o sistema de extração MasterPure Yeast DNA Purification da Epicentre Biotechnologies, estão mostrados na figura 12A. Todos os tratamentos realizados resultaram em material perceptível na eletroforese (Figura 12A) e não houve problema para a posterior amplificação dos fragmentos para os dois conjuntos de iniciadores testados (Figura 12B e 12C). Não foi detectado contaminantes de ácido nucleicos no sistema de extração que pudessem ser visualizados ou amplificados pelas condições utilizadas (Figura 13). O rendimento variou de acordo com a cultura, e houveram extrações com material genômico variando de claramente perceptível até imperceptível visualmente nas eletroforese em agarose (Figura 13A). Porém, mesmo nas vezes em que houve pouco material ou que ele não era perceptível não houve dificuldades na amplificação (Figura 13B).

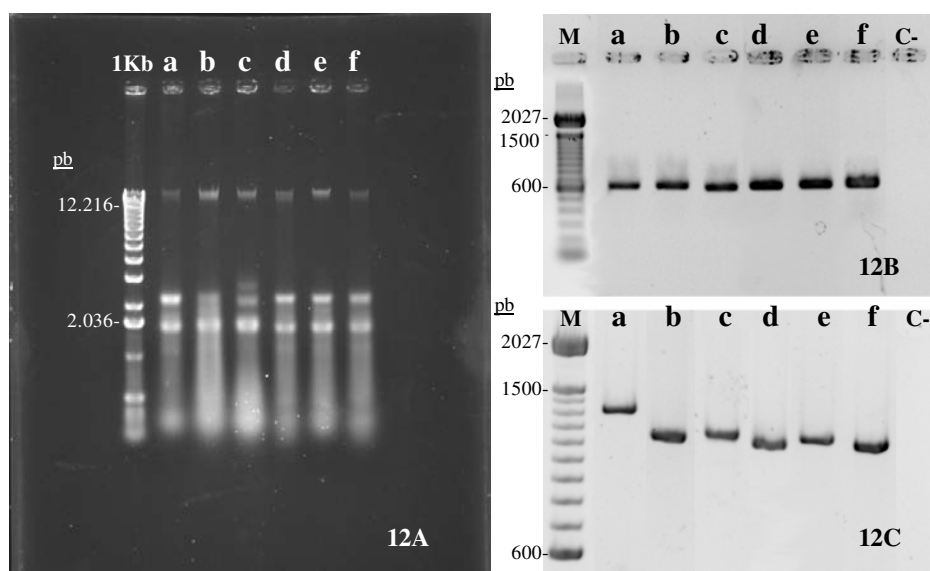


Figura 12: Eletroforese da extração de ácidos nucleicos (12A) e da amplificação da região D1D2 (10B) e ITS+D1D2 (12C) das culturas 189 (a), 194 (b), 200 (c), 338 (d), 480 (e) e 998 (f). Cultura 189 (a) extraída com 250 μ L de SLC; (b) cultura 194 com 200 μ L de SLC; (c) cultura 200 e (d) cultura 338 com 250 μ L de SLC com volume completado; (e) cultura 480 com 200 μ L de SLC e volume completado, (f) cultura 998 com 300 μ L SLC (f). C- controle negativo das reações de amplificação; (M) marcador de peso molecular 100pb; pb - pares de base. Volume aplicado para a eletroforese: marcadores 5 μ L ; material extraído 5 μ L e amplificações 2 μ L.

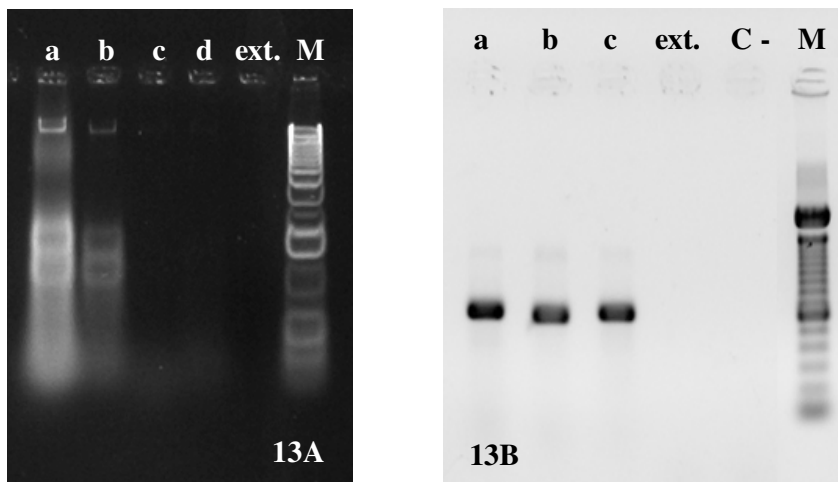


Figura 13: Rendimentos da extração de material genômico de quatro culturas de leveduras e controle de contaminação da extração (13A). Posterior amplificação da região D1-D2 (13B). Culturas (a) 1113; (b) 1130; (c) 1150, (d) 1181, (ext.) controle da extração, C- controle negativo da amplificação e marcadores de peso molecular (M) 1 Kb em 11A e 100pb em 11B.

4.2.2. Amplificação dos fragmentos

Dependendo do rendimento da extração, foi utilizado um volume diferente para realização da amplificação. Nas extrações como as das linhas a, b e c da Figura 13A, foram utilizados 0,2 , 0,8 e 2 μ L, respectivamente para reações de amplificação com um volume final de 25 μ L. No experimento de avaliação da influência do número de ciclos, as reações com 30 e 35 ciclos produziram bandas na eletroforese com a mesma intensidade e nitidamente mais forte do que as reações de 25 ciclos, independente da cultura utilizada (Figura 14).

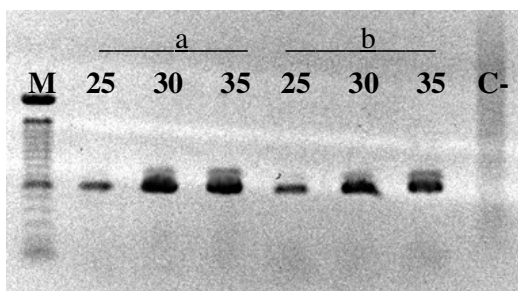


Figura 14: Reação com diferentes números de ciclos de amplificação da região D1-D2 de duas culturas de levedura. (M) marcador de peso molecular 100 pb; (a) cultura e (b) cultura C- controle negativo da reação. (25), (30) e (35) números de ciclos.

Com relação aos experimentos para avaliar a temperatura de anelamento das seqüências iniciadoras para as amplificações simétricas utilizando NL1-NL4 e ITS1f-NL4 foi observado que todas as temperaturas testadas permitiram uma boa amplificação da região estudada (Figura 15). Para a região D1-D2 a temperatura variou de 52 a 57,9 °C e para a região ITS-D1D2 a temperatura variou de 52 a 55 °C. Após os experimentos, os parâmetros mais adequados de temperatura e número de ciclos foram incorporados nas modificações das condições das reações de amplificação utilizadas para as amplificações deste trabalho, como descrito em Material e Métodos, item 3.8.2, página 44.

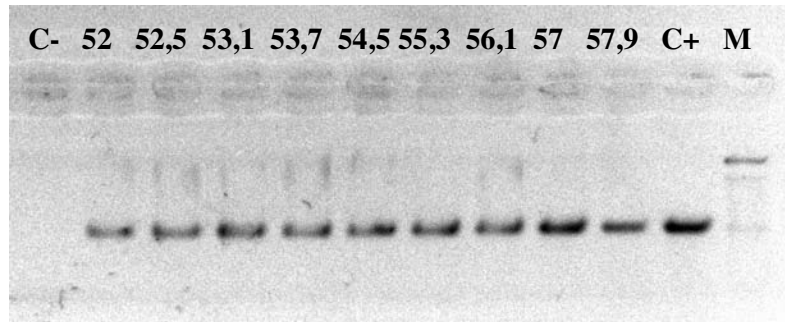


Figura 15: Amplificação da região D1-D2 com diferentes temperaturas de anelamento em °C. C- controle negativo e C+ controle positivo com temperatura de anelamento a 52° C. M marcador 100pb.

4.3. Metodologia de Isolamento

4.3.1. Teste de resistência das leveduras ao NaCl

A distribuição da resistência para as diferentes concentrações de NaCl, está descrita na tabela 21. Os valores estão em números absolutos de culturas resistentes das diferentes espécies ou gêneros para cada concentração do sal. A maior parte da distribuição da resistência entre as leveduras ascomicéticas testadas ficou entre os níveis de 8 e 10% de sal com respectivamente 60 e 76 das 186 culturas testadas, para as basideomicéticas, 71 das 116 culturas tiveram a resistência de 10%. A resistência ao NaCl das culturas testadas indica que em sua totalidade não houve inibição do crescimento na concentração de 3% NaCl no meio GYP, e mais de 90% se desenvolveram até a concentração de 6% (Figura 16). Na concentração de 8% de sal mais de 80% das culturas se mostraram resistentes enquanto que com a concentração de 15% menos de 10% cresceram. Foi observado maior diferença entre os dois grupos testados, leveduras da coleção e leveduras isoladas de restinga, na concentração de 10 % de NaCl. Nesta concentração, 28% das culturas da coleção e 72% das culturas de restinga se desenvolveram.

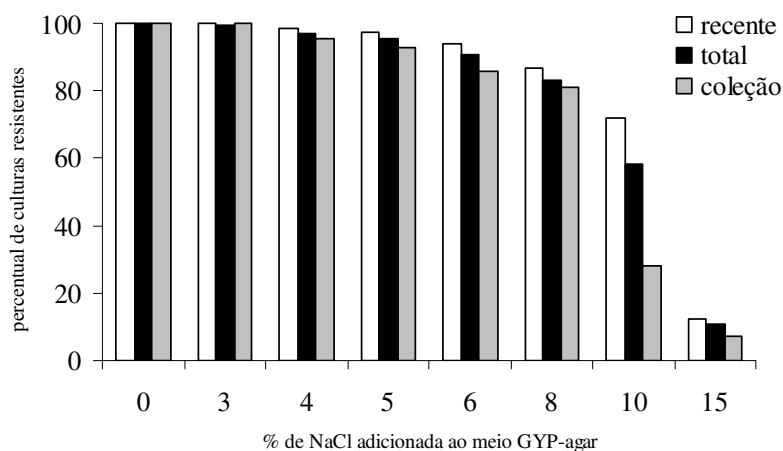


Figura 16: Porcentagem de tolerância às concentrações de NaCl das 217 culturas de restinga (Garcia, 2007), das 85 pertencentes à coleção e do total de culturas testadas após 10 dias de crescimento. Os testes foram realizados em meio GYP-agar em placa réplica.

Tabela 20: Distribuição da resistência às concentrações de NaCl. Números de culturas testadas para cada táxon e a quantidade de culturas resistentes até a concentração determinada.

Gênero	Espécie	Nº. de culturas	Concentração de NaCl em%							
			no meio GYP-agar							
			3	4	5	6	8	10	15	
ascomicetos			186	4	4	6	14	60	76	22
leveduras pretas			5				2	1	2	
<i>Candida</i>	29 espécies	125	2	2	2	9	50	50	10	
<i>Debaromyces</i>	<i>D. hansenii</i>	1					1			
	<i>D. occidentalis</i>	8						8		
<i>Dipodascus</i>	<i>D. capitatus</i>	2			1	1				
<i>Kloeckera</i>	<i>K. apiculata</i>	3	1		2					
	<i>Kloeckera</i> sp.	1				1				
<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. aestuarii</i>	1					1			
	<i>K. lactis</i>	1	1							
<i>Kodamaea</i>	<i>K. ohmeri</i>	4						4		
<i>Lallaria</i>	<i>Lallaria</i> sp.	2		1		1				
<i>Pichia</i>	8 espécies	20		1	1	1	2	6	9	
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cariocanus</i>	1						1		
	<i>S. cerevisiae</i>	4				1	1	2		
<i>Sporopachydermia</i>	<i>Sporopachydermia</i> sp-like	1						1		
<i>Torulaspora</i>	<i>T. pretoriensis</i>	1					1			
<i>Williopsis</i>	<i>W. californica</i>	1					1			
<i>Yarrowia</i>	<i>Y. lipolitica</i>	2						2		
<i>Zygoascus</i>	<i>Z. helenicus</i>	1					1			
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Z. rouxii</i>	1							1	
basideomicetos			116	3	1	7	6	17	71	11
basideomiceto leveduriforme			38			1	1	34	2	
<i>Cryptococcus</i>	7 espécies	44	1	1	2	2	8	22	8	
<i>Fellomyces</i>	<i>Fellomyces</i> sp.	3					3			
<i>Oosporidium</i>	<i>O. margaritifera</i>	1					1			
<i>Pseudozyma</i>	<i>Pseudozyma</i> sp.	5					1	4		
<i>Rhodotorula</i>	<i>R. glutinis</i>	1						1		
	<i>R. minuta</i>	2				1		1		
	<i>R. mucilaginosa</i>	7					1	6		
	<i>Rhodotorula</i> sp.	4	2		1	1				
<i>Sporodiobolus</i>	<i>S. aff. johnsonii</i>	1						1		
<i>Tremella</i>	<i>Tremella</i> sp.	9			4	1	1	2	1	
<i>Trichosporon</i>	<i>T. ovoides</i>	2					1	1		
culturas totais			302	7	5	13	20	77	147	33

4.3.2. Inibição do crescimento de fungos filamentosos por NaCl e filtragem

Na tabela 21 está apresentada a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC .g⁻¹ mf) de fungos filamentosos e leveduras em meio BIL-agar com concentrações de NaCl de 0, 3, 4, 5 e 6 %. Na figura 17, pode ser observado o a inibição do crescimento nas diferentes concentrações de NaCl testadas Na diluição de 10⁻³, onde 0,1 mg de solo foi inoculado por placa, a quantidade de colônias foi muito baixa e por isso não foi utilizado na análise (Tabela 21). As diluições 10⁻¹ e 10⁻² foram tratadas como experimentos independentes e os dados foram analisados por Análise de Variância. As tabelas destas análises estão nos anexos.

Tabela 21: Unidades formadoras de colônias (UFC . g⁻¹mf) de fungos filamentosos (f.f.) e leveduras nas diferentes concentrações de NaCl no meio e com diferentes diluições da extração do solo, e relação entre as duas contagens.

Diluições (quantidade de solo por placa)	[NaCl] em %	fungos filamentosos UFC . g ⁻¹ mf	leveduras UFC . g ⁻¹ mf	Relação f.f./ leveduras
10 ⁻¹ (10 mg)	0	5,6 (± 9,1) .10 ³	5,7 (± 2,1) .10 ²	0,10
	3	8,5 (± 3,6) .10 ³	6,3 (± 4,2) .10 ²	0,07
	4	7,5 (± 5,7) .10 ³	7,3 (± 2,3) .10 ²	0,10
	5	7,6 (± 5,9) .10 ³	6,7 (± 1,2) .10 ²	0,09
	6	8,6 (± 4,5) .10 ³	6,3 (± 0,6) .10 ²	0,08
10 ⁻² (1 mg)	0	2,6(± 3,8) .10 ⁴	6,0 (± 5,2) .10 ³	0,22
	3	3,1 (± 6,4) .10 ⁴	0,3 (± 0,6) .10 ³	0,04
	4	2,6 (± 6,4) .10 ⁴	1,7 (± 0,6) .10 ³	0,06
	5	2,6 (± 1,5) .10 ⁴	2,0 (± 1) .10 ³	0,06
	6	1,7 (± 2,5) .10 ⁴	1,0 (± 0) .10 ³	0,07
10 ⁻³ (0,1 mg)	0	7,7 (± 2,9) .10 ⁴	1,0 (± 0) .10 ⁴	0,13
	3	5,7 (± 0,6) .10 ⁴	0,7 (± 0,6) .10 ⁴	0,12
	4	5,0 (± 2,3) .10 ⁴	nd	-
	5	3,0 (± 0,6) .10 ⁴	nd	-
	6	2,0 (± 0,6) .10 ⁴	nd	-

* média de três repetições seguidas de seu desvio padrão; nd – não determinado.

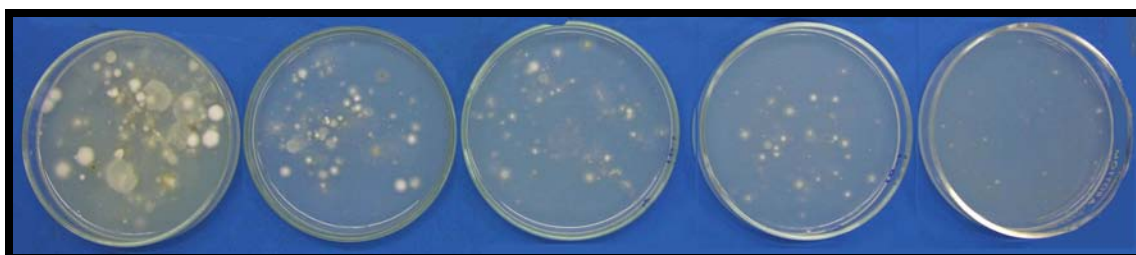


Figura 17: Crescimento, após 72 horas, das colônias de levedura e fungos filamentosos de 10 mg de solo em meio BIL-agar, da esquerda para a direita 0, 3, 4, 5 e 6 % de NaCl .

Nos experimentos em que foi utilizado a filtração e o sal a 3 % no meio (Tabela 22), conseguiu-se diminuir a velocidade de desenvolvimento micelial, 120 h após a inoculação, em mais de 50 % quando inoculado 10 mg de solo por placa (diluição 10^{-1}) e em mais de 60 % com inóculo de 1 mg (diluição de 10^{-2}) quando comparado ao tratamento controle (sem filtração e sem sal).

Além da utilização do NaCl como inibidor foi avaliada também a influência da filtração na extração das células. Os dados da tabela 23 mostram a inibição do crescimento micelial com a utilização da filtração em papel e as concentrações de 3 e 6 % de NaCl em relação aos tratamentos sem sal e sem filtração. A análise da variância dos dados mostrou que há diferença significativa entre os tratamentos, entre pelo menos duas concentrações de NaCl, entre a utilização ou não da filtração e entre quantidades do material inoculada tanto em 72 quanto em 120 h após o plaqueamento.

Tabela 22: Valores percentuais de ocupação da superfície da placa de Petri pelo crescimento micelial de fungos em 72 e 120 horas a 26 ± 2 °C, com três concentrações de NaCl 0 % (controle), 3 % e 6 %.

Filtração*	%[NaCl]	Porcentagem de ocupação**	
		72horas	120 horas
sem filtração	0	81,9 ^A ± 5,0	100 ^A ± 0,0
	3	33,3 ^{AB} ± 1,0	85,3 ^A ± 5,4
	6	2,96 ^B ± 1,5	26,5 ^C ± 4,1
filtro de papel	0	50,3 ^{AB} ± 7,2	94,3 ^A ± 6,5
	3	5,58 ^{AB} ± 14,6	48,9 ^B ± 13,1
	6	0,58 ^B ± 1,6	12,6 ^D ± 1,3

* - A suspensão de solo foi inoculada sem filtração e filtrada com filtro de papel. ** - Os valores de ocupação são médias de três observações, valores seguidos de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Na tabela 24 estão os dados de ocupação da superfície das placas de Petri por fungos filamentosos, após 72 horas de incubação, no experimento em que foi avaliado o efeito da filtração da extração de células por dois filtros e 0, 3 e 6 % de NaCl acrescidos ao meio BIL-agar. A porcentagem de ocupação da superfície da placa de Petri variou de 80,6 % no tratamento sem sal e sem filtração até 0,1 % no tratamento com 6 % de sal e filtração em papel. Não houve diferença significativa a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey entre os tratamentos filtrados e o não filtrado. Apenas entre as concentrações de NaCl no meio é que o teste indicou diferença significativa. Os valores de ocupação com 3 % de sal foram de 13,9 % sem filtração, 3,5 % com filtro de papel e 9,1 % com filtração com a peneira granulométrica.

Tabela 23: Valores percentuais de ocupação da superfície da placa de Petri pelo crescimento micelial de fungos, 72 horas após a inoculação, em meio com três concentrações de NaCl 0 % (controle), 3 % e 6 %.

Filtragem*	% NaCl	Percentagem de ocupação após 72 horas **	
sem filtragem	0	80,6 ^A	± 3,5
	3	13,9 ^{BCD}	± 1,4
	6	0,5 ^E	± 0,1
filtro de papel	0	35,0 ^{ABC}	± 11,6
	3	3,5 ^D	± 0,3
	6	0,1 ^E	± 0,1
filtro (34 µm)	0	70,2 ^{AB}	± 17,9
	3	9,1 ^{CD}	± 1,5
	6	0,3 ^E	± 0,3

* - A suspensão de solo foi inoculada sem filtragem, filtrada com filtro de papel e com peneira granulométrica de 34 µm. ** - Valores de ocupação são médias de três observações, valores seguidos de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

4.3.3. Teste de meios de cultura para isolamento

A quantidade de colônias de leveduras observadas nos testes dos diferentes meios de culturas para espalhamento em placa variou entre 1,3 a 20 colônias para 10 mg de solo por placa e de 1,3 a 6,5 para 1 mg de solo por placa (Tabela 25). No meio BIL-s as colônias tiveram dificuldade em se desenvolver e possuíam tamanho muito pequeno, quando inoculado 10 mg de solo por placa não foi possível contar a quantidade de colônias formadas. Também, não foi possível observar colônias de leveduras nem crescimento de fungos filamentosos nos meios BIL-bz, BIL-cpr, BIL-fr. Em alguns meios houve grande crescimento de fungos filamentosos, BIL, BIL-lc, BIL-ml, BIL-ct, YNB, YM, GPA e Wort. A quantidade média de colônias de leveduras observadas nos meios com crescimento ficou em 9,7 colônias para 10 mg de solo e 3,8 para 1 mg.

Nos testes de avaliação dos diferentes meios de enriquecimento foi possível observar 24 tipos diferentes de colônias de acordo com as características avaliadas (Tabela 26). Os tipos de colônias encontrados para cada enriquecimento, após o estriamento do cultivo em placas com meio BIL-em e BIL estão enumerados na tabela 27. Os enriquecimentos G, GE, XL, CTS e MLS renderam maior quantidade de tipos diferentes de colônia.

Tabela 24: Crescimento de fungos filamentosos e unidade formadora de colônias (UFC) de leveduras nos diferentes meios sólidos testados. Os valores são médias de quatro repetições seguidos pelo seu desvio padrão. A composição dos meios utilizados está descrita na tabela 2.

Meios Sólidos	Intenso crescimento micelial	UFC de leveduras por placa	
		10 mg de solo	1 mg de solo
BIL	+	10,3 ±4,8	6,5 ±4,4
BIL-s	-	nd -	7,0 ±5,6
BIL-em	-	12,8 ±1,9	2,0 ±0,8
BIL-bz	-	nd -	nd -
BIL-cpr	-	nd -	nd -
BIL-pr	-	20,0 ±3,8	1,3 ±1,9
BIL-ac	-	13,0 ±1,8	2,8 ±1,0
BIL-fr	-	nd -	nd -
BIL-lc	+	10,3 ±2,9	1,8 ±1,3
BIL-ox	-	11,8 ±3,0	2,3 ±2,5
BIL-ml	+	10,8 ±1,9	4,3 ±2,4
BIL-ct	+	9,0 ±0,8	3,0 ±1,4
YNB	+	1,3 ±1,5	6,0 ±2,2
YM	+	9,8 ±2,4	5,3 ±3,8
YM-s	-	10,5 ±4,0	1,8 ±1,0
GPA	+	7,0 ±3,7	5,8 ±2,2
GPA-s	-	7,0 ±3,7	6,0 ±5,6
W	+	14,8 ±3,9	2,8 ±1,9
W-s	-	7,8 ±2,2	1,8 ±1,0

nd – não detectado; BIL – base de isolamento de levedura; NaCl 4 % -s; eosina e azul de metileno - em; ác. benzóico - bz; sulfato de cobre -cpr; ác. propiônico -pr; ác. acético ac; ác. fórmico -fr; ác. láctico -lc; ác. oxálico - ox; ác. málico -ml; ác. cítrico - ct; W – meio Wort.

Tabela 25: Tipos de colônias de leveduras de amostra de terra de cultivo de milho encontrados nos meios BIL (tipos I a VII e XXV a XXX) e BIL-em (VIII a XXIV) e suas características morfológicas expressas nestes meios.

tipo	I	II	III	VI	VII	VIII	X	XI
Colônia								
Borda	reg	reg	irr	irr	reg	reg	reg	reg
Superfície	lisa	lisa	rug	rug	lisa	rug	lisa	lisa
Brilho	muito	Fosco	pouco	pouco	pouco	pouco	pouco	muito
Forma	esfera	oval	oval	oval	esfera	esfera	esfera	oval
Cor	branca	branca	creme	branca	creme	vinho	vinho	vermelho
Op./transl.	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca
Filamentosos	não	não	não	não	não	não	não	não

tipo	XII	XIII	XV	XVIII	XIX	XX	XXI	XXII
Colônia								
Borda	reg	reg	irr	reg	reg	reg	reg	reg
Superfície	lisa	rug	rugosa	rug	Lisa	lisa	lisa	lisa
Brilho	pouco	fosco	muito	metálico	pouco	pouco	muito	muito
Forma	esfera	oval	oval	oval	esfera	esfera	achatada	círculos concentri
Cor	roxo	rosa	vermelho	vermelho	rosa	vermelha	vermelha	cos
Op./transl.	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	rosa
Filamentosos	não	não	não	não	não	não	não	opaca

tipo	XXIII	XXIV	XXV	XXVI	XXVII	XXVIII	XXIX	XXX
Colônia								
Borda	reg	reg	reg	reg	irr	Reg	reg	reg
Superfície	rug/	lisa	rug	lisa	rug	lisa	rugosa	lisa
Brilho	brilho	brilho	fosco	pouco	pouco	fosco	muito	muito
Forma	oval	esfera	pouca	cônica	cônica	esfera	esfera	esfera
Cor	laranja	rosa	branca	branca	creme	preta	marron	laranja
Op./transl.	opaca	trans.	opaca	pontos	opaca	opaca	opaca	opaca
Filamentosos	não	não	não	na base	não	na base	não	não

reg – regular; irr – irregular, rug – rugosa, trans. – translúcida.

Tabela 26: Tipos de colônias de leveduras isoladas de amostra de terra de cultivo de milho a partir dos diferentes meios de enriquecimento testados quando plaqueados em BIL e BIL-em. Para composição dos meios ver Tabela 11 e para identificação do tipo de colônia ver Tabela 26.

meios	I	II	III	VI	VII	VIII	X	XI	XII	XIII	XV	XVIII	XIX	XX	XXI	XXII	XXIII	XXIV	XXV	XXVI
G	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
GO	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
GOF	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
GE	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
XL	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
XLO	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
BZO	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NA	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
XBZO	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CU	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRO2	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRO5	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LCO	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
ACO	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTO	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MLO	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OXO	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
FRO	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRSO	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LCSO	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACSO	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
CTSO	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
MLSO	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OXSO	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
FRSO	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LC	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
AC	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CT	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ML	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
OX	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
FR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BILS	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
PRS	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
LCS	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
ACS	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
CTS	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
MLS	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
OXS	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
FRS	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- ausência, + presença

4.4. Desenvolvimento de Método de Triagem para Leveduras

Na figura 18 está o crescimento de diversas culturas de levedura no meio BILvbml pH 4,0 após 72 horas de crescimento. Pode ser observado tanto a variação na coloração das colônias quanto em outras características como, produção de filamentos, superfície e brilho das colônias. Notar que a adição do tampão malato 0,5 % permite que as colônias possam alterar o seu pH sem causar variações perceptíveis no pH do meio de cultura. As colônias e uma cultura permanecem inalteradas independente da forma de preparo do inóculo para a triagem. Na figura 19 está o crescimento no meio BILvbml pH 5 após 72 horas de incubação das culturas testadas a partir de diferentes métodos de preparação do inóculo. Para os demais meios testados os resultados foram iguais, ou seja, as colônias foram iguais independente da forma de preparo do inóculo embora houvessem variações de meio para meio de cultura. Na tabela 27 estão fotografias das colônias das diversas culturas de leveduras da coleção do IM-UFRJ utilizadas nos testes dos meios diferenciais para a triagem. Na tabela 28 estão culturas que apresentaram variações intra-específicas nos padrões das colônias nos meios diferenciais utilizados.

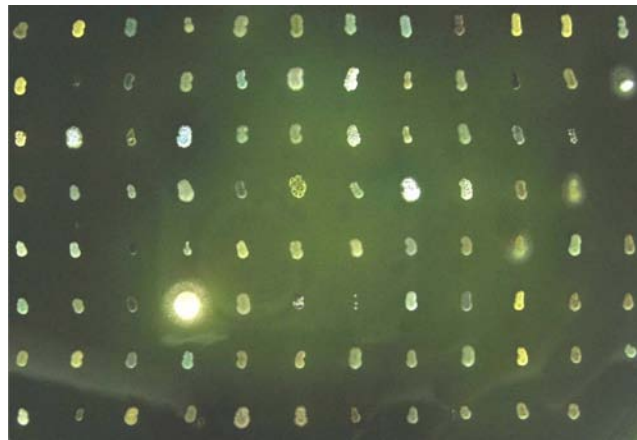


Figura 18: Parte central da placa de Petri com meio BILvbml pH 4,0 mostrando a variação das características de coloração das colônias, após 72 horas de crescimento.

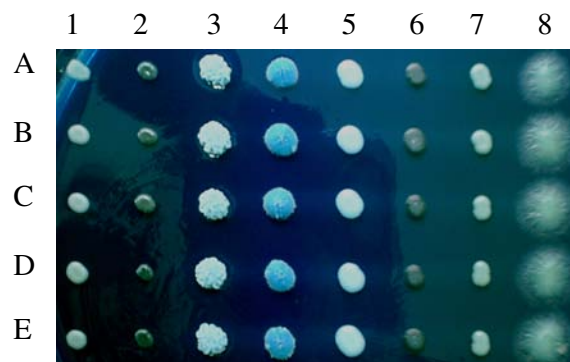


Figura 19: Colônias das culturas 50656 – *Sporopachidermia lactativora* (1), 51707 – *Rhodotorula mucilaginosa* (2), 51534 - *Kodamea ohmeri* (3), J29 - *Pichia membranifaciens* (4), 1081 - *Kluyveromyces* sp. (5), 1148 - *Candida aff. coliculosa* (6), 1082 (7) e 1126 – *Aureobasidium pullulans* (8) crescidas em meio BILvbml pH 5,5 a partir de diferentes métodos de preparação do inóculo, (A) água, (B) caldo BIL, (C) caldo de esgotamento, (D) caldo GYP e (E) caldo de fermentação.

Tabela 27: Características das colônias das culturas de leveduras de 32 espécies pertencentes a 15 gêneros, crescidas nos meios de triagem após 5 dias.

Espécie / código ou nº da cultura na coleção	Meios diferenciais *								GYP 36 °C
	BIL	CMA	YCB uréia (DBB)	BIL_vbml pH 5,5	BIL_vbml pH 4,0	BILem 0,5% el	BILem0,1% el	BILem 0,05% el	
<i>Candida boidinii</i> / P65									
<i>Candida catenulata</i> /51910									
<i>Candida famata</i> / 51388									
<i>Pachysolen tannophilus</i> /50502 ^T									
<i>Candida glabrata</i> / c24									
<i>Candida guilliermondii</i> / 51503 ^T									
<i>Clavispora lusitaniae</i> /51506									
<i>Candida oleophila</i> / P29									
<i>Candida pignaliae</i> / 50201 ^T									
<i>Candida quercitiosa</i> / 50828									
<i>Candida rugosa</i> / 4TB									
<i>Candida sake</i> / J29									
<i>Candida solani</i> / 50234 ^T									
<i>Clavispora lusitaniae</i> / 51506 ^T									
<i>Cryptococcus albidus</i> / P61									
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> / 50369									

continua

Espécie / código ou nº da cultura na coleção	Meios diferenciais *								
	BIL	CMA	YCB uréia (DBB)	BIL.vbml pH 5,5	BIL.vbml pH 4,0	BILem 0,5% el	BILem0,1% el	BILem 0,05% el	GYP 36 °C
<i>Debaryomyces occidentalis</i> / 51798									
<i>Dipodascus captatus</i> / J32									
<i>Geotrichum sp.</i> / 50400									
<i>Isaschenkia orientalis</i> / 50449 ^T									
<i>Kluyveromyces lactis</i> / 51891									
<i>Kodamea ohmeri</i> / 51534									
<i>Pichia anomala</i> / 50407									
<i>Pichia pjiperi</i> / 5PS									
<i>Rhodotorula glutinis</i> / 50793									
<i>Rhodotorula minuta</i> / 50590									
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> / 51707 ^T									
<i>Sporopachidermia lactativora</i> / 50656 ^T									
<i>Torulaspora delbrueckii</i> / J40									
<i>Yarrowia lipolitica</i> / 50678 ^T									
<i>Zygoascus helenicus</i> / 6SB									

* Meios diferenciais: BIL – base de isolamento de levedura, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de glicose; CMA – agar, extrato de milho; YCB uréia – base de fontes de carbono para levedura, uréia, fucsina; vb – verde de bromocresol, ml – malato 0,5%; em – eosina e azul de metileno; GYP – glucose, extrato de levedura, peptona, agar. Para uma descrição mais detalhada sobre referências, composição e preparação destes meios ver nos anexos. ^T – culturas *typo*.

Tabela 28: Padrão de características das colônias de diferentes culturas das espécies *Candida sake*, *C. krusei*, *C. oleophila*, *C. rugosa*, *C. valida* e *Saccharomyces cerevisiae* nos meios de cultura utilizados na triagem dos isolados.

Espécie	código e nº na coleção do IMUFRJ	Meios diferenciais *								
		BIL	CMA	YCB uréia (DBB)	BIL,vbml pH 5,5	BIL,vbml pH 4,0	BIL,em 0,5% el	BIL,em 0,1% el	BIL,em 0,05% el	GYP 36°C
<i>Candida sake</i>	P63									
	J29									
<i>Candida krusei</i>	P92									
	1TC									
	50148 ^T									
<i>Candida oleophila</i>	1TC									
	P32									
<i>Candida rugosa</i>	P29									
	4PD									
<i>Candida valida</i>	4TB									
	51629									
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5SB									
	3SC									
	50606									

* Meios diferenciais: BIL – base de isolamento de levedura, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de glicose; CMA – agar, extrato de milho; YCB uréia – base de fontes de carbono para levedura, uréia, fucsina; vb – verde de bromocresol, ml – malato 0,5%; em – eosina e azul de metileno; GYP – glucose, extrato de levedura, peptona, agar. Para uma descrição mais detalhada sobre referências, composição e preparação destes meios ver nos anexos. ^T – culturas *typo*.

4.5. Validação da Metodologia de Triagem






















Os 70 isolados da amostra de milho puderam ser separados em 11 grupos distintos de acordo com o padrão das características das colônias nos diferentes meios de triagem (Tabela 29). Os isolamentos que mais se repetiram foram os demonstrado pelo padrão do isolado 006, com 19 isolamentos, e em seguida pelo padrão do isolado 120, com 4 repetições. Os padrões que apareceram apenas uma vez foram os dos isolados 047, 033, 015, 045, 075 e 089. Enquanto que os demais foram observados duas vezes. Com esta metodologia de triagem foi possível agrupar os iniciais 70 isolados em 11 grupos, reduzindo em mais de 50 % a quantidade de isolados para serem identificados por metodologia convencional de análise fenotípica.

Tabela 29: Agrupamento dos isolados de levedura de amostra de solo de milho (29 A) e sedimento de mangue (29 B). Na coluna da direita estão os isolados que apresentaram o mesmo padrão de crescimento das colônias nos meios de triagem, e na coluna da esquerda os agrupamentos realizados com os dados (ver anexo) dos testes classificação convencional fenotípica (YARROW, 1998).

29 A (milho)	Meios diferenciais *									Classificação convencional fenotípica em placas réplica e identificação por Kurtzman e Fell (1998)	Isolados com o mesmo perfil fisiológico	
	isolado	BIL	CMA	YCB uréia	BILvbml pH 5,5	BILvbml pH 4	BIL em 0,5% el	BIL em 0,1% el	BIL em 0,05% el			GYP 36°C
036/ 080/ 081	081							n	n		<i>Torulaspota delbrueckii</i>	008/ 036/ 080/ 081
001/ 004/ 012/ 020/ 083/ 084/ 091/ 097/ 100/ 102	100										<i>Williopsis saturnus</i>	001/ 010/ 012/ 020/ 028/ 056/ 075/ 083/ 084/ 091/ 097/ 100/ 102
032/ 044/ 061	044										<i>Candida tropicalis</i>	032/ 044/ 061
002/ 003/ 009/ 033/ 055/ 060/ 101	033										<i>Geothricum sp.</i>	002/ 003/ 009/ 033/ 055/ 060/ 101
006/ 008/ 011/ 013/ 026/ 035/ 041/ 043/ 046/ 047/ 052/ 057/ 092/ 094/ 096/ 103/ 104	006										<i>Pichia membranifaciens</i>	006/ 008/ 011/ 013/ 026/ 035/ 041/ 043/ 046/ 047/ 052/ 057/ 058/ 059/ 073/ 082/ 088/ 092/ 094/ 096/ 103/ 104
058/ 059/ 073/ 082	058							n	n			
007/ 029/ 040/ 072/ 077	040										<i>Candida intermedia</i>	007/ 029/ 040/ 045/ 072/ 077

29 A (milho)		Meios diferenciais *								Classificação convencional fenotípica em placas réplica e identificação por Kurtzman e Fell (1998)	Isolados com o mesmo perfil fisiológico	
Isolados com o mesmo padrão de colônias	isolado	BIL	CMA	YCB uréia	BILvbmI pH 5,5	BILvbmI pH 4	BIL em 0,5% el	BILem 0,1% el	BILem 0,05% el			GYP 36°C
030/ 050/ 063 /098	098										<i>Rhodotorula</i> sp.	030/ 050/ 063 /098
005/ 085	085							n	n		n.a.	n.a.
004/ 010/ 014/ 015/ 016/ 018/ 019/ 022/ 023/ 025/ 027/ 028/ 045/ 048/ 053/ 056/ 062/ 067/ 074/ 075/ 076/ 079/ 088/ 089	isolados de milho não agrupados pela triagem								isolados de milho não agrupadas na réplica	004/ 005/ 014/ 015/ 016/ 018/ 019/ 022/ 023/ 025/ 027/ 048/ 053/ 062/ 067/ 074/ 076/ 079/ 085/ 089/ 096		

29 B (mangue)		Meios diferenciais *								Classificação convencional fenotípica em placas réplica e identificação por Kurtzman e Fell (1998)	Isolados com o mesmo perfil fisiológico	
Isolados com o mesmo padrão de colônias	isolado	BIL	CMA	YCB uréia	BILvbmI pH 5,5	BILvbmI pH 4	BIL em 0,5% el	BILem 0,1% el	BILem 0,05% el			GYP 36°C
s001/ s005	s001							n	n		<i>Candida guilliermondi</i>	s001/ s002/ s003/ s005/ s017/ s023/ s038/ s039
s006/ s007	s006							n	n		<i>Candida aff. guilliermondi</i>	s006/ s007

29 B (mangue)		Meios diferenciais *								Classificação convencional fenotípica em placas réplica e identificação por Kurtzman e Fell (1998)	Isolados com o mesmo perfil fisiológico	
Isolados com o mesmo padrão de colônias	isolado	BIL	CMA	YCB uréia	BIL ybml pH 5,5	BIL ybml pH 4	BIL em 0,5% el	BIL em 0,1% el	BIL em 0,05% el			GYP 36°C
s017/ s023/ s037/ s038/ s039	s037							n	n		n.a.	n.a.
s028/ s026	s028							n	n		<i>Debaryomyces aff. hansenii</i>	s028/ s026
s009/ s010/ s011/ s012/ s013/ s014/ s017/ s018/ s020/ s021/ s022/ s023/ s024/ s025/ s026/ s027	s009							n	n		<i>Debaryomyces hansenii</i>	s009/ s010/ s011/ s012/ s013/ s014/ s017/ s018/ s019/ s020/ s021/ s025/ s026/ s027/ s029/ s030/ s031/ s033/ s035/ s036
s002/ s003/ s004/ s008/ s015/ s016/ s019/ s032/ s034	isolados de amostras de mangue não agrupadas pela triagem.								não agrupadas na réplica		s004/ s008/ s015/ s016/ s019/ s022/ s024/ s032/ s034/	

n.a. - não pode ser observado grupo correspondente nos testes fisiológicos.

n – sem imagem para os meios BIL em 0,1 e 0,05% de extrato de levedura.

* Meios diferenciais: BIL – base de isolamento de levedura, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de glicose; CMA – agar, extrato de milho; YCB uréia – base de fontes de carbono para levedura, uréia, fucsina; vb – verde de bromocresol, ml – malato 0,5%; em – eosina e azul de metileno; GYP – glucose, extrato de levedura, peptona, agar. Para uma descrição mais detalhada sobre referências, composição e preparação destes meios ver nos anexos.

5. DISCUSSÃO

5.1. Diversidade de Leveduras em Cana-de-Açúcar

O balanço hídrico climatológico é uma forma de monitorar o armazenamento da água no solo, indicando historicamente a oferta de água durante o ano. Estas informações foram utilizadas para orientar a época de coleta das amostras onde teríamos condições contrastantes de oferta de água. Para os dados meteorológicos, as informações são disponibilizadas em tabelas para todos os parâmetros meteorológicos e coletadas a cada hora pela estação e ficam disponíveis por 90 dias. Conforme dados do balanço hídrico da estação meteorológica Ecologia Agrícola - INMET, na região da coleta, o mês de setembro se caracteriza por ser o final do período de déficit hídrico e o mês de janeiro como a metade do período de excesso de água no solo. Os dados meteorológicos do ano 2007/2008 da mesma estação, confirmaram a tendência demonstrada pelos dados históricos. Na coleta de setembro de 2007 as plantas de cana-de-açúcar apresentavam sinais de crescimento atrasado, diminuição da área foliar total em resposta ao longo período sem chuvas. Foi observada também a presença apenas de raízes secas até a profundidade amostrada. Em janeiro, o crescimento das plantas ainda se mostrava bastante atrasado, mas houve aumento da área foliar das plantas em relação ao período da primeira coleta e raízes novas e ativas foram observadas e coletadas.

Neste trabalho foram assumidas as limitações do método de contagem em placa para fornecer uma quantificação exata das populações ativas presentes nas amostras. A quantidade e a qualidade de nutrientes, a interação entre as populações e o próprio espaço físico da placa de Petri, limitam maiores extrapolações sobre a quantidade dos indivíduos. Ainda assim, para comparação entre amostras e resumindo as conclusões ao que pode ser observado, esta metodologia foi válida.

As contagens das populações de levedura dos compartimentos de rizoplano e filoplano foram maiores no período de coleta de janeiro de 2008 comparadas com as observadas em setembro. Para os dois compartimentos elas aumentaram em uma ordem de grandeza. Estas populações aumentaram quando houve um aumento da oferta de água no sistema. Porém, o mesmo não ocorreu na população observada no solo, esta se manteve estável, indicando que os organismos observados podem ter relação com a atividade metabólica da planta e não apenas simplesmente com a oferta de água.

Para as contagens de fungos filamentosos não houve grandes alterações entre o período de seca e o de chuva, pelos dados obtidos de contagem de UFC por grama de matéria fresca (g^{-1}mf) nos compartimentos amostrados. Embora, tenha sido observada uma contagem um pouco menor no período chuvoso. Possivelmente, esta diminuição na contagem ocorre pela diminuição no número de esporos, devido a retomada do metabolismo observado no sistema no período de chuva. Apesar da maior parte da biomassa de fungos filamentosos estarem na forma de hifas espera-se que a maior quantidade de propágulos esteja nos esporos. As contagens podem diminuir quando os fungos estão ativos devido a menor investimento em estruturas de reprodução. Ciclos de crescimento vegetativo e esporulação acompanhando os períodos de chuva e seca em cana-de-açúcar são conhecidos para *Neurospora intermedia*, um fungo do Subfilo *Pezyzomicotina* (PANDIT e MAHESHWARI, 1996).

As maiores diferenças entre as populações deste organismo estão na comparação entre os compartimentos. A população é sempre maior no rizoplano, na ordem de grandeza de 10^5 por grama, não importando o período. No solo e no filoplano, a população variou entre as ordens de grandeza de 10^3 e 10^4 UFC . g^{-1}mf . Nas contagens das populações de fungos filamentosos por plaqueamento parte das colônias pode ser originada de esporos. Portanto, este tipo de contagem não expressa necessariamente a população ativa deste organismo. Uma

vez que as hifas são a parte metabolicamente ativa, enquanto os esporos são considerados estruturas de multiplicação ou resistência. Para as leveduras, este tipo de contagem pode fornecer números mais realistas sobre a população ativa presente nas amostras, ainda que algumas possam esporular e estar na forma de estruturas de resistência.

Os valores de contagem no meio BIL-em são ligeiramente mais baixos para os fungos quando comparados aos valores obtidos nos outros meios. Para a contagem de leveduras em alguns casos ele foi o meio em que se pôde obter as maiores contagens, como em rizoplano e solo no período seco, porém, em outras amostras a contagem também foi a menor entre os meios testados. Assim, percebe-se a influência dos corantes utilizados, da menor quantidade de nutrientes orgânicos ou da ação conjunta deste dois fatores presentes na composição do meio BIL-em em comparação com o YM e o PDA.

Resultado semelhante foi obtido por Carvalho (2007) ao utilizar o ácido benzóico na concentração 0,01 % no meio BIL com xilose 0,5 % como fonte principal de carbono, nestas condições nenhuma levedura pode ser isolada. Porém, quando neste mesmo trabalho foi utilizado o meio BIL com glicose 0,5 % e ácido benzóico nas concentrações de 0,01 e 0,1 % para isolamento de leveduras de amostras de sedimento de mangue esta inibição não foi observada. A quantidade de espécies, obtidas com 0,1 % de ácido benzóico no meio, foi baixa, mas puderam ser isolados *Candida krusei* e *Kloeckera apis*. No enriquecimento com 0,01 % puderam ser isoladas duas espécies, *Candida rugosa* e *Candida robusta*, que não foram observadas nos demais meios de um conjunto de 8 meios de enriquecimento. Nos testes de avaliação do rendimento dos meios (Tabela 26), do enriquecimento com 0,1 % de ácido benzóico pode ser observado poucos tipos de colônias. Mesmo assim este meio foi escolhido por possuir um agente inibitório que poderia permitir o crescimento de populações de leveduras resistentes a compostos fenólicos. Na estratégia de isolamento utilizada nesta tese este meio renderia poucas culturas, mas ter-se-ia mais chances de isolar organismos diferentes. Porém, nenhuma cultura de levedura foi obtida com esta estratégia.

Ainda assim, as utilizações do ácido benzóico 0,1 % em meio BIL com 0,5 % de glicose nos testes de meio desta tese e por Carvalho (2007) indicam que as leveduras podem crescer nesta concentração, não sendo este o motivo para não ter sido observado leveduras nas duas coletas do estudo em cana-de-açúcar. Uma explicação para isto seria um ajuste ineficiente do pH. Carvalho (2007) observou que, na inibição de leveduras, por ácido benzóico e outros ácidos orgânicos, para uma mesma concentração do inibidor a inibição era mais intensa nos valores mais baixos de pH. Para o ácido benzóico na concentração de 0,1% no meio de cultura, variações de 0,5 unidade de pH são suficientes para promover grande variação na resposta. Entre os valores de 4,5, 5,0 e 5,5 foram obtidas as maiores diferenças, das 87 estirpes testadas, respectivamente 85, 74 e 42 não formaram colônia. É possível que uma observação não cuidadosa do valor de pH do meio de enriquecimento com ácido benzóico tenha promovido a inibição das leveduras. Para o ácido propiônico Carvalho (2007) obteve resultados similares mas em menor intensidade.

Os demais meios utilizados nesta tese tiveram o rendimento satisfatório e de acordo com o que havia sido obtido anteriormente nos testes de meios. Os meios sólidos apresentaram grande crescimento de fungos filamentosos embora o meio BIL-em tenha demonstrado uma relativa capacidade de retardar este crescimento. Como, neste meio, o crescimento micelial estava menor foi feita a opção de realizar inicialmente os isolamentos nos outros dois meios, e iniciar o isolamento no BIL-em posteriormente, quando já tivesse sido realizado pelo menos uma parte dos outros meios, onde havia um vigoroso crescimento micelial. Porém, não foi possível retomar os isolamentos do meio BIL-em devido ao volume de trabalho gerado pelos demais isolamentos e suas purificações. Na segunda coleta, isolamentos neste meio só foram realizados quando os números de isolados dos demais meios sólidos foram baixos.

Ainda é necessário realizar outros testes para atribuir mais confiança aos dados de assimilação obtidos utilizando o meio BIL (CARVALHO, 2007) como base para testes de assimilação e o carimbo de 96 pinos como inoculador. Mas, para a discussão desta tese para os testes iniciais de assimilação de xilose, maltose, lactose e mio-inositol foi assumido 10 % de probabilidade de erro. Uma vez que o corante utilizado na formulação do meio para o teste DBB-urease não se mostrou adequado, não foi possível diferenciar os isolados pertencentes aos Ascomycetos e aos Basidiomicetos nesta etapa, as características gerais dos isolados serviram com uma indicação de que a maior parte dos isolados de filoplano possuem características das leveduras basidiomicéticas enquanto a maior parte dos isolados de rizoplano apresentam características das leveduras ascomicéticas (Tabela 16 e Figura 8).

O teste de atividade micocinogênica foi preliminar não sendo efetuado um ajuste dos estado de crescimento das culturas inoculadas com a cultura alvo. O crescimento da cultura alvo estava em fase exponencial quando foi aplicado na placa para a formação do “tapete” de células alvo, porém as culturas testadas vieram dos tubos de fermentação em estado estacionário de crescimento. Para verificar a expressão desta característica o ideal é que as condições de crescimento das culturas estejam equiparadas e em fase exponencial. Portanto, é possível que haja mais culturas com esta atividade nesta coleção, que não puderam ser detectados pelas condições utilizadas. Como por exemplo para *Williopsis saturnus*, espécie que comumente apresenta atividade micocinogênica e, que, os isolados obtidos pertencentes a esta espécie foram negativos para esta característica no teste realizado. Nestas condições os isolados que apresentaram atividade micocinogênica representaram 5% do total de culturas obtidas. Esse valor é menor do que o observado por Stumm et al. (1977) em levantamento focalizado para o estudo desta característica em amostras ambientais (frutos, flores e solos), onde foi encontrada proporção de 17% de isolados micocinogênicos entre as leveduras isoladas. Porém, Vital et al. (2002) em solos da região amazônica, encontraram esta atividade em apenas 2,5% de um total de 240 isolados.

As análises dos dados presentes na tabela 18 levaram em consideração as características dos dois tipos de isolamento, espalhamento em placa e enriquecimento. De forma que, para uma determinada amostra, o táxon observado, apenas em isolamento de enriquecimento, mas não no de espalhamento em placa foi considerado como presente na amostra, porém com população reduzida. A frequência dos táxons nos dois protocolos de isolamento foi utilizada para inferir a dominância. Neste experimento isto pode ser observado em especial para os táxons de ascomycetos, em diversas amostras espécies deste grupo só ou preferencialmente apareceram através de enriquecimento, demonstrando um possível favorecimento nos isolamentos de ascomycetos pelo uso destes meios.

Os táxons que estavam presentes na amostra, observados no espalhamento em placa, mas não apareceram nos enriquecimentos, foram consideradas populações inibidas por este protocolo e foram distinguidos dois grupos em que isto acontecia. Um grupo, formado pelos táxons que, independente da amostra e período, não apareceram ou raramente apareceram nos enriquecimento, mas foram isolados por espalhamento em placa. Entre estes estão *C. aff. azyma*, *C. incommunis*, *B. aff. coprosmaensis*, *C. gilvoscens*, *C. podzolicus*, *C. flavus*, *O. externus*, *R. marina.*, *R. aff. marina*, *P. aff. pruni*, *P. jejuensis*, *Prototheca wickerhamii* e diversos táxons de *Cryptococcus* e *Pseudozyma* não identificados. Se estes táxons aparecem na placa com 100 µL de inóculo e não se pode recuperá-los nos enriquecimentos, aonde foi aplicado 1 ml, então, definitivamente, estas espécies não foram capazes de estabelecer populações nos enriquecimentos utilizados.

O segundo grupo é formado por táxons que foram isolados tanto por espalhamento em placa quanto por enriquecimento, mas que em algumas amostras só foram observados a partir do espalhamento. Os exemplos em ascomycetos são os isolamentos de *C. aff. tsuchiyae* em raiz e solo no período úmido, e *C. aff. colliculosa* no solo, no período seco. Para os

basidiomicetos embora tenha ocorrido em alguns poucos táxons está mais explícito para *T. aff. globispora* para as amosras de raiz e solo no período úmido. A observação destes dados leva a questionamentos como: se o táxon está presente na amostra, isolado em placa, e também pode ser isolado por enriquecimento em outra amostra, demonstrando que não havia uma impossibilidade intrínseca do meio de cultura para que este táxon estabelecesse sua população, então, por que em algumas amostras não pode se estabelecer nos enriquecimentos? O que poderia impedir o crescimento, neste meio, em algumas amostras e em outras não?

Uma explicação possível para esta observação seria um aumento na competição entre as espécies presentes na amostra do período úmido, uma vez que neste período pode ser observado um maior número de táxons. Ou, a presença de determinada espécie na amostra o que poderia indicar uma competição específica. Dos táxons presentes nas amostras em que isto aconteceu, e que não estavam nas demais amostras onde por enriquecimento puderam ser obtidos *C. aff. tsuchiyae* e *T. aff. globispora*, foi conseguido mapear a presença dos táxons de *W. saturnus*, *C. krusei* em raiz e solo, e *T. globosa* apenas em solo. Estes poderiam inibir as espécies anteriores. Porém, testes de inibição diretos entre os isolados devem ser realizados para definir melhor se este tipo de inibição aconteceu. Na tabela 18 não se pode ter a idéia correta sobre esta interação, pois os dados das repetições não estão separados e este estudo deve ser feito para cada repetição das amostragens onde isto foi observado.

A seguir é feita a descrição das comunidades de leveduras encontradas:

a) No solo:

Os táxons dominantes encontrados em pelo menos três amostras de solo no período seco foram *C. podzolicus*, *C. laurentii*, *P. caribbica*, *T. globosa* e *Pseudozyma* sp. 3. Os comuns, isto é os que apareceram em metade das amostras, foram *L. aff. decumbens*, *C. aff. laurentii* e *Cryptococcus* sp. 3. Mais 14 táxons apareceram nesta amostragem em baixa frequência, apenas uma vez, sendo nove de basidiomicetos, quatro de ascomicetos e um de *Prototheca wickerhamii*. Com relação ao solo no período chuvoso foi verificada a presença dos mesmos táxons dominantes do período seco com exceção de *C. laurentii* e *C. aff. laurentii* que a frequência apareceu diminuída ou só foram isolados do enriquecimento. No período úmido pode ser observado uma diminuição no número de táxons em relação ao período seco, em que vale destacar que esta diminuição ocorreu nos isolamentos efetuados em placa mas não nos de enriquecimento. Esta maior diminuição foi basicamente dos táxons de basidiomicetos que passaram de 26 no período seco para 13 na época da chuva.

Os táxons basidiomicéticos encontrados no solo estão de acordo com o que normalmente é descrito na literatura (Tabela 2). Leveduras do gênero *Cryptococcus* são frequentemente encontradas em solo. *C. podzolicus* foi encontrado por Bab'eva e Reshetova (1975) em floresta e por Maksimova e Chernov (2004) em solo de várzea. Ainda mais frequentemente isolados de solo, são as espécies de *C. albidus* e *C. laurentii* (ver Tabela 2). *C. albidus* não foi identificado entre os isolados, mas *C. laurentii* e uma outra espécie similar, *C. aff. laurentii*, foram dominantes nas amostras de solo de cana-de-açúcar. Porém esta é a primeira vez que o táxon ascomicético *Torulaspora globosa* aparece como dominante em amostras de solo. Leveduras deste gênero são isoladas de solo com relativa frequência mas nunca aparecem como organismos dominantes. Para os táxons menos frequentes encontrados nas amostras de solo, vale destacar *W. saturnus*, *C. aff. tsuchiyae* e *T. aff. globispora* nos dois períodos e *C. aff. coliculosa*, *L. aff. decumbens* e *E. spifera* nas amostras de setembro.

W. saturnus foi relatado como dominante em solo de plantas cultivadas (KVASNIKOV et al., 1975). Em solo, *T. delbrueckii*, teleomorfo de *C. coliculosa*, já foi reportado em média frequência no semi-árido argentino (TORO et al., 2005), frequente por Zambrano e Casas-Campillo (1959) em área tropical e sub-tropical do México, e também como frequente por Capriotti (1962) em solo sub-tropical nos EUA e em região de alta

latitude no Alaska (CAPRIOTTI, 1967). Nestes dois estudos Capriotti utilizou enriquecimento com concentrações de açúcar ajustada para 20%. Estas condições foram diferentes das utilizadas nos enriquecimento nesta tese, e este organismo só pode ser isolado em espalhamento em placa da amostra de solo. Espécies de fungos do gênero *Coniochaeta* e seus anamorfos *Lecythophora* são encontrados em amostras de solo e associados a plantas ou partes de vegetais em diversos estados de decomposição considerados (ROMERO et al., 1999; WEBER, 2002). Apesar de serem estudados por micologistas, as colônias de *Lecythophora* não são muito filamentosas, raramente produzem hifas aéreas, e possuem aspecto mucóide (ver anexo tabela 5), característica macroscópicas que podem confundi-las com colônias de leveduras mais filamentosas. Weber (2002) ressalta que os os conídeos de *Lecythophora* podem formar conídeos secundários por brotamento o que dificulta mais ainda a separação entre os termos levedura e fungo filamentoso.

b) No rizoplano:

Os organismos encontrados no rizoplano em sua maioria são ascomicetos tanto em riqueza como em dominância e isto foi mais evidente quando se passou do período seco para o úmido. Os táxons abundantes no período seco foram *C. laurentii*, *C. podzolicus* e *P. caribbica*. No período úmido os táxons *C. aff. azyma*, *C. cf. sorbophila*, *P. caribbica* passaram a dividir a dominância, ao passo que foi observado uma diminuição da dominância de *C. podzolicus* e *C. laurentii*. Também, como táxons comuns, em setembro, foram encontrados *A. pullulans*, *C. aff. azyma*, *B. aff. coprosmaensis* e *C. aff. laurentii*. Desses táxons apenas *C. aff. azyma* não tem a sua população diminuída na época de chuvas. *C. laurentii*, *C. podzolicus* e *O. aff. externus*, além de *Prothoteca wickerhamii*, aparecem em duas das quatro amostras de raiz do período de chuva.

Como táxons que só apareceram em uma amostra nos dois períodos temos *W. saturnus*, *C. flavescens*, *C. aff. laurentii*, *T. aff. globispora*, *P. jejuensis* e Basidiomiceto sp. 4. Em comparação aos demais compartimentos estudados, o rizoplano demonstrou a maior alteração da estrutura das populações de leveduras encontradas durante os dois períodos amostrados. No período de seca houve domínio dos táxons de afinidade basidiomicética enquanto que no período de chuvas houve um equilíbrio entre a riqueza de táxons encontrados e uma maior frequência dos táxons ascomicéticos.

c) No filoplano:

Este compartimento foi o que apresentou maior número de táxons nos dois períodos. com predomínio de táxons basideomicéticos e a relação dominância deste grupo em relação aos ascomicetos aumentou do período seco para o período úmido, tanto na riqueza quanto na frequência de táxons. Os táxons mais abundantes no período seco foram *A. pullulans*, *B. aff. coprosmaensis*, *C. cellulolyticus* e *P. aff. pruni*. No período úmido, a dominância destes táxons na comunidade passou a ser dividida com diversas espécies do clado *Pseudozyma*, *Pichia caribbica*, *C. aff. gilvescens* e *C. flavus*. Porém, os táxons *C. cellulolyticus* e *B. aff. coprosmaensis* são encontrados em apenas uma amostra no período de chuva. Ainda, como táxons comuns, foram observados *C. nemorosus* e *R. marina* nos dois períodos, *P. caribbica*, *C. aff. luteolus*, *Cryptococcus* sp. 5 somente no período seco.

Das espécies ascomicéticas apenas *P. caribbica* e *A. pullulans* foram observadas frequentemente nas amostras de filoplano. Robbs et al. (1989) verificou o mesmo fenômeno para *C. guilliermondii* em plantio convencional de abacaxi. Sendo que *P. caribbica* e *C. guilliermondii* possuem características fisiológicas semelhantes. *C. sorbophila* foi observada em duas amostras no período seco e em uma no período úmido. *C. bentonensis* e *R. aff. spherocarpum* foram observados apenas uma vez nos dois períodos. Os demais táxons presentes no filoplano foram observados apenas uma vez e em apenas uma coleta.

Os dados da literatura sobre leveduras em rizoplano ou rizosfera são limitados como já relatado na revisão realizada para esta tese. As informações no artigo de Kvasnikov et al. (1975) indicam que em rizosfera foi encontrado dominância de *C. laurentii*, *C. albidus* e *W. saturnus* em plantas agrícolas e *T. cutaneum*, *Debaryomyces* spp., *Hanseniaspora guilliermondii* (= *apiculata*) e *Metschnikovia pulcherrima* em plantas silvestres. Mas, com exceção de *Debaryomyces* spp., estas espécies também estavam dominando o filoplano juntamente com *Rhodotorula* spp.. Não foi possível compreender como foram feitos os isolamentos e as demais condições do estudo (artigo em russo), nem a discussão incitada por estes resultados, mas as populações dominantes encontradas na rizosfera de plantas silvestres, de acordo com os dados das estirpes tipos depositadas no CBS, são fermentativas. Apenas para *Debaryomyces* spp. não se pode ter maiores indicações sobre esta característica pois muitas estirpes, isoladas de clima temperado, não demonstram esta capacidade, que é comum nos isolados deste gênero de clima tropical (HAGLER, comunicação pessoal).

Os resultados obtidos nesta tese, com relação à dominância das leveduras ascomicéticas fermentativas, mas não com relação à diferença entre as populações de filoplano e rizoplano estão de acordo com as informações em Kvasnikov et al. (1975) realizado em espécies de plantas silvestres na Ucrânia. Os autores russos foram os que mais se dedicaram ao estudo de leveduras nas raízes de plantas e as informações, as quais se pode ter acesso através da revisão de Bab'eva e Chernov (1995), são: "... the species composition of yeast population in organic horizons (de solo) and on roots is similar to that in litter or epiphyte complexes." O conceito de complexos de espécies de leveduras a que esta revisão se refere e a distinção entre eles está baseada mais na prevalência de espécies com características correspondentes, do que no substrato em que elas podem ser encontradas. Desta forma, variando a região as espécies podem mudar, mas a ocupação do substrato será feita por espécies correspondentes (que desempenhem a mesma função).

Na frase citada os autores estão relacionando as populações encontradas em raízes aos dois complexos, epifíticos e do folheto. Na revisão de literatura desta tese, em que o texto de Bab'eva e Chernov (1995) foi citado diversas vezes, está a descrição dos autores para as características dos organismos dos complexos das populações fitobiontes e do folheto. Embora, neste conceito, seja admitido que espécies de um complexo possam ser encontradas em nos demais complexos, pois não é uma idéia de estrutura populacional fechada. As espécies características do complexo epifítico são *C. laurentii* e *Sporobolomyces roseus* e outras dos gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula*. Pela diversidade de ambientes epifíticos este complexo admite uma grande variedade de espécies menos frequentes. Para o complexo do folheto há uma mistura de espécies sendo a mais freqüente o *G. pullulans*, neste complexo tanto pode ter espécie do complexo epifítico, acima citadas, quanto do complexo do solo (gênero *Cryptococcus*).

Estranhamente, esta excelente revisão não inclui os trabalhos do grupo ucraniano, com suas leveduras ascomicéticas fermentativas dividindo a dominância do rizoplano com espécies do gênero *Cryptococcus* e *Trichosporum*. Azeredo et al. (1998) apesar de ter encontrado uma dominância basideomicética nas amostras de rizosfera de cana-de-açúcar, relatou que entre as leveduras ascomicéticas encontradas havia a dominância de *D. hansenii*, e diversas espécies menos frequentes, a maioria com apenas um isolamento, *Candida azyma*, *Candida diddensiae-like*, *C. maltosa*, *P. guilliermondii*, *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*. Destas seis espécies menos frequentes observadas por Azeredo et al. (1998) quatro possuem metabolismo fermentativo de acordo com dados de suas estirpes tipos, além de *D. hansenii* já abordado anteriormente. Nesta tese os resultados mostraram uma dominância de *P. caribbica*, *C. aff. azyma* e *C. cf. sorbophila* e a presença de diversas espécies menos frequentes com metabolismo fermentativo (Tabela 18 e Tabela 19) no período úmido houve um aumento

de táxons ascomicéticos, mais quatro, e um aumento na dominância de 15 para 22 com estas características, em relação ao período seco.

A estrutura da população de leveduras descrita por Azeredo et al. (1998) foi diferente da encontrada nesta tese. Os autores observaram uma dominância de leveduras basideomicéticas em rizosfera para um plantio convencional de cana-de-açúcar. O clima da região é semelhante ao da Baixada Fluminense onde fica situado o SIPA, com verão úmido e inverno seco e o período de coleta nos dois trabalhos abrange as situações de seca e oferta de água. Os dois estudos foram semelhantes, mas ainda assim, a estrutura das populações descritas, dominância e mesmo os táxons foram diferentes.

O que poderia ter contribuído para estas diferenças entre os dois estudos foram as seguintes causas: a) o solo do experimento em Campos é mais argiloso em comparação ao do SIPA, embora não haja nenhum trabalho com leveduras neste sentido, para bactérias vários estudos indicam que o tipo de solo é um fator importante e às vezes primordial para determinação das espécies presentes; b) Sistema de plantio: o primeiro realizado em sistema de plantio convencional com irrigação, adubação química com NPK⁸ e por aplicação de compostagem dos resíduos da indústria alcooleira e, este, em sistema orgânico com poucos tratamentos culturais e sem irrigação. Além disso, Azeredo et al. (1998) estudaram amostras de rizosfera e as amostras de raízes não foram lavadas antes da extração das células, indicando que leveduras presentes no solo poderiam participar das populações atribuídas à raiz. Nesta tese, foi realizada amostragem de rizoplano e efetuada a lavagem das raízes para remoção de partículas de terra com o objetivo de diminuir a interferência das populações do solo. No estudo de Azeredo et al. (1998) não foi realizada amostragem no solo o que contribuiria para o entendimento da população basideomicética presente nas amostras de rizosfera.

Apesar da pequena quantidade de estudos realizados para a determinação da diversidade de leveduras no rizoplano utilizando técnicas moleculares. Elas revelaram a presença de espécies diferentes das encontradas nos estudos de isolamento e cultivo (Tabela 4). Mas em sua maioria foram organismos basideomicetos, e nenhum foi capaz de revelar a presença de espécies de leveduras ascomicéticas com características de metabolismo similares as encontradas nesta tese e nos dois trabalhos citados anteriormente. Até agora estas técnicas parecem ser insensíveis a estas populações (Tabela 4).

As espécies ascomicéticas dominantes do rizoplano encontradas nesta tese e nos trabalhos de Kvasnikov et al. (1975) e de Azeredo et al. (1998) não pertencem aos complexos epifíticos e do folheto, quando se aplica o conceito de complexo de espécie utilizado por Bab'eva e Chernov (1995). As características fisiológicas indicam que estas espécies são semelhantes às de outro complexo de espécie citado pelos autores, os humidobiontes. Estes ocupam ambientes úmidos com nutrientes acessíveis e em concentrações relativamente altas. Os ambientes naturais ocupados por estas espécies são néctar de flores, interior de frutos, partes de plantas suculentas e exsudados de árvores. Estes ambientes e as espécies que os ocupam tem sido foco de diversos trabalhos ecológicos. É possível que as raízes possam também fornecer condições para a manutenção de populações de espécies do complexo dos humidobiontes.

As identificações realizadas neste estudo demonstraram que a vários organismos encontrados não puderam ser atribuídos a espécies conhecidas. Assim como as identificações convencionais de alguns organismos encontrados neste estudo são aproximações, devido à carência de dados morfológicos ou a diferença do perfil fisiológico encontrado que pudesse ser encaixado com os perfis das espécies conhecidas. As análises com dados de sequenciamento também demonstraram que muito dos organismos obtidos podem pertencer a espécies novas e alguns a clados distintos dos que são conhecidos atualmente. Por exemplo,

⁸ NPK – sigla para a composição de nutrientes em fertilizante contendo nitrogênio(N), fósforo (P) e potássio (K).

os isolados identificados como *C. aff. drosophilae*, indicaram uma distância entre estas culturas e suas identificações convencionais e pela análise da seqüência da região D1D2, indicou como seqüência mais próxima a de *C. drosophilae* com 87 % de similaridade (Tabela 4, anexos). Embora não haja valores padronizados de similaridade para se considerar os organismos como pertencentes a um mesmo clado filogenético, um organismo cuja seqüência mais próxima está a 87 % de similaridade é considerado altamente divergente em relação às demais espécies conhecidas. Para leveduras, Kurtzman e Robnett (1998) estabeleceram o valor de 99% de similaridade do domínio D1-D2 do LSU-rRNA como o mínimo para se considerar que os organismos são pertencentes a mesma espécie.

Nas análises filogenéticas realizadas para os isolados de ascomicetos e de basidiomicetos, respectivamente figuras 10 e 11, também pode-se observar que muitos isolados possuem sequencias bastantes divergentes das especies conhecidas. Mais de 40 % das espécies obtidas tiveram sequencias com menos de 99% de similaridade com sequencias de culturas *typo* de espécies conhecidas. Mesmo para os isolados com sequencias menos divergentes, poucos foram os que tiveram sequencias idênticas às das estipes *typo* (Tabela 4, anexos). Uma certa divergência entre as sequencias de uma mesma espécie é esperado considerando a variação genética que ela apresenta e a diferença entre populações afastadas. E uma vez que a maior parte das espécies conhecidas foi descrita utilizando isolados do hemisfério norte ou de clima temperado é provável que os isolados obtidos em outras regiões ou ambientes distintos apresentem esta divergência.

Alguns isolados apresentaram sequencias 100% similares as da estipe tipo das espécies, sendo: um isolado de *C. bentonensis*, dois isolados de *C. cellulolyticus*, dois isolado de *C. laurentii*, quatro isolados de *P. caribbica*, um isolado de *P. kudriavzevii* (*I. orientalis*) e um isolado de *Z. meyeræ*. De acordo com as informações no site do CBS (ROBERT et al., 2008) ou do NRRL (USDA/ARS, 2009) respectivamente EUA, Japão, Congo, Cuba, Rússia e China/Grécia foram os locais de isolamento das estirpes *typo* destas espécies. Sendo que para *Z. meyeræ* um isolado da China e outro da Grécia foram utilizados para descrever a espécie após o cruzamento e formação de esporos.

5.2. Otimização das Condições de Extração e da Reação de Amplificação

5.2.1. Extração de ácidos nucleicos

Todas as condições testadas para a extração de ácido nucleico resultaram em material genômico de boa qualidade para as amplificações posteriores das regiões D1-D2 (Figura 12B) e ITS (Figura 12C). As diferentes condições testadas de volume da solução de lise celular e complementação do volume com água mostraram não haver diferença na qualidade dos ácidos nucleicos extraídos. Isto pode ser observado tanto pela eletroforese do material extraído quanto pela posterior amplificação dos fragmentos estudados, D1D2 e ITS+D1D2.

5.2.2. Amplificação dos fragmentos

No trabalho desta tese todas as alterações realizadas nas condições das reações de amplificação foram com o objetivo de promover amplificações mais específicas, pelo aumento da temperatura de anelamento, e evitar problemas de amplificação e dano ao molde de ácido nucleico, evitando reações com número desnecessário de ciclos. Uma vez que os organismos seriam identificados por comparação das seqüências obtidas. Além disso, foi necessário tornar o trabalho mais econômico e prático, ao produzir um único fragmento que servisse para o sequenciamento das regiões ITS e D1D2.

O iniciador ITS1f foi desenhado por Gardes e Bruns (1993) para promover a amplificação específica de ácidos nucleicos de fungos em amostras contendo ácido nucleico de outros organismos eucariotos. Nos experimentos os autores observaram que utilizando ITS1f e ITS4 (iniciador universal para eucariotos) foi possível amplificar todos os fungos testados, basídeos ou ascomicetos, enquanto que amostras de material vegetal eram fracamente ou completamente não amplificadas. Por isto, o ITS1f é tido como específico e universal para fungos superiores (ANDERSON e CAIRNEY, 2004), e é amplamente empregado nos estudos moleculares de diversidade de fungo, a partir da amplificação de ácidos nucleicos extraído de amostras ambientais, com diversas técnicas como: DGGE⁹ (ANDERSON et al., 2003b), SSCP¹⁰ (ZACHOW et al., 2008), biblioteca de clones, amplificação quantitativa (MANTER e VIVANCO, 2007; BROECKLING et al., 2008) e diversos artigos utilizando T-RFLP¹¹, como apontado na revisão da utilização desta técnica em fungos feita por Avis et al. (2006).

Anderson et al. (2003a) verificaram em amostra de solo que os iniciadores mais utilizados para o estudo molecular de fungos possibilitam amplificações tendenciosas. Entre outros iniciadores, eles observaram que o par ITS1f-ITS4 possui uma tendência a promover amplificações de seqüências de basídeomicetos, se comparado a outros conjuntos testados. Porém, não há relato na literatura de problemas em amplificar material extraído a partir de culturas de fungo utilizando este iniciador. Mas nos resultados desta tese foi observado que reações com o iniciador ITS1f não foram capazes de amplificar a cultura ascomicética 398. Embora, o material desta cultura tenha sido fortemente amplificado utilizando NL1-NL4 o que possibilitou sua identificação como filogeneticamente próxima à *Candida drosophilae*.

Outras culturas pertencentes à família *Saccharomycetaceae* como a 835 (*Candida cf. famata*), 848 (*Candida cf. sorbophila*) e 850 (*Candida aff. azyma*), também não puderam ser

⁹ DGGE – Eletroforese em gel de gradiente desnaturante – permite a separação de fragmentos amplificados pela diferença da composição de suas seqüências de bases.

¹⁰ SSCP – Poliformismo conformacional de DNA em fita simples – permite a separação de fragmentos amplificados pela diferença estrutural da fita simples da região amplificada.

¹¹ T-RFLP – Terminal- polimorfismo de tamanho de fragmento após restrição – permite a diferenciação precisa dos tamanhos, por eletroforese capilar, dos fragmentos gerados após a digestão com enzima de restrição dos amplicons gerados com iniciadores fluorescentes.

amplificadas utilizando IT1f-NL4. A temperatura de anelamento da reação estava de acordo com o requerido pelos iniciadores e não foi realizado nenhum teste com estas culturas para verificar se a alteração neste, ou em qualquer outra condição da reação, possibilitaria a amplificação. Porém chamou a atenção o fato de que, dentro de inúmeras amostras, algumas culturas deste grupo não serem amplificadas. Gardes e Bruns (1993) quando desenharam o ITS1f notaram haver uma transversão (G -> C) na quarta base da região 3' de anelamento deste iniciador em *S. cerevisiae*. Ao fazer uma busca em base de dados do gene 18S rRNA (SSU) foi identificado que o sítio de anelamento do ITS1f apresenta esta variação em alguns grupos de leveduras. A transversão observada por Gardes e Bruns (1993) em *S. cerevisiae*, está presente, também, em todas as espécies dos gêneros *Kluyveromyces*, *Kazackstania*, *Zygosaccharomyces*, *Tetrapisispora*, *Dekkera*, *Arxiozyma*, *Brettanomyces* e *Saccharomyces*, e em algumas poucas espécies do gênero *Candida*. Todas as espécies são pertencentes ao clado *Saccharomycotina*, entretanto nem todos os gêneros deste clado apresentam esta alteração.

Isso, por si só não parece ser o problema, uma vez que os autores obtiveram amplificações utilizando este par de primer para *S. cerevisiae*, com o mesmo protocolo utilizado para outras espécies de fungos testadas. Nos resultados desta tese, vários organismos pertencentes a este Clado também foram amplificados, como *Candida glabrata*, *Torulaspota globosa*, *Pichia caribbica* e *Pichia fermentans*. Indicando que o problema parece ser restrito a um grupo de organismos, como os das espécies das culturas citadas anteriormente.

Nas sequencias presentes nas bases de dados, ao avaliar a região de anelamento do primer, para as espécies que não foram amplificadas, foi identificado que no clado de *Candida azyma* existe uma transição (A -> C) na primeira base da região 3' do sítio de anelamento do ITS1f. Esta alteração aparece em todas as espécies dos gêneros deste clado, que inclui, entre outras, as espécies *C. azyma*, *C. drosophilae* e *C. sorbophila*, identificadas entre os isolados de cana-de-açúcar e que não conseguiram ser amplificados. Alterações nas três primeiras bases da região 3' do sítio de anelamento de um primer pode causar o não anelamento da polimerase durante a reação de amplificação. Acredita-se que tenha sido este o motivo para a não amplificação dos organismos isolados pertencente a este clado.

5.3. Metodologia de Isolamento

5.3.1. Teste de resistência das leveduras ao NaCl

A influência do sal no crescimento das culturas de levedura, ou a resistência à pressão osmótica, é um parâmetro de análise taxonômica nas chaves de Barnett et al. (1990) e Kurtzman e Fell (1998). A amostragem por espécie, neste experimento, é pequena sendo que grande parte das espécies está representada por apenas uma cultura. Mas podemos notar que para as espécies *Debaryomyces occidentalis*, com oito culturas, e *Kodamea ohmeri*, com quatro culturas, não houve variação do nível de resistência. Para outras espécies a resistência ficou em mais de um nível. Há considerável distribuição dos níveis de resistência e não foi notada nenhuma tendência à resistência ou à suscetibilidade para qualquer concentração de NaCl entre as espécies, gêneros e grupos testados.

Ao comparar a resistência das culturas pertencentes à coleção do laboratório com as das culturas isoladas de uma área de restinga, observou-se que as culturas da coleção eram menos tolerantes ao sal (Figura 16). Esta diferença foi mais evidente no tratamento com 10% de NaCl. Enquanto, apenas 28 % das culturas da coleção foram resistentes a esta concentração de NaCl, nas culturas de restinga foi observado 72 % de resistência.

Possivelmente, os motivos para esta diferença são as características do ambiente de origem das culturas (GARCIA, 2007). Elas foram isoladas de amostras de um ambiente de influência da salinidade do mar e que possui alternância de períodos secos e úmidos. Neste ambiente é de se esperar que haja seleção dos indivíduos mais resistentes ao estresse salino. Outro fator, de menor importância que pode ter contribuído para esta diferença, é o fato das culturas da coleção estarem a vários anos sendo mantidas em condições de laboratório, enquanto que as culturas novas foram recentemente isoladas e ainda expressam ou expressam de forma mais intensa suas respostas a situações de estresse.

Os resultados dos testes de resistência das culturas de leveduras demonstraram que concentrações de 3 % de NaCl não implicariam em perda da diversidade amostrada, caso fosse utilizada em composições de meios de isolamento. Apesar do aumento da concentração até 6 % impedir o crescimento de quase 10 % das culturas amostradas, esta perda é provavelmente muito menor do que as perdas estimadas com o crescimento micelial durante os isolamentos de leveduras.

A resistência demonstrada pelas culturas de leveduras testadas orientou a utilização da concentração de 6% de NaCl como limite máximo para os testes iniciais em experimentos de inibição do crescimento de fungo filamentosos. Nesta concentração haveria pouca inibição do crescimento das colônias de leveduras durante o isolamento. Foram realizados alguns testes iniciais utilizando NaCl e filtração da extração de células, para respectivamente, inibir o crescimento e permitir a retirada seletiva dos fungos filamentosos.

5.3.2. Inibição do crescimento de fungos filamentosos por NaCl e filtração

No primeiro experimento realizado, foi observado também que o número de colônias de fungos não é um parâmetro adequado para analisar a inibição do crescimento destes organismos em placa de Petri. À medida que as colônias ficam menores, pela ação do NaCl, a competição pelos nutrientes diminui e é possível contar um maior número delas. Desta forma não foi realizada a análise dos dados da relação entre UFC de fungos filamentosos e de leveduras. Utilizando este parâmetro neste experimento levaria a uma falsa conclusão de que o sal ajudaria o desenvolvimento do fungo ou aumentaria o número de colônias. Na figura 17, nota-se que é exatamente ao contrário. No tratamento sem NaCl (0 %) o desenvolvimento das colônias de fungos filamentosos é abundante e em 72 horas quase toda a superfície da placa

está tomada pelo crescimento micelial, impedindo a contagem de novas colônias tanto de levedura quanto dos fungos filamentosos.

Esta situação dificulta o isolamento das leveduras porque as colônias são rapidamente recobertas pelas hifas e ao se passar para uma nova placa, os fungos filamentosos irão novamente se desenvolver. As placas com 10 mg de solo tiveram sua superfície recoberta pelo crescimento dos fungos com apenas três dias de crescimento para o tratamento sem sal, seis dias para o tratamento com 3 e 4 % e oito dias para os tratamentos com 5 e 6 %. Apesar de na Análise de Variância não ter sido demonstrado diferença significativa de UFC . g⁻¹mf entre os tratamentos e entre estes e o controle sem sal, nas duas diluições analisadas. Os dados de UFC . g⁻¹mf de leveduras foram muito baixos, prejudicando qualquer inferência estatística sobre estes dados. Mesmo assim, eles serviram para estimar a quantidade de leveduras presentes no solo estudado que está na ordem de 10³ células . g⁻¹ de solo.

O experimento de inibição dos fungos filamentosos por NaCl em meio de isolamento para leveduras mostrou que, para o solo testado, as quantidades que poderiam ser utilizadas para a inoculação, a fim de se obter uma contagem entre 10 e 200 colônias foram de 1 e 10 mg de solo por placa de Petri de 10 cm de diâmetro.

Nas concentrações testadas o NaCl aparentemente não tem efeito na quantidade de colônias de fungos filamentosos e de leveduras que aparecem no meio de isolamento, porém o crescimento micelial vigoroso que se observa quando não se utiliza NaCl é bastante diminuído na presença do sal. Embora, os resultados tivessem indicado a utilização de NaCl nos meios para o isolamento de leveduras de solo foram necessários outros experimentos para que melhor se quantifique esta inibição. Principalmente no que se refere ao parâmetro avaliado, uma vez que a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC . g⁻¹mf) se mostrou ineficiente. O parâmetro que pareceu mais razoável de ser quantificado nos experimentos seguintes foi a porcentagem de ocupação da área da placa de Petri pelas colônias de fungos filamentosos.

No extenso trabalho de Tresner e Hayes (1971) com 770 espécies de fungos de ambiente terrestre, onde das 975 estirpes testadas a maioria era resistente a 10 % de NaCl, ficou demonstrado a grande tolerância destes organismos ao sal. Sendo exceção as estirpes de Basidiomicetos em que mais de 90 % das estirpes testadas não suportaram 5 % do sal e as que resistiram a 10 % de NaCl, pouco mais de 1 % do total, foram isoladas de ambientes marinhos. Embora o estudo demonstre a grande tolerância dos fungos de ambiente terrestre ao sal, não há nenhum dado sobre a influência no crescimento das colônias, pois os testes foram realizados em tubo de ensaio com meio sólido inclinado e era considerada resistente a cultura que em 10 dias a 24 °C conseguisse desenvolver colônia no meio, não importando o tamanho. A grande modificação que o sal promove no desenvolvimento da maioria dos fungos filamentosos é a velocidade em que as colônias se desenvolvem e conseguem cobrir a superfície do meio. Isto pode ser observado na figura 17 e confirmado nos dados da tabela 21.

Nos experimentos de inibição também foi observado que os vários tipos de colônias de fungos filamentosos estavam presentes em todas as concentrações de NaCl e filtração testadas, demonstrando que independente do sal o fungo consegue se desenvolver. Alguns fungos filamentosos foram isolados das placas para identificação das espécies. Foram escolhidas as colônias que apresentavam crescimento abundante e dificultariam o isolamento das leveduras. Os isolados foram identificados pelo Prof. Marcelo Fraga do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da UFRRJ como pertencentes às espécies *Aspergillus japonicum*, *Fusarium oxiosporum*, *Trichoderma aureoviride* e *Trichoderma harzianum*.

Nos dois experimentos de utilização da filtração pode ser observado que o crescimento das hifas é reduzido pelo procedimento de filtração com papel e adição de NaCl ao meio de isolamento. Apesar do teste de médias de Tukey não indicar significativa a

diferença entre a filtração com papel e a não filtração. A utilização da malha de metal, com poro de 34 μm , não foi eficiente na redução do crescimento das hifas. Os valores de ocupação deste tratamento são próximos aos valores do tratamento sem filtração. A utilização conjunta da filtração com papel e do NaCl obteve valores de ocupação significativamente mais baixos em relação aos tratamentos controles (Tabela 22 e Tabela 23) e um efeito de interação entre estes dois fatores no experimento que foi incubado por 120 h (Tabela 22). Esta combinação se mostrou interessante, pois consegue inibir o crescimento dos fungos filamentosos por mais tempo permitindo o isolamento de leveduras de crescimento mais lento.

Quando foi avaliada a utilização conjunta de NaCl e corantes, na composição do meio BIL-agar, para inibir o crescimento dos fungos filamentosos houve uma inibição intensa de qualquer crescimento nas placas. Mesmo na concentração mais baixa do sal, 1 %, o crescimento após 120 h foi mínimo. A utilização de NaCl e dos corantes nas concentrações testadas não é recomendada na composição de meio de isolamento para leveduras.

5.3.3. Teste de meios de cultura para isolamento

O esperado para as contagens da extração e de sua diluição é da ordem de uma diferença de 10 vezes, isto foi observado claramente apenas nos meios BIL-pr, BIL-lc e YM-s (Tabela 21). Nos demais a contagem das colônias de 1 mg de solo eram pelo menos o dobro do esperado, em alguns se aproximavam de valores cinco vezes ao esperado e nos meios YNB e no BIL-s foi maior do que com 10 mg de solo. Os valores de contagem de leveduras estão mascarados pelo crescimento micelial vigoroso dos fungos filamentosos quando a quantidade de 10 mg de solo foi inoculada. O crescimento destes organismos, que pode ocupar toda a superfície da placa de Petri em 2-3 dias, impede aparecimento das colônias leveduras pela competição por espaço e nutrientes ou se estas aparecem estão sob intensa massa de hifas e dificilmente podem ser notadas. Estes dados refletem a dificuldade da contagem e isolamento destes organismos em amostras onde há grande quantidade de propágulos de fungos filamentosos. A busca de métodos que diminuam o crescimento micelial e que, ao mesmo tempo, tenham uma influência mínima no desenvolvimento das leveduras é, portanto, importante para o desenvolvimento deste tipo de trabalho.

Os dados iniciais que foram obtidos encorajaram a adição de NaCl na concentração de 4 % aos meios de cultura mais utilizados nos levantamentos das populações de leveduras no solo. Neste experimento foram testadas também, composições de meios utilizando inibidores, formulação com corantes e adição de ácidos orgânicos que podem atuar tanto como inibidores quanto como fonte de carbono específica para alguns organismos. Infelizmente a adição de NaCl ao meio na concentração de 4 % não se mostrou adequada para isolamento de leveduras. Embora tenha diminuído a incidência do crescimento micelial (Tabela 24), nos tratamentos em que foi adicionado sal, as colônias de leveduras, em sua maioria, apresentavam tamanho diminuto demonstrando que o sal interferia também no crescimento das colônias de levedura, em especial no meio BIL que possui menor quantidade de fontes de carbono. Quando este meio foi inoculado com 10 mg de solo, tornou difícil a distinção entre colônias de levedura ou pequenas colônias de fungo filamentosos, porém quando foi inoculado 1 mg a competição por nutrientes foi menor e as colônias puderam ser identificadas, porém com uma menor contagem.

Nos meios com maior quantidade de fontes de carbono como o YM, GPA e W, a adição de sal permitiu a distinção entre colônias de fungos filamentosos e leveduras, porém houve dificuldade em diferenciar entre os tipos de colônias de leveduras, caso elas não apresentassem pigmentos naturais. As leveduras com pigmentos são uma minoria dentro da diversidade existente. Uma vez que muitos levantamentos da diversidade de leveduras foram baseados no isolamento de organismos pela caracterização inicial do tipo de colônia formado a adição de sal prejudica esta identificação inicial e pode comprometer o trabalho futuro. É

interessante notar que, nos testes de placa réplica com GYP, até a concentração de 6%, mais de 90% das culturas de leveduras se desenvolveram sem dificuldades (Tabela 20 e Figura 16). Foram realizados testes com sal em meio BIL e os resultados foram semelhantes. As culturas se desenvolviam bem e foi possível identificar as variações na estrutura das colônias como borda, superfície, cor, brilho, presença de filamentos, etc. Porém, quando foi utilizada a concentração de 4% de sal nos meios para o isolamento, as colônias que se desenvolveram por possuírem um pequeno tamanho não foi possível verificar estas características.

Estes dados levaram a reflexão sobre o que poderia ser diferente entre os dois tipos de inoculação: a das placas réplica e o do isolamento. Uma das diferenças é a quantidade de células presentes no inóculo que irá gerar a colônia. Enquanto as colônias nos testes de resistência eram originadas por um inóculo com muitas células, no isolamento as colônias são originadas a partir de uma única célula ou de poucas células agregadas. Nenhum teste foi realizado para avaliar a influência da quantidade de células no inóculo nos resultados dos testes de placa réplica, a diferença na quantidade de células iniciais é possivelmente o motivo para a grande diferença no desenvolvimento das colônias, em condições de estresse como pela adição do sal.

A presença das substâncias inibidoras dos meios BIL-bz, BIL-cpr e BIL-fr inibiu completamente qualquer crescimento nas placas, tanto de leveduras quanto de fungos filamentosos. Mesmo após sete dias de incubação não pode ser observado nenhum tipo de crescimento. Para o isolamento de leveduras de solo por plaqueamento no meio BIL devem ser testadas concentrações menores que 0,1 % de ácido benzóico, 0,5 % de ácido fórmico e 100 ppm de cobre adicionado na forma de sulfato de cobre.

A abordagem de isolamento a partir do enriquecimento permitiu a distinção de diferentes tipos de colônias (Tabela 25) e de forma relativamente fácil, pois a incidência de fungos filamentosos ficou bastante reduzida. Em apenas um estriamento a partir do enriquecimento houve um crescimento micelial que prejudicou o isolamento.

5.4. Desenvolvimento de Método de Triagem para Leveduras

A presença de corantes nos meios BIL-em e BIL-vbml (Figura 18) facilitou a diferenciação das culturas, uma vez que a maioria das espécies de leveduras conhecidas não apresenta pigmentos naturais e suas colônias são de cor branca ou creme. Nos meios com eosina e azul de metileno (BIL-em), a quantidade de proteína e vitaminas, na forma de extrato de levedura, permitiram alterações no formato e coloração das colônias. A absorção destes dois corantes também foi um fator importante na diferenciação. As cores variaram de rosa pálido, a vermelho vivo e vinho. Em muitas culturas a diferença entre as colônias crescidas com 0,5 e 0,05 % de extrato de levedura foi bastante expressiva permitindo uma melhor diferenciação nos crescimentos com estes corantes.

A quantidade de corante absorvido, o pH de cada colônia e a presença de pigmentos naturais, como no caso das espécies do gênero *Rhodotorula*, foram os fatores que influenciaram a coloração das colônias nos meios BILmlvb. Em experimentos preliminares de triagem com este meio, sem a adição de 0,5% de ácido málico, as variações de pH, que algumas culturas promoviam, não se restringia apenas à colônia. O H⁺ liberado no meio alterava rapidamente a coloração do corante verde de bromocresol, formando um halo de acidificação em torno destas colônias que terminavam por acidificar boa parte do meio na placa de Petri, influenciando a coloração das demais colônias presentes.

A principal fonte de tamponamento do meio BIL é o tampão fosfato que possui a capacidade de tamponamento na faixa de pH entre 6,5 e 7,5. O pH inicial deste meio é 5,5 e o tampão fosfato está presente para evitar a alcalinização, visto que poucas leveduras são resistentes a pH maiores que 8. O meio BIL em sua formulação original não tem nenhuma capacidade de tamponamento quando o pH está em 6 ou abaixo. E, portanto, havia a necessidade de incluir um componente neste meio que pudesse manter o pH mais estável mesmo com os produtos do metabolismo lançados pelo crescimento das colônias.

Entre diversos compostos tamponantes estudados, encontramos o ácido málico, que é um ácido orgânico solúvel com dois pKas, o primeiro a 3,4 e o segundo a 5,1, possuindo, desta forma, capacidade de tamponamento na mesma faixa de viragem do corante verde de bromocresol, entre os pH 3,5 e 5,5. Foi resolvido iniciar o teste com a concentração de 0,5 % de ácido málico uma vez que esta é a concentração, para o malato (C50), quando utilizado nos testes de assimilação para classificação de leveduras. Esta concentração foi suficiente para manter a variação de pH restrita às colônias, tanto no pH 4 (Figura 18) quanto no pH 5,5. Variações na coloração do meio que se espalhavam por toda a placa e interferiam na coloração das demais colônias, só foram percebidas com mais de seis dias de incubação.

Os ácidos orgânicos podem atuar como inibidores do crescimento de leveduras e houve a preocupação de que a concentração utilizada pudesse inibir o crescimento das culturas. Porém foi observado que para quase a totalidade das culturas testadas não houve inibição e as colônias possuíam tamanho semelhante quando crescidas no meio BIL sem corante e sem tampão. Quando havia inibição, notou-se que ela era mais freqüente a pH 4 do que a pH 5,5, indicando que a ação inibitória para estas culturas ou era devido à intolerância da cultura ao pH baixo, ou aos dois fatores atuando sinergicamente, pH baixo e concentração de 0,5 % do ácido málico. Carvalho (2007) testando a inibição do crescimento de diversas espécies de leveduras a ácido propiônico e benzóico, observou que as inibições eram mais acentuadas em valores de pH mais baixos. Nas triagens feitas foram testadas mais de 800 culturas sendo que apenas três não cresceram em BILvbml pH5,5 e cresceram em pH 4, 14 não cresceram em pH4 e cresceram em pH 5,5 e nenhuma cultura não cresceu nos dois pHs. Para as culturas da coleção testadas (Tabela 27) nenhuma foi inibida pela presença do ácido málico, indicando que para estas espécies, pertencentes a diversos gêneros, esta concentração também não interfere no desenvolvimento das colônias.

A inclusão de um sistema tampão diminuiu os problemas de variação, instabilidade da coloração e interferência entre os crescimentos das colônias da placa. Porém, conseqüentemente, houve perda da sensibilidade do meio. No meio BIL-vbc pH 5,5 as variações na coloração das colônias eram maiores Garcia (2007), mas após a adição do tampão poucas colônias conseguiram acidificar o meio a ponto das colônias ficarem verdes (pH entre 3,9 e 4,3) ou amarelas (pH abaixo de 3,5). A maior parte das colônias ficou com tonalidade que variavam do cinza (pH 4,9) a azul (pH 5,5 ou maior). Para o mesmo meio com pH 4 (BIL-vbml pH4,0) isto não foi observado houve variações nas cores de amarelo a azul. Como sugestão para trabalhos futuros fica a necessidade de experimentar concentrações menores que 0,5% de ácido málico ou variar a concentração de outros componentes deste meio, a fim de recuperar parcialmente a sensibilidade.

O teste DBB-urease em meio sólido não gerou o resultado que é relatado pela literatura. Muitas culturas não se desenvolveram neste meio e as que formaram colônias não foram capazes de alcalinizar a ponto de promover a viragem do corante fucsina ácida, de rosa para incolor. A viragem da fucsina ácida é necessária para a correta visualização da reação ao azul de diazonium B, a qual quando positiva produz cores em tons semelhantes ao da fucsina. Foram testadas várias formulações para o meio e diferentes origens dos reagentes e do corante, mas não foi encontrada a origem do problema. Testes de viragem de cor realizados com as fuscinas ácidas de diferentes fabricantes indicaram que o corante só se torna incolor após o pH ter atingido valores acima de 12, o que está de acordo com o descrito por Sabnis (2008). Este valor de pH é alto para que possa ser induzido pelo metabolismo das colônias em crescimento. As fuscinas como vários outros corantes não são compostos quimicamente puros, elas são formadas por uma mistura de diferentes moléculas que irão resultar na coloração final. É possível que a composição da fucsina ácida utilizada por Hagler e Mendonça-Hagler (1991) para formulação do teste DBB-urease não seja a mesma das fuscinas ácidas atualmente encontradas.

Foram avaliadas variações na formulação do meio com outros corantes, como o vermelho-fenol, utilizado no meio para o teste padrão da urease (CHRISTENSEN, 1946), porém nenhuma foi satisfatória. Ainda assim, o meio do YCB-ureia com o corante fucsina ácida, se mostrou importante na diferenciação das colônias em especial quando comparado com a absorção dos corantes eosina e azul de metileno. Embora tenha sido inesperado, e até o momento não compreendido, o não crescimento de várias culturas neste meio isto foi utilizado também como fator discriminante na triagem.

A presença de corantes naturais como no caso das espécies do gênero *Rhodotorula* e em *Kluyveromyces* spp., pode ser verificada no meio BIL. O crescimento a 36°C permitiu uma boa variação no perfil das espécies testadas. Muitas espécies de leveduras não são capazes de se desenvolver a esta temperatura, embora outras possam crescer até a 45° C. A temperatura máxima de crescimento é uma característica utilizada nas chaves taxonômicas para identificação de leveduras. Embora, isto possa ser variável se consideradas culturas isoladas de locais tropicais. No teste realizado com as culturas da coleção, 12 espécies não foram capazes de formar colônias a 36° C (Tabela 27). Esta diferenciação por temperatura de crescimento foi especial para o gênero *Candida*, onde seis das 13 espécies não se desenvolveram permitindo a divisão, praticamente pela metade, das espécies testadas pertencentes a este gênero.

Na preparação dos inóculos, como se esperava, as preparações testadas, com água ou meios de cultura, não resultaram em modificação perceptível no crescimento, morfologia, cores ou característica das colônias para todas as culturas testadas (Figura 19). O resultado se repetiu para todos os meios utilizados na triagem, indicando que a quantidade de nutrientes presentes nas células ou sua condição nutricional no inóculo não interferia ou alterava o seu crescimento nos meios testados. Desta forma, para a preparação dos inóculos para esta

metodologia de triagem pode-se utilizar qualquer uma das cinco preparações testadas. Para tornar a realização da triagem mais prática, optou-se primeiro por realizar o teste de fermentação da glicose com as culturas e posteriormente utilizar a suspensão de células restantes como inóculo.

A capacidade de diferenciação deste conjunto de meios permitiu a diferenciação entre culturas de uma mesma espécie. Culturas de origens diferentes de *C. krusei*, *C. oleophila*, *C. sake* e *S. cerevisiae* demonstraram padrões diferentes de crescimento (Tabela 28). As culturas de *C. krusei* apresentaram uma diferenciação na textura de suas colônias. A cultura 124 possui um aspecto menos filamentososo em relação às colônias das demais culturas. Ainda com relação ao aspecto das colônias, as duas culturas de *C. oleophila* foram bastante diferenciadas nos meios BILem 0,5 % e 0,1 %, BILvbml pH 4 e pH 5,5. Porém, com relação à coloração das colônias, para as duas culturas de *C. rugosa* testadas, a diferenciação foi mínima, apenas uma maior acidificação foi observada para a cultura 4PD em relação à 4TB nos meios BILvbml pH 4 e pH 5,5.

A utilização dos meios diferenciais permitiu a separação das diversas espécies de leveduras testadas. Os nove meios permitiram a diferenciação das 33 espécies testadas pelas características de crescimento e coloração das colônias (Tabela 27). Não foi possível estender para um maior número de espécies e para um maior número de culturas da mesma espécie o estudo da capacidade de diferenciação de linhagens por esta metodologia. Porém, como esta metodologia reflete variações no metabolismo, principalmente metabolismo secundário, como produção ou liberação de prótons, ácidos orgânicos, proteases, etc., espécies que notadamente apresentam linhagens com variações nos seus metabolismos, como por exemplo *S. cerevisiae*, é de se esperar que estas variações também possam ser detectadas por esta metodologia. Espécies que apresentem menor variação entre suas linhagens provavelmente possuirão um perfil, nos meios de triagem, mais estável, ou como menor variação.

Embora o objetivo inicial desta triagem não fosse separar as culturas em espécies, observamos que entre todas as espécies testadas não houve repetição do mesmo padrão de característica das colônias (Tabela 27). Foi possível, também, discernir entre culturas diferentes que supostamente pertenciam a uma mesma espécie (Tabela 28). Muitos isolados pertencentes a espécies ainda não descritas podem ser identificados erroneamente como *C. sake*, *C. oleophila* e *S. cerevisiae*, pois muitas espécies possuem características fisiológicas similares e a estas espécies dificultando sua identificação ao utilizar as chaves taxonômicas. Pode ser que o método de triagem desenvolvido esteja indicando um possível erro de identificação de espécie destas culturas.

5.5. Validação da Metodologia de Triagem

A partir destes resultados, com as culturas da coleção do IMPPG, que indicavam que o método possui uma alta capacidade de discriminação. Foi resolvido avaliá-lo com duas coleções de levedura que possuíam grande probabilidade de conter isolamentos redundantes. Cada uma destas coleções foi formada utilizando diferentes meios de isolamento. Uma das coleções foi obtida, a partir de amostra de solo de cultivo de milho, nos experimentos de escolha dos meios de plaqueamento e enriquecimento para o isolamento de leveduras desta tese. E a outra coleção foi obtida com isolamento de leveduras de sedimento para bio prospecção de fermentadores de galactose, sendo utilizados cinco diferentes meios de enriquecimento e as amostras foram: uma de alga *Glaciaria* sp. e cinco amostras de um transecto de 20 m ao longo de uma praia de mangue da Ilha do Catalão, Rio de Janeiro, RJ.

Essas duas coleções de leveduras nos pareceram ideais para avaliar o método de triagem. Uma vez que: 1) a de ambiente agrícola, fora realizado a partir de uma única amostra composta de 10 sub-amostra de solo e raiz de milho e esta amostra inoculada em 39 meios de enriquecimento e em 19 de plaqueamento; 2) as duas coleções foram obtidas utilizando um conjunto de meios de isolamento. Pelas características das amostras e dos isolamentos realizados, haveria diversidade dos isolados e, ao mesmo tempo, uma grande chance das coleções conterem isolamentos redundantes.

As culturas integrantes de grupos formados pela triagem quando verificado seus agrupamentos pelos testes fisiológicos formavam grupos com os mesmos integrantes dos da triagem. Foi observado que algumas culturas não agrupadas pelo método de triagem eram agrupadas pelos testes fisiológicos, indicando que para algumas culturas o método de triagem atribuiu diferença quando possivelmente elas eram semelhantes. Mas não foi observado nenhum erro falso negativo, em que o método de triagem não foi capaz de atribuir diferença quando ela existia.

O método de triagem desenvolvido foi utilizado em Cabral (2009) na verificação do estabelecimento de inóculo de leveduras em raízes de milho em experimentos de casa de vegetação. Neste experimento foi realizado a inoculação das sementes com inóculo turfoso e verificou a manutenção da população inoculada nas raízes em dois períodos ao longo do ciclo de vida da planta. As raízes foram coletadas e realizado o isolamento da população de leveduras. Os isolados obtidos foram então triados pela metodologia desenvolvida nesta tese, utilizando os mesmos meios de cultura. O carimbo de 96 pinos foi utilizado para a inoculação dos meios sólidos. Controles da cultura original do inoculante foram incluídos na triagem para facilitar a comparação. Esta comparação foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida. As colônias dos isolados que demonstravam o mesmo padrão de cor e aspecto observado no controle foram consideradas como originárias dos inoculantes. Posteriormente, as identificações realizadas pela triagem foram confirmadas por sequenciamento.

6. CONCLUSÕES

As populações de levedura dos compartimentos vegetais aumentaram no período de chuva em uma ordem de grandeza. Enquanto que as populações no solo se mantiveram constante para os dois períodos amostrados. Indicando uma possível relação ente as populações destes organismos em resposta ao estado metabolicamente ativo da planta durante o período chuvoso.

A maior alteração no padrão fisiológico da população foi encontrada nas populações do rizoplano no período de chuva. Indicando uma alteração na população de levedura quando a raiz da planta está ativa. A maior incidência de leveduras ascomicéticas esteve no rizoplano. Neste compartimento, cerca de metade das culturas isoladas possui característica fermentadora. Esta incidência foi intensificada no período de maior oferta d'água, quando a proporção das que demonstraram capacidade fermentadora passa para 2/3 dos isolamentos deste compartimento. Desta forma, foi observado uma predileção para as leveduras fermentadoras se estabelecerem na raiz metabolicamente ativa.

Como fonte de bioprospecção de leveduras fermentadoras o rizoplano é um ambiente promissor. Neste estudo das 272 leveduras que possuem capacidade de fermentação 162 foram originárias do rizoplano, 73 de amostras de solo e 37 pertenceram ao filoplano. A metodologia de isolamento com os meios de enriquecimento com glicose+álcool e xilose permitiu um aumento na quantidade de leveduras fermentadoras obtidas. Em 5 das 8 amostras de filoplano só possível obter leveduras fermentadoras através dos meios de enriquecimento. A utilização das metodologias de isolamento diretamente em placa e por enriquecimento permitiu um que um maior número de espécies (táxons) pudessem ser obtidos por amostra analisada. A metodologia em placa rendeu um maior número de espécies (táxons), porém em algumas amostras e determinados táxons só puderam ser encontrados pela utilização do enriquecimento, indicando a complementariedade destas metodologias nos estudos de comunidades de leveduras.

As populações de leveduras presentes em filoplano, solo e rizoplano de um plantio orgânico de cana-de-açúcar foram revistas utilizando protocolos desenvolvidos no Laboratório de Ecologia de Leveduras do IMUFRJ. Os protocolos de isolamento e triagem utilizados permitiram revelar uma rica diversidade de populações de leveduras presentes nesta área de produção orgânica. As identificações de parte dos organismos obtidos, indicam que muitos táxons pertencem a espécies ainda não descritas.

Por suas características de metabolismo fermentativo indicam que as espécies de leveduras que ocupam as raízes quando estas estão metabolicamente ativas pertencem a um complexo diferente mais aproximado dos que são considerados humidobiontes, complexo de espécies que ocupa preferencialmente frutos, flores, interior de plantas suculentas e exudados de troncos de árvores. A extensão destas conclusões para outras condições e espécies de plantas dependerá, ainda, de estudos futuros. Mas o fato das leveduras ascomicéticas fermentativas responderem a um efeito rizosférico e serem constituinte dominante na população observada no rizoplano, indica a relação entre as condições deste ambiente e as características fisiológicas dos organismos prevalentes. Os resultados do estudo desta tese revelam que a rizosfera é um ambiente próprio para leveduras com estas características. Assim como as rizobactérias, o estudo e compreensão das funções destes organismos podem auxiliar no entendimento das comunidades microbianas que habitam este compartimento ecológico.

Os organismos isolados do ambiente agrícola estudado nesta tese foram incorporados à coleção de cultura do Laboratório de Ecologia de Leveduras do IMPPG da UFRJ. As quase

800 culturas obtidas foram parcialmente caracterizadas pelos métodos de triagem e cerca 60 culturas de solo de plantio de milho e 240 de solo, raiz e folha de cana-de-açúcar foram caracterizadas mais detalhadamente pelos métodos convencionais de identificação de leveduras. Destas, mais de 87 organismos tiveram a sua identificação confirmada por sequenciamentos das regiões dos genes ribossomais ITS e D1D2. Os organismos e as informações sobre sua fisiologia e ecologia guardados em coleções de culturas são uma base para os estudos aplicados. Que podem direcionar seus experimentos de acordo com o conhecimento prévio gerado por estudos como o desta tese.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, J. W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, v.6, n.8, p.769-779, ago., 2004.
- ANDERSON, I. C.; CAMPBELL, C. D.; PROSSER, J. I. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. **Environmental Microbiology**, v.5, n.1, p.36-47, jan., 2003.
- ANDERSON, I. C.; CAMPBELL, C. D.; PROSSER, J. I. Diversity of fungi in organic soils under a moorland--Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. **Environmental Microbiology**, v.5, n.11, p.1121-1132, nov., 2003.
- ANDREWS, J.; KENERLEY, C. The effects of a pesticide program on non-target epiphytic microbial populations of apple leaves. **Canadian Journal of Microbiology**, v.24, n.9, p.1058-1072, set., 1978.
- ANDREWS, J.; KENERLEY, C. Microbial populations associated with buds and young leaves of apple. **Canadian Journal of Botany**, v.58, p.847-855, 1980.
- ASHELFORD, K. E.; CHUZHANOVA, N. A.; FRY, J. C.; JONES, A. J.; WEIGHTMAN, A. J. New screening software shows that most recent large 16s rRNA gene clone libraries contain chimeras. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.9, p.5734-5741, set., 2006.
- ASSIS, S. M.; MARIANO, R. L.; MICHEREFF, S. J.; SILVA, G.; MARANHÃO, E. A. Antagonism of Yeasts to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Cabbage Phylloplane in Field. **Revista Microbiologia**, v.30, p.191-195, 1999.
- AVIS, P. G.; DICKIE, I. A.; MUELLER, G. M. A 'dirty' business: testing the limitations of terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) analysis of soil fungi. **Molecular Ecology**, v.15, n.3, p.873-882, 2006.
- AZEREDO, L. A.; GOMES, E. A.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. **International Microbiology**, v.1, n.3, p.205-208, set., 1998.
- BAB'EVA, I. P.; AZIEVA, E. B. The taxonomic composition and ecological characters of yeasts occurring in tundra soils in West Taimir. **Mikologija i Fitopatologija**, v.14, p.99-103, 1980.
- BAB'EVA, I. P.; BELIANIN, A. I. [Yeast in the rhizosphere]. **Mikrobiologija**, v.35, n.4, p.712-720, 1966.
- BAB'EVA, I. P.; CHERNOV, I. Y. Geographical aspects of yeast ecology. **Physiol. Gen. Biol. Rev.**, v.9, n.3, p.1-54, 1995.
- BAB'EVA, I. P.; MOAVAD, K. Soil yeasts of *Lipomyces* genus as agents of soil structuration. **Pochvovedeniye**, v.8, p.144-146, 1973.
- BAB'EVA, I. P.; MOAVAD, K.; MARCHENKO, A. I. [Nitrogen fixation in combined cultures of *Lipomyces* and bacteria]. **Mikrobiologija**, v.46, n.2, p.270-272, 1977.
- BAB'EVA, I. P.; RESHETOVA, I. S. [New species of yeast from soil--*Candida podzolica*

- sp. nov.]. **Mikrobiologija**, v.44, n.2, p.333-338, 1975.
- BAB'EVA, I.; RESHETOVA, I. Yeast resources in natural habitats at Polar Circle Latitude. **Food Technology and Biotechnology**, v.36, p.1-5, 1998.
- BAB'JEVA, I.; SADYKOV, B. Composition and number of yeasts in plant phyllosphere. **Mikol Phytopatol**, v.14, p.473-476, 1980.
- BALANOVÁ, J.; BALAN, J.; KRÍZKOVA, L.; NEMEC, P.; BOBOK, D. Attraction of nematodes to metabolites of yeasts and fungi. **The Journal of Microbiology**, v.5, n.6, p.909-918, november., 1979.
- BARKER, J. S.; VACEK, D. C.; EAST, P. D.; STARMER, W. T. Allozyme genotypes of *Drosophila buzzatii*: feeding and oviposition preferences for microbial species, and habitat selection. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.39, n.1, p.47-58, 1986.
- BARNETT, J.; PAYNE, R.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. Cambridge University Press, 1983. 578 p.
- BARNETT, J.; PAYNE, R.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. ed. 2, Cambridge University Press, 1990. 1002 p.
- BARNETT, J.; PAYNE, R.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. ed. 3, Cambridge University Press, 2000. 1150 p.
- BEH, A. L. **Investigation of yeasts and Yeast-like Fungi Associated with Austra wine grapes using cultural and molecular methods**. 2007. 239 f. Tese (Doctor of Philosophy), School of Chemical Science and Engineering, University of New South Wales, Sydney, Australia.
- BHOWMIK, S.; SINGH, C. Mass multiplication of AM inoculum: Effect of plant growth-promoting rhizobacteria and yeast in rapid culturing of *Glomus mosseae*. **Current Science**, v.86, n.5, p.705-709, mar., 2004.
- BLAKEMAN, J. P.; FOKKEMA, N. J. Potential for Biological Control of Plant Diseases on the Phylloplane. **Annual Review of Phytopathology**, v.20, p.167-190, set., 1982.
- BOBY, V.; BALAKRISHNA, A.; BAGYARAJ, D. Interaction between *Glomus mosseae* and soil yeasts on growth and nutrition of cowpea. **Microbiological Research**, v.163, n.6, p.693-700, nov., 2008.
- BOEKHOUT, T.; FELL, J. W.; O'DONNELL, K. Molecular systematics of some yeast-like anamorphs belonging to the *Ustilaginales* and *Tilletiales*. **Studies in Mycology**, v.38, p.175-183, 1995.
- BOEKHOUT, T.; KURTZMAN, C. Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera In: WOLF, K. (Org.). **Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook**, Berlin:Springer-Verlag, 1996. p.1-81.
- BOTHA, A. Yeasts in Soil In: PÉTER, G.; ROSA, C. (Org.). **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Berlin Heidelberg:Springer, 2006. p.221--240.
- BOUTHILET, R. J. A taxonomic study of soil yeasts. **Mycopathologia Mycol Appl**, v.6, n.2, p.79-85, dez., 1951.
- BRASIL/EPE, 2008, Balanço Energético Nacional 2008: Ano base 2007, Relatório, Empresa de Pesquisa Energética, Rio de Janeiro.
- BRASIL/MAPA, 2007, Balanço nacional de cana-de-açúcar e agroenergia, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Produção e Agroenergia, Brasília.

- BRASIL/MAPA, 2009, Anuário estatístico da agroenergia, Relatório, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Produção e Agroenergia, Brasília.
- BREEZE, E. M.; DIX, N. J. Seasonal analysis of the fungal community on acer platanoides leaves. **Transactions of the British Mycological Society**, v.77, n.2, p.321-328, 1991.
- BROECKLING, C. D.; BROZ, A. K.; BERGELSON, J.; MANTER, D. K.; VIVANCO, J. M. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.3, p.738-744, fev., 2008.
- BUCK, J.; BURPEE, L. The effects of fungicides on the phylloplane yeast populations of creeping bentgrass. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, p.522-529, jun., 2002.
- BUNTING, L. A.; NEILSON, J. B.; BULMER, G. S. *Cryptococcus neoformans*: gastronomic delight of a soil ameba. **Sabouraudia**, v.17, n.3, p.225-232, set., 1979.
- BURFORD, E. P.; KIERANS, M.; GADD, G. M. Geomycology: fungi in mineral substrata. **Mycologist**, v.17, n.3, p.98-107, ago., 2003.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A.; CAPPELLI, F.; PAGNONI, U. M.; DAVOLI, P. A study on volatile organic compounds (VOCs) produced by tropical ascomycetous yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.84, n.4, p.301-311, 2003.
- BYZOV, B. A.; KURAKOV, A. V.; TRETYAKOVA, E. B.; THANH, V. N.; LUU, N. D. T.; RABINOVICH, Y. M. Principles of the digestion of microorganisms in the gut of soil millipedes: specificity and possible mechanisms. **Applied Soil Ecology**, v.9, p.145-151, 1998.
- BYZOV, B. A.; THANH, V. N.; BABJEVA, I. P. Yeasts associated with soil invertebrates. **Biology and Fertility of Soils**, v.16, n.3, p.183-187, ago., 1993.
- BYZOV, B. A.; THANH, V. N.; BABJEVA, I. P. Interrelationships between yeasts and soil diplopods. **Soil Biology Biochemistry**, v.25, n.8, p.1119-1126, 1993.
- CABRAL, A. S. **Ecologia de leveduras micocinogênicas e potencial de aplicação como agente de controle biológico**. 2009. 116 f. Tese (Doutor em Ciências), Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- CAMIN, J.; SOKAL, R. A method for deducing branching sequences in phylogeny. **Evolution**, v.19, p.311-326, 1965.
- CAPRIOTTI, A. Yeasts from U.S.A. soils. **Archiv fur Mikrobiologie**, v.57, n.4, p.406-413, jul., 1967.
- CAPRIOTTI, A. Yeasts of the Miami, Florida, area. I. From Key Biscayne soils. **Archiv fur Mikrobiologie**, v.41, p.142-153, 1962.
- CARVALHO, P. M. B. **Utilização de meios de enriquecimento para a bioprospecção de leveduras**. 2007. 138 f. Tese (Doutor em Ciências), Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- CHAMBERLAIN, P. M.; BLACK, H. I. J. Fatty acid compositions of *Collembola*: unusually high proportions of C20 polyunsaturated fatty acids in a terrestrial invertebrate.. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology**, v.140, n.2, p.299-307, fev., 2005.
- CHERNOV, I. Synecological analysis of yeast groupings in the Taimyr tundra. **The Soviet Journal of Ecology**, v.16, n.1, p.44-49, jan-fev., 1985.
- CHERNOV, I.; BABJEVA, I.; RESHETOVA, I. Synecology of yeast fungi in subtropical deserts. **Uspekhi Sovremennoi Biologii**, v.117, p.584-602, 1997.

- CHERNYAKOVSKAYA, T. F.; DOBROVOL'SKAYA, T. G.; BAB'EVA, I. P. The ability of saprotrophic bacteria isolated from natural habitats to lyse yeasts. **Microbiology**, v.73, n.4, p.482-484, jul., 2004.
- CHRISTENSEN, W. B. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. **Journal of Bacteriology**, v.52, n.4, p.461-466, out., 1946.
- CILLIERS, C.; BOTHA, A.; ESLER, K.; BOUCHER, C. Effects of alien plant management, fire and soil chemistry on selected soil microbial populations in the Table Mountain National Park, South Africa. **South African Journal of Botany**, v.71, n.2, p.211-220, 2005.
- COLWELL, R. R. Polyphasic taxonomy of the genus vibrio: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. **Journal of Bacteriology**, v.104, n.1, p.410-433, out., 1970.
- DAVENPORT, R. R. An Introduction to Yeasts and Yeast-like Organisms In: SKINNER, F. A.; PASSMORE, S. M.; DAVENPORT, R. R. (Org.). **Biology and Activity of Yeasts**, London:Academic Press, 1980. p.1-28.
- DAVIS, K. E. R.; JOSEPH, S. J.; JANSSEN, P. H. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.2, p.826-834, fev., 2005.
- DIDDEN, H. A.; LODDER, J. **Die Hefesammlung des Centraalbureau voor Schimmelcultures. Beiträge zu einer Monographie der Hefearten II Teil. Die Anaskosporogen Hefen, Zweite Hälft.** Amsterdam:North Holland, 1942. 512 p.
- DRUVEFORS, U. A.; SCHNÜRER, J. Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. **FEMS Yeast Research**, v.5, n.4-5, p.373-378, fev., 2005.
- EL-MEHALAWY, A. A. The rhizosphere yeast fungi as biocontrol agents for wilt disease of kidney bean caused by *Fusarium oxysporum*. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.6, n.2, p.310-316, 2004.
- EL-MEHALAWY, A. A.; HASSANEIN, N. M.; KHATER, H. M.; EL-DIN, E.-Z. A. K.; YOUSSEF, Y. A. Influence of maize root colonization by the rhizosphere actinomycetes and yeast fungi on plant growth and on the biological control of late wilt disease. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.6, n.4, p.599-605, 2004.
- EL-TARABILY, K. A. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, n.1, p.69-75, 2004.
- EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Mycoscience**, v.47, n.1, p.25-35, fev., 2006.
- EMBRAPA **Agência de informação Embrapa: cana-de-açúcar.** Embrapa CNPTIA, em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/Abertura.html> acessado em 22/11/2008.
- EMBRAPA **Manual de Métodos de Análise de Solos.** ed. 2, Rio de Janeiro:CNPS-EMBRAPA, 1997. 212 p.
- EMMONS, C. W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. **Journal of Bacteriology**, v.62, n.6, p.685-690, dez., 1951.

- ETCHELLS, J. L.; COSTILOW, R. N.; BELL, T. A.; DEMAIN, A. L. Control of molds during the enumeration and isolation of yeasts from soil and plant material. **Applied Microbiology**, v.2, n.5, p.296-300, set., 1954.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v.8, n.3, p.186-194, mar., 1998.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, v.8, p.175-185, 1998.
- FELL, J. W.; SCORZETTI, G. Reassignment of the basidiomycetous yeasts *Trichosporon pullulans* to *Guehomyces pullulans* gen. nov., comb. nov. and *Hyalodendron lignicola* to *Trichosporon lignicola* comb. nov.. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, n.3, p.995-998, mai., 2004.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, n.4, p.783-791, 1985.
- FLANNIGAN, B.; CAMPBELL, I. Pre-harvest mould and yeast floras on the flag leaf, bracts and caryopsis of wheat. **Transactions of the British Mycological Society**, v.69, p.485-494, 1977.
- FOGLEMAN, J. C.; FOSTER, J. L. Microbial colonization of injured cactus tissue (*Stenocereus gummosus*) and its relationship to the ecology of cactophilic *Drosophila mojavensis*. **Applied and Environmental Microbiology** v.55, n.1, p.100-105, jan., 1989.
- FONSECA, Á.; INÁCIO, J. Phylloplane Yeasts In: PÉTER, G.; ROSA, C. (Org.). **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Berlin Heidelberg:Springer, 2006. p.263--301.
- FRACCHIA, S.; GODEAS, A.; SCERVINO, J.; SAMPEDRO, I.; OCAMPO, J.; GARCIA-ROMERA, I. Interaction between the soil yeast *Rhodotorula mucilaginosa* and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.35, n.5, p.701-707, mai., 2003.
- GADANHO, M.; SAMPAIO, J. P. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula*: *Rh. glutinis* sensu stricto and *Rh. dairenensis* comb. nov.. **FEMS Yeast Research**, v.2, n.1, p.47-58, mar., 2002.
- GADANHO, M.; SAMPAIO, J. P.; SPENCER-MARTINS, I. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospiridium*: *R. azoricum* sp. nov.. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, n.3, p.213-221, mar., 2001.
- GARCIA, K. M. **Meios diferenciais para a bioprospecção de leveduras endofíticas da bromélia *Neoregelia cruenta***. 2007. 76 f. Dissertação (Mestre em Ciências), Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v.2, n.2, p.113-8, abr., 1993.
- GEST, H. **Microbes: An Invisible Universe**. Washington, DC:ASM Press, 2003. 220 p.
- GLUSHAKOVA, A. M.; CHERNOV, I. Y. Seasonal Dynamics in a Yeast Population on Leaves of the Common Wood Sorrel *Oxalis acetosella* L.. **Microbiology**, v.73, p.184-188, 2004.
- GOCHENAUR, S. E. Soil mycoflora of Peru. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v.42, n.3, p.259-272, dez., 1970.

- GOLLNER, M. J.; PÜSCHEL, D.; RYDLOVÁ, J.; VOSÁTKA, M. Effect of inoculation with soil yeasts on mycorrhizal symbiosis of maize. **Pedobiologia**, v.50, n.4, p.341-345, set., 2006.
- GOMES, N. C. M.; FAGBOLA, O.; COSTA, R.; RUMJANEK, N. G.; BUCHNER, A.; MENDONA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.7, p.3758-3766, jul., 2003.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p.195-202, 1998.
- GOWER, J. C. Maximal predictive classification. **Biometrics**, v.30, p.643-654, 1974.
- GUFFOGG, S. P.; THOMAS-HALL, S.; HOLLOWAY, P.; WATSON, K. A novel psychrotolerant member of the hymenomycetous yeasts from Antarctica: *Cryptococcus waticus* sp. nov.. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, n.Pt 1, p.275-277, jan., 2004.
- GUNASEKERA, T. S.; PAUL, N. D.; AYRES, P. G. Responses of Phylloplane Yeasts to UV-B (290-320 Nm) Radiation: Interspecific Differences in Sensitivity. **Mycological Research**, v.101, n.07, p.779-785, 1997.
- GUZEVA, I. S. **Development of Microorganisms on the Root Surface**. 1978. Tese (PhD), Department of Soil Biology, Universidade de Moscou, Moscou, Russia.
- HAGLER, A. N.; AHEARN, D. G. Rapid diazonium blue B test to detect Basidiomycetous yeasts. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.31, n.2, p.204-208, 1981.
- HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. The yeasts of fresh water and sewage. **An Microbiol (Rio J)**, v.23, p.79-103, 1978.
- HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. A diazonium blue B test for yeasts grown three days on yeast carbon base-urea agar. **Revista Microbiologia**, v.22, n.1, p.71-74, 1991.
- HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; ROSA, C. A.; MORAIS, P. B. Yeasts as an example of microbial diversity in brazilian ecosystems **Oecologia Brasilienses**, Vol. 1, Rio de Janeiro:Programa de Pós Graduação em Ecologia - UFRJ, 1995. p.225--244.
- HERTZ, M.; LEVINE, M. A fungistatic medium for enumeration of yeasts. **Food Research**, v.7, p.430-441, 1942.
- HISLOP, E.; COX, T. Effects of captan on the non-parasitic microflora of apple leaves. **Transactions of the British Mycological Society**, v.52, p.223-235, 1969.
- HOGG, B. M.; HUDSON, H. J. Micro-fungi on leaves of *Fagus sylvatica* I. The Micro-fungal Sucession. **Transactions of the British Mycological Society**, v.49, p.185-192, 1966.
- HONG, S.; LEE, K.; BAE, K. Diversity of yeasts associated with natural environments in Korea. **The Journal of Microbiology**, v.40, n.1, p.55-62, mar., 2002.
- HONG, S. G.; LEE, K. H.; KWAK, J.; BAE, K. S. Diversity of yeasts associated with *Panax ginseng*. **The Journal of Microbiology**, v.44, n.6, p.674-679, dez., 2006.
- HUBER, T.; FAULKNER, G.; HUGENHOLTZ, P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. **Bioinformatics**, v.20, n.14, p.2317-2319, set., 2004.
- IBGE, 2009, **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**, IBGE, em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/defaulttab.shtm>,

acessado em 08/02/2009.

INÁCIO, J. **Ocorrência e diversidade de leveduras no filoplano de plantas seleccionadas do Parque Natural da Serra da Arrábida**. 2003. 244 f. Tese (PhD), Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.

INÁCIO, J.; PEREIRA, P.; CARVALHO, M.; FONSECA, Á.; AMARAL-COLLAÇO, M.; SPENCER-MARTINS, I. Estimation and Diversity of Phylloplane Mycobiota on Selected Plants in a Mediterranean-Type Ecosystem in Portugal. **Microbial Ecology**, v.44, n.4, p.344-353, dez., 2002.

JAGER, E.; WEHNER, F.; KORSTEN, L. Microbial Ecology of the Mango Phylloplane.. **Microbial Ecology**, v.42, n.2, p.201-207, ago., 2001.

JORGENSEN, H.; ELMHOLT, S.; PETERSEN, H. Collembolan dietary specialisation on soil grown fungi. **Biology and Fertility of Soils**, v.39, n.1, p.9-15, nov., 2003.

JORGENSEN, H.; JOHANSSON, T.; CANBÄCK, B.; HEDLUND, K.; TUNLID, A. Selective foraging of fungi by collembolans in soil. **Biology Letters**, v.1, n.2, p.243-246, jun., 2005.

KIMURA, Y.; NAKANO, Y.; FUJITA, K.; MIYABE, S.; IMASAKA, S.; ISHIKAWA, Y.; SATO, M. Isolation and characteristics of yeasts able to grow at low concentrations of nutrients. **Yeast**, v.14, n.3, p.233-238, fev., 1998.

KING, A. D.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, n.5, p.959-964, mai., 1979.

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. **Taxonomy of Yeasts and Yeast-like Organisms**. Bratislavia:Alfa, 1990b. 630 p.

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. **Yeast an Yeast-like Organisms**. ed. 2, Weinheim:VCH Verlagsgesellschaft, 1990a. 528 p.

KONONKOV, F. P.; UMAROV, M.; MIRCHINK, T. G. [Nitrogen-fixing fungal associations with bacteria]. **Mikrobiologija**, v.48, n.4, p.734-737, jul-ago., 1979.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W.; VEENHUIS, M. Electron microscopy of some special cell contacts in yeasts. **Journal of Bacteriology**, v.113, n.1, p.350-356, jan., 1973.

KURTZMAN, C. P. *Saturnospora ahearnii*, a new salt marsh yeast from Louisiana. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.60, n.1, p.31-34, jul., 1991.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. ed. 4, Elsevier Science, 1998. 1055 p.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.73, n.4, p.331-371, mai., 1998.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Phylogenetic relationships among yeasts of the '*Saccharomyces* complex' determined from multigene sequence analyses. **FEMS Yeast Research**, v.3, n.4, p.417-432, jun., 2003.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J.; BASEHOAR-POWERS, E. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov.. **FEMS Yeast Research**, v.8, n.6, p.939-954, set., 2008.

- KURTZMAN, C.; FELL, J. Yeast Systematics and Phylogeny: Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology In: PÉTER, G.; ROSA, C. (Org.). **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Berlin Heidelberg:Springer, 2006. p.11--30.
- KUZYAKOV, Y.; DOMANSKI, G. Carbon input by plants into the soil. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.163, p.421-431, 2000.
- KVASNIKOV, E. I.; KLIUSHNIKOVA, T. M.; NAGORNAIA, S. S. [The nitrogen fixing ability of yeasts isolated from the rhizosphere and phyllosphere of plants]. **Mikrobiol Zh**, v.36, n.6, p.790-791, 1974.
- KVASNIKOV, E. I.; NAGORNAIA, S. S.; SHCHELOKOVA, I. F. [Yeast flora of plant rhizosphere and phyllosphere]. **Mikrobiologiya**, v.44, n.2, p.339-346, 1975.
- LA RIVIERE, J. The Delft School of Microbiology in historical perspective. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.71, n.1, p.3-13, fev., 1997.
- LACHANCE, M. A. The Phaff school of yeast ecology. **International Microbiology**, v.6, n.3, p.163-167, set., 2003.
- LACHANCE, M. A. Yeast Biodiversity: How Many and How Much? In: PÉTER, G.; ROSA, C. (Org.). **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Berlin Heidelberg:Springer, 2006. p.1-9.
- LACHANCE, M. A.; PANG, W. M. Predacious yeasts. **Yeast**, v.13, n.3, p.225-232, mar., 1997.
- LACHANCE, M. A.; PUPOVAC-VELIKONJA, A.; NATARAJAN, S.; SCHLAG-EDLER, B. Nutrition and phylogeny of predacious yeasts. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, n.6, p.495-505, jun., 2000.
- LACHANCE, M. A.; STARMER, W. T. Ecology and Yeasts In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Org.). **The Yeasts, a Taxonomic Study**, ed. 4, Amsterdam:Elsevier Science, 1998. p.21-30.
- LARSEN, J.; JAKOBSEN, I. Interactions between a mycophagous *Collembola*, dry yeast and the external mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. **Mycorrhiza**, v.6, n.4, p.259-264, jul., 1996.
- LAST, F. T.; PRICE, D. Yeasts associated with living plants and their environs In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Org.). **The Yeasts**, Vol. 1 (Biology of Yeasts), Londres:Anthony H. Rose and J. S. Harrison, 1961. p.183-219.
- LIBKIND, D.; BRIZZIO, S.; RUFFINI, A.; GADANHO, M.; BROOCK, M. V.; SAMPAIO, J. P. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.84, n.4, p.313-322, 2003.
- LINDSEY, B.; PUGH, G. Succession of microfungi on attached leaves of *Hippophae rhamnoides*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.6, p.61-67, 1976.
- LODDER, J. **Die Hefesammlung des Centraalbureau voor Schimmelcultures. Beiträge zu einer Monographie der Hefearten II Teil. Die Anaskosporogen Hefen, Erste Hälft.** Amsterdam:North Holland, 1934. 256 p.
- LODDER, J. **The Yeasts, A Taxonomic Study**. ed. 2, Amsterdam:North Holland Publishing Co., 1970. 1385 p.
- LODDER, J.; KREGER-VAN RIJ, N. **The Yeasts. A Taxonomic Study**. Amsterdam:North Holland Publishing Co., 1952. 713 p.

- LOPANDIC, K.; MOLNÁR, O.; PRILLINGER, H. Application of ITS sequence analysis, RAPD and AFLP fingerprinting in characterising the yeast genus *Fellomyces*. **Microbiological Research**, v.160, n.1, p.13-26, 2005.
- LUDWIG, W.; STRUNK, O.; WESTRAM, R.; RICHTER, L.; MEIER, H.; YADHUKUMAR; BUCHNER, A.; LAI, T.; STEPPI, S.; JOBB, G.; FORSTER, W.; BRETTSCHE, I.; GERBER, S.; GINHART, A. W.; GROSS, O.; GRUMANN, S.; HERMANN, S.; JOST, R.; KONIG, A.; LISS, T.; LUSSMANN, R.; MAY, M.; NONHOFF, B.; REICHEL, B.; STREHLOW, R.; STAMATAKIS, A.; STUCKMANN, N.; VILBIG, A.; LENKE, M.; LUDWIG, T.; BODE, A.; SCHLEIFER, K.-H. ARB: a software environment for sequence data. **Nucl. Acids Res.**, v.32, n.4, p.1363-1371, fev., 2004.
- LYNCH, M. D. J.; THORN, R. G. Diversity of basidiomycetes in michigan agricultural soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.11, p.7050-7056, nov., 2006.
- MAKSIMOVA, I. A.; CHERNOV, I. Y. Community structure of yeast fungi in forest biogeocenoses. **Microbiology**, v.73, n.4, p.474-481, jul., 2004.
- MANTER, D. K.; VIVANCO, J. M. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v.71, n.1, p.7-14, out., 2007.
- MARTIN, J. P. Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**, v.69, p.215-232, 1950.
- MCBRIDE, R.; HAYES, A. Phylloplane of European larch. **Transactions of the British Mycological Society**, v.69, p.39-46, 1977.
- MCCORMACK, P. J.; WILDMAN, H. G.; JEFFRIES, P. Production of antibacterial compounds by phylloplane-inhabiting yeasts and yeastlike fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.3, p.927-931, mar., 1994.
- MEDINA, A.; VASSILEV, N.; ALGUACIL, M. M.; ROLDAN, A.; AZCON, R. Increased plant growth, nutrient uptake, and soil enzymatic activities in a desertified mediterranean soil amended with treated residues and inoculated with native mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting yeast. **Soil Science**, v.169, n.4, p.260-270, abr., 2004.
- MEDINA, A.; VASSILEVA, M.; CARAVACA, F.; ROLDÁN, A.; AZCÓN, R. Improvement of soil characteristics and growth of *Dorycnium pentaphyllum* by amendment with agrowastes and inoculation with AM fungi and/or the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Chemosphere**, v.56, n.5, p.449-456, ago., 2004.
- MEN'KO, E. V.; CHERNOV, I. Y.; BYZOV, B. A. Interrelationships between yeast fungi and collembolans in soil. **Microbiology**, v.75, n.6, p.708-715, dez., 2006.
- MENNA, M. E. D. The isolation of yeasts from soil. **Journal of General Microbiology**, v.17, n.3, p.678-688, dez., 1957.
- MENNA, M. E. Yeasts from leaves of pasture plants. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.2, p.394-405, 1959.
- MENNA, M. E. D. Yeasts in New Zealand soils. **New Zealand Journal of Botany**, v.3, p.194-203, 1965.
- MENNA, M. E. D. Yeasts in Antarctic soils. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.32, n.1, p.29-38, dez., 1966.
- MENNA, M. E. D. The Mycoflora of leaves of pasture plants in New Zealand In: PREECE, T.; DICKINSON, C. (Org.). **Ecology of leaf surface micro-organisms**, New York:Academic

Press, 1971. p.159--174.

METCALFE, G.; CHAYEN, S. Nitrogen fixation by soil yeasts. **Nature**, v.174, n.4435, p.841-842, oct., 1954.

MEYER, S. A.; PHAFF, H. Taxonomic significance of the DNA base composition in yeasts In: ABEAM, D. G. (Org.). **Recent Trends in Yeast Research**, Vol. 1, Atlanta:S. A. Meyer and H.J. Phaff, 1970. p.1--29.

MIDDELHOVEN, W. J. Identity and biodegradative abilities of yeasts isolated from plants growing in an arid climate. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.72, n.2, p.81-89, august., 1997.

MILLBANK, J. Nitrogen fixation in moulds and yeasts - a reappraisal. **Arch. Mikrobiol.**, v.68, p.32-39, 1969.

MILLER, J. J.; WEBB, N. S. Isolation of yeast from soil with the aid of acid, rose bengal, and oxgall. **Soil Science**, v.77, n.3, p.197-204, 1954.

MOAWAD, H. Occurrence of yeasts in U.A.R. soils. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite**, v.126, n.3, p.280-285, 1971.

MOAWAD, H.; SALEM, S. H.; BADR, E.-D. S. M. S.; KHATER, T.; ISKANDAR, M. Yeasts in soils of Egypt. **Zentralblatt für Mikrobiologie (Zent.bl. Mikrobiol.)**, v.141, n.6, p.431-435, 1986.

MOK, W. Y.; LUIZÃO, R. C.; SILVA, M. D. S. B. D.; TEIXEIRA, M. F.; MUNIZ, E. G. Ecology of pathogenic yeasts in Amazonian soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.47, n.2, p.390-394, fev., 1984.

MONTES, M. J.; BELLOCH, C.; GALIANA, M.; GARCIA, M. D.; ANDRÉS, C.; FERRER, S.; TORRES-RODRIGUEZ, J. M.; GUINEA, J. Polyphasic taxonomy of a novel yeast isolated from antarctic environment; description of *Cryptococcus victoriae* sp. nov.. **Systematic and Applied Microbiology**, v.22, n.1, p.97-105, fev., 1999.

MYLONAKIS, E.; AUSUBEL, F. M.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J.; CALDERWOOD, S. B. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.24, p.15675-15680, nov., 2002.

NAKASE, T.; KOMAGATA, K. Taxonomic significance of base composition of yeast DNA. **Journal of General Applied Microbiology**, v.14, p.345-357, 1968.

NGUYEN, C. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. **Agronomie**, v.23, p.375-396, 2003.

O' DONNELL, K. Fusarium and its near relatives In: REYNOLDS, D. R.; TAYLOR, J. W. (Org.). **The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics**, Wallingford, UK:CAB International, 1993. p.225-233.

PANDIT, A.; MAHESHWARI, R. Life-history of *Neurospora intermedia* in a sugar cane field. **Journal of Biosciences**, v.21, n.1, p.57-79, march., 1996.

PARAMITHIOTIS, S.; MRA, M.; EHRMANN, M. A.; TSAKALIDOU, E.; SEILER, H.; VOGEL, R.; KALANTZOPOULOS, G. Polyphasic identification of wild yeast strains isolated from Greek sourdoughs. **Systematic and Applied Microbiology**, v.23, n.1, p.156-164, abr., 2000.

PAYNE, R. W.; YARROW, D.; BARNETT, J. A. The construction by computer of a diagnostic key to the genera of yeasts and other such groups of taxa. **Journal of General**

- Microbiology**, v.128, n.6, p.1265-1277, jun., 1982.
- PENNYCOOK, S. R.; NEWHOOK, F. J. Seasonal changes in the apple phylloplane microflora. **New Zealand Journal of Botany**, v.19, p.273-283, 1981.
- PETERSSON, S.; SCHNÜRER, J. *Pichia anomala* as a biocontrol agent of *Penicillium roqueforti* in high-moisture wheat, rye, barley, and oats stored under airtight conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, n.5, p.471-476, 1998.
- PHAFF, H. J. The species concept in yeast: physiologic, morphologic, genetic, and ecologic parameters. Current Developments in Yeast Research: Advances, em: STEWART G. G.; RUSSEL, I. **Proceedings of the VIth International Fermentation Symposium 1980 and Vth International Symposium on Yeasts**, Pergamon Press, 1982.
- PICCININ, E.; PIERO, R. M. D.; PASCHOLATI, S. F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.1, p.5-9, jan-fev., 2005.
- POLYAKOVA, A. V.; CHERNOV, I. I. [A new yeast species, *Candida aurita* sp. nov., from oligotrophic bogs of Western Siberia]. **Mikrobiologija**, v.71, n.3, p.387-390, 2002.
- POLYAKOVA, A. V.; CHERNOV, I. I.; PANIKOV, N. S. [Yeast biodiversity in hydromorphic soils with reference to grass-Sphagnum swamp in Western Siberia and the hammocky tundra region(Barrow, Alaska)]. **Mikrobiologija**, v.70, n.5, p.714-720, 2001.
- PRILLINGER, H.; MOLNÁR, O.; ELISKASES-LECHNER, F.; LOPANDIC, K. Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.75, n.4, p.267-283, mai., 1999.
- PRUESSE, E.; QUAST, C.; KNITTEL, K.; FUCHS, B. M.; LUDWIG, W.; PEPLIES, J.; GLOCKNER, F. O. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucl. Acids Res.**, v.35, n.21, p.7188-7196, out., 2007.
- PUGH, G. J. F.; BUCKLEY, N. G. The leaf surface as a substrate for colonization by fungi In: PREECE, T.; DICKINSON, C. (Org.). **Ecology of leaf surface micro-organisms**, New York, 1971. p.431-455.
- PUGH, G.; MULDER, J. Mycoflora associated with *Typha latifolia*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, p.273-282, 1971.
- PUNJA, Z. K. Comparative efficacy of bacteria, fungi, and yeasts as biological control agents for diseases of vegetable crops. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.19, n.1, p.315-323, 1997.
- PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v.21, n.9, p.400-407, set., 2003.
- RENKER, C.; BLANKE, V.; BÖRSTLER, B.; HEINRICHS, J.; BUSCOT, F. Diversity of *Cryptococcus* and *Dioszegia* yeasts (Basidiomycota) inhabiting arbuscular mycorrhizal roots or spores. **FEMS Yeast Research**, v.4, n.6, p.597-603, mar., 2004.
- ROBBS, P. G. **Ecologia e taxonomia de leveduras associadas a uma plantação de abacaxi do estado do Rio de Janeiro**. 1986. 241 f. Tese (Doutor em Ciências), Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- ROBBS, P. G.; HAGLER, A. N.; MENDONCA-HAGLER, L. C. Yeasts associated with a pineapple plantation in Rio de Janeiro, Brazil. **Yeast**, v.5, p.485-489, 1989.

- ROBERT, V.; GROENEWALD, M.; EPPING, W.; BOEKHOUT, T.; SMITH, M.; STALPERS, J. 2008, **CBS Yeasts database**, em <http://www.cbs.knaw.nl/yeast/Defaultpage.aspx>.
- ROBERT, V.; SZOKE, S. 2006, **BioMICS Software**, BioAware; em <http://www.cbs.knaw.nl/yeast/BioMICS.aspx>.
- ROBERTS, B. R.; WILSON, T. G. G. Nitrogen Fixation by Soil Yeasts. **Nature**, v.174, n.4435, p.842-842, out., 1954.
- ROMERO, A. I.; CARMARÁN, C. C.; LORENZO, L. E. A New Species of *Coniochaeta* with a Key to the Species Known in Argentina. **Mycological Research**, v.103, n.06, p.689-695, 1999.
- ROSE, A. H.; HARRISON, J. **The Yeasts: Biology of yeasts**. Vol. 1, London:Academic Press, 1969. 508 p.
- RUINEN, J. The Phyllosphere. II. Yeasts from the Phyllosphere of Tropical Foliage. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.29, p.425-438, 1963.
- SABNIS, R. W. **Handbook of Acid-Base Indicators**. New York: CRC Press, 2008. 398 p.
- SAMPAIO, J. P.; GADANHO, M.; SANTOS, S.; DUARTE, F. L.; PAIS, C.; FONSECA, A.; FELL, J. W. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, n. 2, p.687-697, mar., 2001.
- SAMPEDRO, I.; ARANDA, E.; SCERVINO, J. M.; FRACCHIA, S.; GARCÍA-ROMERA, I.; OCAMPO, J. A.; GODEAS, A. Improvement by soil yeasts of arbuscular mycorrhizal symbiosis of soybean (*Glycine max*) colonized by *Glomus mosseae*. **Mycorrhiza**, v.14, n.4, p.229-234, ago., 2004.
- SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, n.3, p.257-276, ago., 2002.
- SILVA, J. O.; FRANCESCHINI, S. A.; LAVRADOR, M. A. S.; CANDIDO, R. C. Performance of selective and differential media in the primary isolation of yeasts from different biological samples. **Mycopathologia**, v.157, n.1, p.29-36, jan., 2004.
- SINGER, C. **A History of Biology to about the Year 1900: A General Introduction to the Study of Living Things**. ed. 3, London: Abelard-Schuman, 1959. 580 p.
- SINGH, C. S.; KAPOOR, A. Effect of seed inoculation with yeast on root colonization by native vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi and symbiotic parameters of legumes under potted soil conditions. **Microbiological Research**, v.144, n.6, p.385-388, 1989.
- SINGH, C. S.; KAPOOR, A.; WANGE, S. S. The enhancement of root colonisation of legumes by vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi through the inoculation of the legume seed with commercial yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Plant and Soil**, v.131, n.1, p.129-133, fev., 1991.
- SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R. The occurrence of yeasts in the forest soils. **Journal of Basic Microbiology**, v.40, n.3, p.207-212, 2000.
- SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R. The diversity of yeasts in the agricultural soil. **Journal of Basic Microbiology**, v.43, n.5, p.430-436, 2003.
- SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R. The occurrence of yeasts in grass-grown soils. **Czech Mycology**, v.54, n.3-4, p.239-247, 2003.

- SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; ELSAS, J. D. V.; WERNARS, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.6, p.2614-2621, jun., 1999.
- SMITH, M. G.; ETAGES, S. G. D.; SNYDER, M. Microbial synergy via an ethanol-triggered pathway. **Molecular and Cellular Biology**, v.24, n.9, p.3874-3884, mai., 2004.
- SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy. **Nature**, v.193, p.855-860, mar., 1962.
- SPENCER, J. F.; BABIUK, L.; MORRALL, R. A. Yeasts of the matador soils of Saskatchewan and their ability to use flavonoids. **Canadian Journal of Microbiology**, v.17, n.9, p.1248-1250, set., 1971.
- SPENCER, J. F.; GORIN, P. A. Yeasts isolated from soils of citrus orchards and citrus waste disposal areas in California and Florida: flavonoid utilization. **Canadian Journal of Microbiology**, v.17, n.7, p.871-877, jul., 1971.
- STARKEY, R. L. Lipid production by a soil yeast. **Journal of Bacteriology**, v.51, n.1, p.33-50, jan., 1946.
- STARMER, W. T.; BARKER, J. S.; PHAFF, H. J.; FOGLEMAN, J. C. Adaptations of *Drosophila* and yeasts: their interactions with the volatile 2-propanol in the cactus-microorganism-*Drosophila* model system. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.39, n.1, p.69-77, 1986.
- STELLING-DEKKER, N. M. **Die Hefesammlung des Centraalbureau voor Schimmelcultures. Beiträge zu einer Monographie der Hefearten. I Teil. Die Sporogen Hefen.** Amsterdam:North Holland, 1931. 547 p.
- STUMM, C.; HERMANS, J. M.; MIDDELBEEK, E. J.; CROES, A. F.; VRIES, G. J. D. Killer-sensitive relationships in yeasts from natural habitats. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.43, n.2, p.125-128, 1977.
- TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; CANTALE, C.; DALMASTRI, C. Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. **Microbial Ecology**, v.40, n.3, p.169-176, ago., 2000.
- TORO, M. E.; ORO, N. P.; VEGA, A. D.; MATURANO, Y. P.; NALLY, M. C.; FERNANDEZ, E.; PUCHETA, E.; VÁZQUEZ, F. Diversidad de levaduras en canopias y suelos asociados con *Bulnesia retama* y *Larrea divaricata*. **Revista Argentina de Microbiología**, v.37, n.4, p.209-213, 2005.
- TRESNER, H. D.; HAYES, J. A. Sodium chloride tolerance of terrestrial fungi. **Applied Microbiology**, v.22, n.2, p.210-213, ago., 1971.
- TULADHAR, K. D. Y.; RAO, N. S. S. Interaction of yeasts and some nitrogen fixing bacteria on nodulation of legumes. **Plant and Soil**, v.84, n.2, p.287-291, jun., 1985.
- UILENBERG, G.; GOFF, W. L. Polyphasic Taxonomy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1081, p.492-497, out., 2006.
- URQUHART, E. J.; PUNJA, Z. K. Hydrolytic enzymes and antifungal compounds produced by *Tilletiopsis* species, phyllosphere yeasts that are antagonists of powdery mildew fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, n.3, p.219-229, mar., 2002.
- USDA/ARS 2009. U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service (ARS), ARS Culture Collection (NRRL), em <http://nrml.ncaur.usda.gov/>, acessado em 08/02/2009.

- VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; VOS, P. D.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v.60, n.2, p.407-438, jun., 1996.
- VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; AZCON, R.; MEDINA, A. Interactions of an arbuscular mycorrhizal fungus with free or co-encapsulated cells of *Rhizobium trifoli* and *Yarrowia lipolytica* inoculated into a soil-plant system. **Biotechnology Letters**, v.23, n.2, p.149-151, jan., 2001.
- VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; AZCON, R.; MEDINA, A. Preparation of gel-entrapped mycorrhizal inoculum in the presence or absence of *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v.23, n.11, p.907-909, jun., 2001.
- VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; AZCON, R.; MEDINA, A. Application of free and Calcium alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil-plant system. **Journal of Biotechnology**, v.91, n.2-3, p.237-242, out., 2001.
- VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; NIKOLAEVA, I. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.71, n.2, p.137-144, jun., 2006.
- VASSILEVA, M.; AZCON, R.; BAREA, J.; VASSILEV, N. Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v.35, n.5, p.693-697, fev., 2000.
- VILLA-CARVAJAL, M.; COQUE, J. J. R.; ALVAREZ-RODRÍGUEZ, M. L.; URUBURU, F.; BELLOCH, C. Polyphasic identification of yeasts isolated from bark of cork oak during the manufacturing process of cork stoppers. **FEMS Yeast Research**, v.4, n.7, p.745-750, mai., 2004.
- VINOVAROVA, M.; BAB'JEVA, I. Yeast fungi in steppe associations. **Moscow University, Soil Science Bulletin**, v.42, n.2, p.44-49, 1987.
- VISHNIAC, H. S. Simulated in situ competitive ability and survival of a representative soil yeast, *Cryptococcus albidus*. **Microbial Ecology**, v.30, n.3, p.309-320, nov., 1995.
- VISHNIAC, H. S. Biodiversity of yeasts and filamentous microfungi in terrestrial Antarctic ecosystems. **Biodiversity and Conservation**, v.5, n.11, p.1365-1378, nov., 1996.
- VISHNIAC, H. S.; HEMPFLING, W. P. Evidence of an indigenous microbiota (yeast) in the dry valleys of Antarctica. **Journal of General Microbiology**, v.112, p.301-314, 1979.
- VITAL, M. J. S.; ABRANCHES, J.; HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá Ecological Station, Roraima-Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.3, p.230-235, jul./set., 2002.
- VON ARX, J. A. A Mycologist's View of Yeasts In: SKINNER, F. A.; PASSMORE, S. M.; DAVENPORT, R. R. (Org.). **Biology and Activities of Yeasts**, London:Academic Press, 1980. p.53--61.
- VUSTIN, M. M.; KALINA, E. N.; BAB'EVA, I. P.; RESHETOVA, I. S.; SINEOKIŇ, S. P. [The antibiotic activity of yeasts in the genus *Metschnikowia kamienski*]. **Doklady Akademii Nauk SSSR**, v.313, n.1, p.207-211, 1990.
- WALKER, G. M.; MCLEOD, A. H.; HODGSON, V. J. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v.127, n.3, p.213-222, abr., 1995.
- WEBER, E. The *Lecythophora-Coniochaeta* complex: I. Morphological studies on *Lecythophora* species isolated from *Picea abies*. **Nova Hedwigia**, v.74, p.159-185, fev., 2002.

- WEBER, G.; SPAAIJ, F.; WALT, J. P. V. D. *Kluyveromyces piceae* sp. nov., a new yeast species isolated from the rhizosphere of *Picea abies* (L.) Karst. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.62, n.3, p.239-244, out., 1992.
- WEILER, F.; REHFELDT, K.; BAUTZ, F.; SCHMITT, M. J. The *Zygosaccharomyces bailii* antifungal virus toxin zygocin: cloning and expression in a heterologous fungal host. **Molecular Microbiology**, v.46, n.4, p.1095-1105, nov., 2002.
- WEILER, F.; SCHMITT, M. J. Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. **FEMS Yeast Research**, v.3, n.1, p.69-76, mar., 2003.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Org.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, New York:Academic Press, 1990. p.315-322.
- WICKERHAM, L. J. A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeasts. **Journal of Bacteriology**, v.52, n.3, p.293-301, set., 1946.
- WICKERHAM, L. J., 1951, **Taxonomy of Yeasts**, Relatório, Agricultural Research Service, U. S. Department of Agriculture-USDA.
- WICKERHAM, L. J.; BURTON, K. A. Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. **Journal of Bacteriology**, v.56, n.3, p.363-371, set., 1948.
- WISNIEWSKI, M.; BILES, C.; DROBY, S.; MCLAUGHLIN, R.; WILSON, C.; CHALUTZ, E. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii* I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.39, n.4, p.245-258, 1991.
- WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya.. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, n.12, p.4576-4579, jun., 1990.
- WUCZKOWSKI, M.; PRILLINGER, H. Molecular identification of yeasts from soils of the alluvial forest national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria ("Nationalpark Donauauen"). **Microbiological Research**, v.159, n.3, p.263-275, 2004.
- YARROW, D. Methods for isolation, maintenance and identification of yeasts In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Org.). **The Yeasts, a Taxonomic Study**, ed. 4, Amsterdam:Elsevier Science, 1998. p.13-19.
- ZACHOW, C.; BERG, C.; MULLER, H.; MEINCKE, R.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; DRUZHININA, I. S.; KUBICEK, C. P.; BERG, G. Fungal diversity in the rhizosphere of endemic plant species of Tenerife (Canary Islands): relationship to vegetation zones and environmental factors. **ISME Journal**, v.3, n.1, p.79-92, out., 2008.
- ZAMBRANO, G.; CASAS-CAMPILLO, C. Presencia y contenido de levaduras en suelos tropicales de Mexico. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v.2, n.2, p.77-88, 1959.

8. ANEXO

Meios de cultura

GYP - glicose-extrato de levedura-peptona (YARROW, 1998)

- glicose 2%
- extrato de levedura 0,5%
- peptona 1%
- agar 2% (para meio sólido)

BIL – Base de isolamento de leveduras (CARVALHO, 2007)

- glicose 0,5%
- extrato de levedura 0,5%
- sulfato de amônia 0,1%
- fosfato de sódio monobásico 0,2%
- sulfato de magnésio 0,01%
- cloreto de potássio 0,02%
- agar 2% (para meio sólido)

Obs.1: O açúcar utilizado como fonte de carbono pode ser alterado por outro, dependendo do objetivo e sua concentração também, em nossa experiência no laboratório, glicose até a concentração de 0,1% permite o crescimento de todas as culturas testadas. O extrato de levedura é utilizado como fonte de vitamina e micro nutrientes, muitas culturas apresentam colônias menores em concentrações abaixo de 0,1%.

Obs.2: Ao preparar este meio com agar (meio sólido), fazer as soluções do meio e do agar 2 vezes concentradas para o volume e autoclavar separadamente as soluções. Alternativamente, quando se usa antibiótico de amplo espectro e em altas concentrações, como por exemplo, amoxicilina 500mg.L⁻¹ + cloranfenicol 400mg.L⁻¹, realizar a esterilização com uma fervura do meio por 5 minutos em micro-ondas.

BILem (GARCIA, 2007)

À base para isolamento de leveduras (BIL) acrescentar:

- azul de metileno 0,0065%
- eosina 0,04%

Obs1: Para o BILem com 0,1 ou 0,05% de extrato de leveduras alterar a quantidade deste reagente.

Obs2: Adicionar os corantes ao agar e autoclavar separado dos demais componentes.

BILvbml (modificado de GARCIA, 2007)

À base para isolamento de leveduras (BIL) acrescentar:

- verde de bromocresol 0,02%
- ácido málico 0,5%

Ajustar com NaOH para o pH requerido, 4 ou 5,5.

CMA – extrato de milho (YARROW, 1998)

- aquecer a 60° C 42 g de milho (quebrado) em um litro d'água por uma hora;
- filtrar o extrato em gaze de algodão e depois em filtro de papel (de café);
- adicionar 18g de agar e completar o volume para um litro com água.

YM – glicose-extrato de levedura-peptona-extrato de malte (YARROW, 1998)

- glicose 1%
- extrato de levedura 0,3%
- extrato de malte 0,3%
- peptona 0,5%
- agar 2% (para meio sólido)

YMmct (meio para teste de produção de micocina) (STUMM et al., 1977)

Ao YM acrescentar:

- azul de metileno 0,0028%
 - ácido cítrico 1,05% (0,05M)
- Ajustar o pH para 4,2 com NaOH.

GYMP - glicose-extrato de levedura-extrato de malte-fosfato (HAGLER et al., 1995)

- glicose 2%
- extrato de levedura 0,5%
- extrato de malte 0,5%
- fosfato de sódio monobásico 0,5%
- agar 2% (para meio sólido)

YCB-uréia (DBB-urease) (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1991)

- YCB
- uréia 2% (esterilizar por filtração, acrescentar após autoclavagem)
- fucsina ácida 0,02%
- agar 2% (para meio sólido)

Análise de variância dos dados dos experimentos de inibição do crescimento de fungos filamentosos

Experimento concentrações de NaCl

Análise de variância da UFC de leveduras em placa com 10 mg de solo

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Tratamento	4	4,4	1,1	0,19
Erro	10	57,34	5,73	
Total	14	61,74		

$$CV = (5,73)^{1/2} \cdot 100 / (6,46) = 36,9\% \quad / \quad F_{14,10(0,05)} = 3,48$$

Análise de variância da UFC de leveduras em placa com 1 mg de solo

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Tratamento	4	53,88	13,47	2,36
Erro	10	57,34	5,73	
Total	14	111,22		

$$CV = (5,7)^{1/2} \cdot 100 / (2,2) = 108,1\% \quad / \quad F_{14,10(0,05)} = 3,48$$

Análise de variância da UFC de fungos filamentosos em placa com 10 mg de solo

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Tratamento	4	1702,93	425,3	9,16**
Erro	10	464,67	46,46	
Total	14	2167,6		

$$CV = (46,46)^{1/2} \cdot 100 / (75,6) = 9,0\% \quad / \quad F_{14,10(0,01)} = 5,99, \quad **\text{significativo a } 1\%.$$

Análise de variância da UFC de fungos filamentosos em placa com 1 mg de solo

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Tratamento	4	303,6	75,9	3,66*
Erro	10	207,3	20,73	
Total	14	510,94		

$$CV = (20,73)^{1/2} \cdot 100 / (25,26) = 18,0\% \quad / \quad F_{14,10(0,05)} = 3,48, \quad *\text{significativo a } 5\%.$$

Experimento NaCl e 2 filtragens

Análise de variância da porcentagem de ocupação da superfície das placas de Petri por micélios de fungos filamentosos 72 horas após a inoculação:

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Tratamento	11	23329,0	2120,8	70,1**
[NaCl]	2	5031,1	2515,5	83,2**
Filtros	1	2284,3	2284,3	75,5**
Diluição	1	11630,9	11630,9	384,7**
Erro	24	725,5	30,2	
Total	35	24054,5		

$$CV = (30,2)^{1/2} \cdot 100 / (21,8) = 25,1\% \quad , \quad **\text{significativo a } 1\%.$$

Análise de variância da porcentagem de ocupação da superfície das placas de Petri por micélios de fungos filamentosos 120 horas após a inoculação:

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Tratamento	11	43322,4	3938,4	14,8**
[NaCl]	2	35368,4	17684,2	66,6**
Filtros	1	3503,9	3503,9	13,2**
Diluição	1	2936,6	2936,6	11,0**
Erro	24	6367,3	265,3	
Total	35	49689,7		

$CV = (265,2)^{1/2} \cdot 100 / (52,2) = 31,1\%$,** significativo a 1%.

Protocolo para extração de ácidos nucléicos com MasterPure Yeast DNA Purification (Epicentre) (protocolo modificado a partir do manual de instruções do kit)

- Preparar tubos de 0,6 µL com 100 µL de água esterelizada;
- Pegar uma colônia de uma placa com meio sólido e passar para os 100 µL de água (deverá ficar levemente turvo ~ valor 1 na escala de Wickerham);
- Adicionar 200 µL da solução de extração;
- Agitar em vortex por alguns segundos;
- Incubar a 65 °C por 10 min (enquanto isso preparar um isopor com gelo);
- Colocar no gelo por 5 mim;
- Adicionar 150 µL da solução de precipitação;
- Agitar por 10 segundos em vortex;
- Centrifugar por 10 mim a 10.000 rpm (preparar mini-tubos de 1,5 ml com 500 uL de isopropanol);
- Retirar o sobrenadante e colocar nos tubos com isopropanol;
- Agitar por inversão do tubo;
- Centrifugar por 10 mim a 10000 rpm;
- Descartar o sobrenadante e lavar o precipitado com 500 µL de etanol 60% (cuidado para não perder o precipitado);
- Retirar o máximo que puder do etanol, se necessário centrifugar rapidamente, e deixar evaporar o restante;
- Colocar 35 µL de água ou TE (temperatura ambiente);
- Verificar em gel de agarose 0,8% utilizando 5 µL da extração.

Tabelas de Assimilação de Fontes de Nutrientes e Perfil Fisiológico dos Isolados de Sedimento de Mangue e de Plantio de Milho e de Cana-de-Açúcar.

Legenda:

n – sem dados ou teste não realizado;

w – (*weak*), crescimento fraco, negativo;

0 – ausência de crescimento;

1, 2, 3 - escala de crescimento das colônias (para maior detalhamento ver em Material e Métodos);

F – fermentação, + - resultado positivo, – - resultado negativo.

Tabela 1: Caracterização fisiológica das leveduras isoladas de solo de plantio de milho.

isolamento	reação DBB	F Glicose	C1 glucose	C2 galactose	C3 sorbose	C4 glucosam.	C5 ribose	C6 xylose	C7 L-arabin.	C8 D-arabin.	C9 rhamnose	C10 sacrose	C11 maltose	C12 trehalose	C13 AMD	C14 cellob.	C15 salicina	C17 melibios	C18 lactose	C19 raffinose	C20 melezit.	C21 Inulina	C23 glicérol	C24 eritritol	C25 ribitol	C28 D-glu	C29 D-man	C30 galact	C31 inositol	C32 glu-1-5	C34 5-k-D-glu.	C38 lactato	C 39 succin	C40 citrato	C41 metanol	C42 etanol	N1 nitrate	N2 nitrito	Ciclo. 0,01%	Ciclo. 0,1%	10%NaCl	15%NaCl	amido	M5 Celulose	M6 CMC	36° C	38° C	40° C	42° C	
<i>Candida intermedia</i>																																																		
045	-	3	3	3	3	1	w	3	w	2	2	2	3	2	3	3	3	w	2	1	3	w	1	w	2	3	3	w	w	w	w	1	1	1	0	3	1	-	3	0	w	0	0	w	w	2	-	0	-	
029	-	3	2	3	3	1	w	3	w	3	2	3	2	2	3	2	2	w	2	1	3	w	w	w	2	3	3	2	w	1	w	w	1	w	0	3	1	1	2	0	0	0	0	w	w	2	-	0	-	
007	-	3	3	3	3	1	w	3	1	3	3	3	3	3	3	3	2	w	3	1	3	1	w	w	2	3	3	2	w	3	w	w	1	2	0	3	1	1	3	0	0	0	0	w	w	2	-	0	-	
040	-	3	3	3	3	w	w	3	w	3	3	3	3	3	3	3	2	-	3	1	3	w	w	w	2	3	3	2	w	w	w	1	2	0	3	1	w	2	0	3	0	0	w	w	2	-	0	-		
077	-	3	3	3	3	w	w	3	w	3	3	3	3	2	3	3	2	w	3	w	3	w	w	w	2	3	3	2	w	2	w	1	2	0	3	1	w	2	0	3	0	0	w	w	2	-	0	-		
072	-	3	3	3	3	w	w	3	w	3	3	3	3	3	3	3	2	w	3	w	3	w	w	w	3	3	3	2	w	2	w	1	2	0	3	w	w	2	0	-	-	0	w	w	1	-	0	-		
<i>Geothricum sp.</i>																																																		
009	-	0	3	1	1	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	-	w	w	w	w	w	w	w	w	w	-	-	w	w	3	3	-	-	0	w	w	1	-	0	-	
002	-	0	3	1	1	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	-	w	w	w	w	w	w	w	w	w	-	-	w	w	3	3	-	-	0	w	w	1	-	0	-	
003	-	0	3	1	1	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	-	w	w	w	w	w	w	w	w	w	-	-	w	w	3	3	-	-	0	w	w	1	-	0	-	
033	-	0	3	1	1	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	-	w	w	w	w	w	w	w	w	w	-	-	w	w	3	3	-	-	0	w	w	1	-	0	-	
055	-	0	3	1	1	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	-	w	w	w	w	w	w	w	w	w	-	-	w	w	3	3	-	-	0	w	w	1	-	0	-	
060	-	0	3	1	1	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	-	w	w	w	w	w	w	w	w	w	-	-	w	w	3	3	-	-	0	w	w	1	-	0	-	
101	-	0	3	1	1	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	3	3	0	0	0	w	w	1	-	0	-	
<i>Pichia sp. (esporo chapéu)</i>																																																		
005	-	0	3	1	w	w	w	w	w	w	w	1	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	0	3	1	w	0	0	0	0	0	w	w	2	-	2	-
019	-	0	2	1	w	w	w	w	w	w	w	1	3	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	1	w	0	0	0	0	0	w	w	2	-	2	-	
074	-	0	3	1	w	w	w	w	w	w	w	1	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	1	w	0	0	0	0	0	w	w	2	-	2	-	

continua

isolamento	reação DBB	F Glucose	C1 glucose	C2 galactose	C3 sorbose	C4 glucosam.	C5 ribose	C6 xylose	C7 L-arabin.	C8 D-arabin.	C9 rhamnose	C10 sacarose	C11 maltose	C12 trehalose	C13 AMD	C14 cellob.	C15 salicina	C17 melibios	C18 lactose	C19 raffinose	C20 melezit.	C21 Inulina	C23 glicero1	C24 eritriol	C25 ribitol	C28 D-glu	C29 D-man	C30 galact	C31 insitol	C32 glu-1-5	C34 5-k-D-glu.	C38 lactato	C-39 succin	C40 citrato	C41 metanol	C42 etanol	N1 nitrate	N2 nitrito	Ciclo. 0,01%	Ciclo. 0,1%	10%NaCl	15%NaCl	amido	M5 Celulose	M6 CMC	36° C	38° C	40° C	42° C		
<i>Pichia membranifaciens</i>																																																			
041	-	1	3	w	w	3	w	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	0	w	w	1	-	0	-	
011	-	3	3	w	w	1	w	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	0	w	w	1	-	0	-
026	-	3	3	w	w	2	w	2	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	-	-	w	w	0	0	0	0	0	w	w	1	-	0	-	
013	+	3	3	w	w	3	w	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	0	w	w	1	-	0	-	
052	-	3	3	c	c	3	w	2	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	0	w	w	1	-	0	-	
073	-	3	3	w	w	3	w	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	s	w	w	0	3	0	0	0	0	0	0	w	w	2	-	0	-			
059	-	2	3	w	w	3	w	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	0	w	w	1	-	0	-	
006	-	3	3	w	w	3	w	2	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	0	w	w	1	-	0	-	
043	-	3	3	w	w	3	w	3	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	0	w	w	1	-	0	-	
046	-	3	3	w	w	3	w	2	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	0	w	w	1	-	0	-	
047	-	3	3	w	w	3	w	2	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	0	w	w	1	-	0	-	
057	-	3	3	w	w	3	w	2	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	-	s	0	0	0	0	0	w	w	1	-	0	-		
058	-	3	3	w	w	3	w	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	0	w	w	1	-	0	-	
082	-	3	3	w	w	3	w	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	0	w	w	1	-	0	-	
088	-	3	3	w	w	3	w	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	0	w	w	1	-	0	-	
092	-	3	3	w	w	3	w	2	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	0	w	w	1	-	0	-	
094	-	3	3	w	w	3	w	2	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	0	w	w	1	-	0	-	
103	-	3	3	w	w	3	w	2	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	0	w	w	1	-	0	-	
104	-	3	3	w	w	3	w	2	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	0	w	w	1	-	0	-	
<i>Candida cf. norvegica</i>																																																			
079	-	3	3	1	w	3	w	1	w	w	1	1	w	w	w	3	2	w	w	w	w	w	3	w	w	2	w	w	w	2	w	3	1	w	0	3	3	3	0	0	0	0	0	w	w	2	-	0	-		
012	-	3	3	1	w	w	w	2	w	w	w	1	w	w	w	3	1	w	3	w	w	w	3	w	w	3	1	w	w	3	w	2	1	w	0	3	3	3	0	0	0	0	0	w	w	0	-	0	-		
<i>Williopsis saturnus</i>																																																			
001	-	3	2	w	w	w	w	2	w	w	1	1	w	w	w	3	2	w	w	1	w	w	2	w	w	2	2	w	w	1	w	2	1	w	-	3	3	3	0	0	0	0	0	w	w	0	-	0	-		
010	-	3	3	w	w	w	w	2	w	w	w	1	w	w	w	3	2	w	w	-	w	w	3	w	w	2	2	w	w	1	w	3	1	w	0	3	3	3	0	0	0	0	0	w	w	0	-	0	-		
028	-	3	2	w	w	w	w	2	w	w	1	1	w	w	w	3	2	w	w	1	w	w	2	w	w	2	2	w	w	1	w	2	1	w	-	3	3	3	0	0	0	0	0	w	w	0	-	0	-		
056	-	3	2	w	w	w	w	2	w	w	1	1	w	w	w	3	2	w	w	1	w	w	2	w	w	2	2	w	w	1	w	3	1	w	0	3	3	3	0	0	0	0	0	w	w	0	-	0	-		
075	-	3	2	w	w	w	w	2	w	w	1	1	w	w	w	3	2	w	w	1	w	w	2	w	w	2	2	w	w	1	w	3	1	w	0	3	3	3	0	0	0	0	0	w	w	0	-	0	-		
083	-	3	3	w	w	w	w	2	w	w	1	1	w	w	w	3	2	w	w	1	w	w	2	w	w	2	2	w	w	1	w	3	1	w	-	3	3	3	0	0	0	0	0	w	w	0	-	0	-		
084	-	3	3	w	w	w	w	2	w	w	1	1	w	w	w	3	2	w	w	1	w	w	2	w	w	2	2	w	w	1	w	3	1	w	0	3	3	3	0	0	0	0	0	w	w	0	-	0	-		
091	-	3	3	w	w	w	w	2	w	w	w	1	w	w	w	3	2	w	w	-	w	w	3	w	w	2	2	w	w	1	w	3	1	w	0	3	3	3	0	0	0	0	0	w	w	0	-	0	-		
097	-	3	3	w	w	w	w	2	w	w	1	1	w	w	w	3	2	w	w	1	w	w	3	w	w	2	2	w	w	1	w	3	1	w	0	3	3	3	0	0	0	0	0	w	w	0	-	0	-		
100	-	3	2	w	w	w	w	2	w	w	1	1	w	w	w	3	2	w	w	1	w	w	2	w	w	2	2	w	w	1	w	2	1	w	-	3	3	3	0	0	0	0	0	w	w	0	-	0	-		
102	-	3	2	w	w	w	w	2	w	w	1	1	w	w	w	3	2	w	w	1	w	w	2	w	w	2	2	w	w	1	w	3	1	w	0	3	3	3	0	0	0	0	0	w	w	0	-	0	-		

continua

isolamento	reação DBB	F	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C17	C18	C19	C20	C21	C23	C24	C25	C28	C29	C30	C31	C32	C34	C38	C 39	C40	C41	C42	N1	N2	Ciclo. 0,01%	Ciclo. 0,1%	10%NaCl	15%NaCl	amido	M5	M6	36° C	38° C	40° C	42° C		
<i>Candida tropicalis</i>																																																			
032	-	3	3	3	2	w	w	3	w	w	w	3	1	3	3	2	w	w	w	w	3	w	w	w	2	3	3	w	w	2	3	w	1	w	0	3	1	w	3	2	3	0	0	w	w	2	-	2	-		
044	-	3	3	3	3	w	w	3	w	w	w	3	w	3	2	3	w	w	w	w	3	w	w	w	3	3	3	w	w	3	3	1	1	1	0	3	w	w	2	0	3	0	0	w	w	2	-	2	-		
061	-	3	3	3	2	w	w	3	w	w	w	3	w	3	3	2	w	w	w	w	3	w	w	w	3	3	3	w	w	2	2	w	1	w	0	3	1	w	2	s	3	0	0	w	w	2	-	2	-		
<i>Torulaspota cf. delbrueckii</i>																																																			
008	-	3	3	1	w	3	w	2	w	w	w	w	1	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	2	w	0	0	3	1	1	2	0	0	0	0	w	w	2	-	0	-		
081	-	3	3	w	w	w	w	3	w	w	w	2	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	s	w	w	1	1	0	3	1	1	3	3	1	0	0	w	w	2	-	0	-
080	-	2	3	3	2	w	1	3	w	w	w	3	w	w	w	w	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	s	w	s	1	1	0	3	w	1	2	1	3	w	0	w	w	2	-	0	-	
036	-	3	3	2	2	w	1	2	w	w	w	3	w	w	w	w	w	w	w	c	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	s	w	s	w	1	0	3	w	1	2	1	0	0	0	w	w	2	-	2	-	
isolados não identificados																																																			
050	+	0	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	w	2	3	1	0	0	0	0	w	w	0	-	0	-	
098	+	0	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	1	1	w	1	0	w	1	0	1	0	0	0	0	w	w	2	-	0	-
063	+	0	2	3	2	w	3	2	3	3	w	3	3	3	w	3	1	w	w	3	3	w	s	w	3	2	3	w	w	w	w	2	s	1	-	w	3	3	3	0	3	0	0	w	w	0	-	0	-		
089	+	0	2	3	w	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	1	3	3	3	3	1	w	3	3	1	3	3	3	3	3	3	1	3	w	0	3	w	w	0	0	2	0	1	w	w	0	-	0	-	
053	+	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	w	w	3	3	w	3	3	3	w	3	3	1	w	0	3	w	w	2	0	w	0	0	w	w	0	-	0	-		
027	-	w	2	3	w	3	2	2	3	3	3	2	w	1	1	2	w	3	3	3	3	w	w	3	2	w	1	3	3	2	3	w	1	w	0	3	1	w	1	0	0	0	0	w	w	2	-	0	-		
048	-	-	3	1	w	3	w	1	w	w	w	1	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	2	w	w	0	3	1	w	0	0	0	0	w	w	2	-	0	-	
067	-	0	1	w	3	2	w	1	w	w	w	2	w	w	w	w	w	w	w	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	3	3	1	1	0	0	0	w	w	2	-	0	-	
022	-	0	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	1	3	1	0	0	0	0	w	w	0	-	0	-	
023	-	0	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	1	3	2	0	0	0	0	w	w	w	-	0	-	
062	-	0	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	s	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	w	w	w	3	0	0	0	0	w	w	0	-	0	-

Tabela 2: Caracterização fisiológica das leveduras isoladas de sedimento de mangue.

isolamento	reação DBB	Ferm. Glic.	C1 glucose	C2 galactose	C3 sorbose	C4 glucosam.	C5 ribose	C6 xylose	C7 L-arabin.	C8 D-arabin.	C9 rhamnose	C10 sacarose	C11 maltose	C12 trehalose	C13 AMD	C14 cellob.	C15 salicina	C17 melibios	C18 lactose	C19 rafinose	C20 melazit.	C21 Inulina	C23 glicerol	C24 entritol	C25 ribitol	C28 D-glu	C29 D-man	C30 galact	C31 insitol	C32 glu-1-5	C34 5-k-D-glu.	C38 lactato	C 39 succin	C40 citrato	C41 metanol	C42 etanol	N1 nitrate	N2 nitrito	Ciclo. 0,01%	Ciclo. 0,1%	10%NaCl	15%NaCl	amido	M5 Celulose	M6 CMC	36°C	38°C	40°C	42°C	
<i>Candida guilliermondi</i>																																																		
s001	-	3	3	3	2	w	w	3	w	w	w	3	3	3	3	2	1	1	w	1	2	w	w	w	3	2	2	w	w	2	1	3	1	s	0	3	w	w	2	2	3	0	0	w	w	2	-	2	-	
s002	-	3	3	3	2	w	w	3	w	w	w	3	3	3	2	2	1	1	w	1	2	w	w	w	3	2	2	w	w	w	1	3	1	s	0	3	w	w	2	2	3	0	0	w	w	2	-	2	-	
s003	-	3	3	3	1	w	w	3	w	w	w	3	3	3	3	2	1	1	w	1	2	w	w	w	3	3	2	w	w	w	1	3	1	s	0	3	w	1	3	3	3	0	0	w	w	2	-	2	-	
s005	-	3	3	3	2	w	w	3	w	w	w	3	3	3	3	2	1	w	w	1	2	w	w	w	3	3	2	w	w	w	3	1	3	1	s	0	3	w	w	3	2	3	0	0	w	w	2	-	2	-
s017	-	3	3	3	2	w	w	3	w	w	w	3	3	3	3	3	1	w	w	1	3	w	w	w	3	3	3	w	w	w	2	2	1	s	0	3	w	w	3	2	3	0	0	w	w	2	-	2	-	
s023	-	3	3	3	2	w	w	3	w	w	w	3	3	3	2	2	1	2	w	1	2	w	w	w	3	2	3	w	w	w	1	3	1	w	0	3	w	1	2	1	3	0	0	w	w	2	-	2	-	
s038	-	3	3	3	2	w	w	3	w	w	w	3	3	3	2	2	1	2	w	1	2	w	w	w	3	2	3	w	w	w	1	3	1	w	0	3	w	1	2	1	3	0	0	w	w	2	-	2	-	
s039	-	3	3	3	2	w	w	3	w	w	w	3	3	3	2	2	1	2	w	1	2	w	w	w	3	2	3	w	w	w	1	3	1	w	0	3	w	1	2	1	3	0	0	w	w	2	-	2	-	
<i>Candida aff. guilliermondi</i>																																																		
s006	-	w	3	3	w	w	w	3	w	w	w	3	3	3	w	2	1	w	w	1	w	w	w	w	3	3	3	w	w	w	s	3	1	s	0	3	w	w	3	2	2	0	0	w	w	2	-	2	-	
s007	-	w	3	3	2	w	w	3	w	w	w	3	3	3	3	2	1	w	w	1	3	w	w	w	3	3	3	w	w	w	1	3	1	s	0	3	w	w	3	2	3	0	0	w	w	2	-	2	-	
<i>Debaryomyces aff. hansenii</i>																																																		
s026	-	3	3	3	3	w	w	3	3	w	w	3	3	1	3	3	2	2	w	3	2	w	w	3	1	2	2	w	w	1	w	w	w	w	-	-	1	w	0	0	3	w	0	w	w	0	-	0	-	
s028	-	3	3	3	3	w	w	3	3	w	w	3	w	1	3	3	2	2	w	3	2	w	w	3	1	2	2	w	w	1	w	w	w	w	0	3	1	w	0	0	3	w	0	w	w	w	-	0	-	
<i>Debaryomyces hansenii</i>																																																		
s009	-	2	3	3	2	w	2	3	3	w	3	2	3	2	2	2	2	3	s	3	2	w	2	3	3	2	2	2	w	w	w	w	w	w	w	0	1	w	0	3	2	3	0	0	w	w	0	-	0	-
s010	-	3	3	3	2	w	2	3	3	w	3	2	3	2	2	2	2	3	s	3	2	w	2	3	3	2	2	2	w	w	w	w	1	w	0	1	w	0	3	2	3	0	0	w	w	0	-	0	-	
s011	-	2	3	3	2	w	3	3	3	w	3	3	3	2	2	2	2	3	s	3	2	w	2	3	2	2	2	2	w	w	w	w	s	w	0	1	w	0	3	2	3	0	0	w	w	0	-	0	-	
s013	-	3	3	3	2	w	2	3	3	w	3	3	3	3	2	2	2	3	w	1	2	w	2	3	3	2	2	2	w	w	1	2	w	w	0	3	w	1	3	3	3	0	0	w	w	2	-	0	-	
s014	-	3	3	3	2	w	3	3	3	w	3	3	3	2	2	2	2	3	s	3	2	w	2	3	3	2	2	2	w	w	w	w	1	w	0	1	w	0	3	3	0	0	0	w	w	0	-	0	-	
s018	-	3	3	1	2	w	2	3	3	w	3	3	3	2	2	2	2	3	w	3	2	w	2	3	3	2	2	2	w	w	w	w	w	w	0	3	w	s	3	3	3	0	0	0	w	w	0	-	0	-
s020	-	3	3	3	2	w	2	3	3	w	3	3	3	2	2	2	2	3	s	3	2	w	2	3	3	2	2	2	w	w	w	w	w	w	0	1	w	0	3	3	3	0	0	w	w	0	-	0	-	
s021	-	3	3	1	2	w	2	3	3	w	3	3	3	2	2	2	2	3	w	3	2	w	2	3	3	2	2	2	w	w	w	w	w	w	0	3	w	s	3	3	3	0	0	w	w	0	-	0	-	
s025	-	3	3	3	3	w	2	3	2	w	3	3	3	2	2	2	1	3	w	3	2	w	w	3	2	2	2	2	w	w	1	w	w	w	-	-	1	w	3	3	3	0	0	w	w	0	-	0	-	
s027	-	3	3	3	2	w	3	3	3	w	3	3	3	2	2	2	2	3	s	3	2	w	2	3	2	2	3	3	w	w	w	w	w	w	0	3	w	0	3	3	3	0	0	w	w	0	-	0	-	
s029	-	3	3	3	2	w	2	3	3	w	3	3	3	2	2	2	2	3	s	1	2	w	2	3	2	2	3	3	w	w	w	w	w	w	-	-	w	s	2	3	3	0	0	w	w	0	-	0	-	
s030	-	3	3	3	2	w	3	3	3	w	3	3	3	2	2	2	2	3	s	1	2	w	2	3	2	2	3	3	w	w	w	w	w	w	0	3	w	s	2	3	3	0	0	w	w	0	-	0	-	
s031	-	3	3	3	2	w	3	3	3	w	3	3	3	2	2	2	2	3	s	1	2	w	2	3	2	2	3	3	w	w	w	w	w	w	0	3	w	s	3	3	0	0	0	w	w	0	-	0	-	
s033	-	3	3	1	2	w	3	1	3	w	3	3	3	2	2	2	2	3	s	1	2	w	2	3	s	2	3	3	w	w	w	w	w	w	0	w	w	0	2	3	3	0	0	w	w	0	-	0	-	
<i>Kazachstania exigua</i> (identificado por sequenciamento)																																																		
s019	-	3	3	3	2	1	c	3	2	2	3	3	3	2	2	2	1	1	w	2	2	2	w	w	2	1	3	w	w	1	w	w	w	2	-	-	1	w	3	2	0	0	0	w	w	0	-	-	-	

continua

isolamento	reação DBB	Ferm. Glic.	C1 glucose	C2 galactose	C3 sorbose	C4 glucosam.	C5 ribose	C6 xylose	C7 L-arabin.	C8 D-arabin.	C9 rhamnose	C10 sacarose	C11 maltose	C12 trehalose	C13 AMD	C14 cellob.	C15 salicina	C17 melibios	C18 lactose	C19 raffinose	C20 meleazit.	C21 Inulina	C23 glicérol	C24 eritritol	C25 ribitol	C28 D-glu	C29 D-man	C30 galact	C31 inositol	C32 glu-1-5	C34 5-k-D-glu.	C38 lactato	C-39 succin	C40 citrato	C41 metanol	C42 etanol	N1 nitrate	N2 nitrito	Ciclo. 0,01%	Ciclo. 0,1%	10%NaCl	15%NaCl	amido	M5 Celulose	M6 CMC	36° C	38° C	40° C	42° C
isolados não identificados																																																	
s004	-	3	3	3	3	w	w	1	w	w	w	3	3	3	w	2	2	1	w	1	2	w	3	w	1	w	1	w	w	w	w	3	1	3	0	3	w	s	3	3	0	0	0	w	w	w	-	0	-
s008	-	w	3	w	1	w	w	w	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	2	w	w	0	3	1	w	0	0	0	0	0	w	w	2	-	0	-
s012	-	3	3	2	2	w	w	1	w	1	w	3	3	2	2	1	1	w	w	w	2	2	w	w	w	1	3	w	w	1	w	w	2	0	3	1	w	3	2	0	0	0	w	w	0	-	0	-	
s015	-	3	3	w	1	w	w	w	w	w	w	1	w	1	w	w	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	3	w	w	w	-	-	w	w	0	0	0	0	0	w	w	2	-	0	-	
s016	-	3	3	w	2	w	w	w	w	w	w	3	2	1	w	c	1	c	w	1	c	w	w	w	3	w	w	w	3	w	3	w	w	-	-	w	w	0	0	3	0	0	w	w	2	-	0	-	
s022	-	3	3	3	2	2	2	3	3	3	3	3	3	2	2	2	3	s	3	2	w	2	3	3	2	3	2	w	w	w	w	w	2	0	3	w	0	3	2	3	0	0	w	w	2	-	0	-	
s024	-	3	3	3	1	w	w	3	n	w	w	3	w	2	3	2	w	w	w	1	w	w	w	w	2	2	3	w	w	2	w	w	-	-	1	w	2	2	3	0	0	w	w	2	-	2	-		
s032	-	3	-	-	w	w	w	w	w	w	w	3	w	3	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	3	3	2	-	-	1	w	w	w	0	0	0	w	w	2	-	2	-		
s034	-	3	3	2	w	w	3	2	2	c	1	3	w	2	2	3	2	2	w	3	2	c	w	3	w	2	2	w	w	w	w	w	w	0	3	1	w	c	0	3	3	0	w	w	3	-	3	-	

Tabela 3: Caracterização fisiológica das leveduras isoladas de cana-de-açúcar.

Isolado	reação DBB	F1 glicose	F2 galactose	F5 sacarose	C1 glicose	C2 galactose	C3 sorbose	C4 glucosamina	C5 ribose	C6 xilose	C7 L-arabinose	C8 D-arabinose	C9 ramosse	C10 sacarose	C11 maltose	C12 trealose	C13 AMD	C14 celobiose	C15 salicina	C17 melibiose	C18 lactose	C19 raffinose	C20 melezitose	C21 inulina	C23 glicérol	C24eritritol	C25 ribitol	C26 xilitol	C28 D-glucitol	C29 D-manitol	C30 galactitol	C31 inositol	C32 glu-1-5-lac.	C34 5-keto-D-g.	C38 lactato	C-39 succinato	C40 citrato	C41metanol	C42 etanol	N1 nitrito	N2 nitrito	Ciclo. 0,01 %	Ciclo. 0,1 %	10 % NaCl	15 % NaCl	prod. amido	verm. solúvel	cor rosa	36 °C	38 °C	40 °C	42 °C	C50 malato	oxalato	acetato	
Ascomicetos																																																								
Clado Saccharomyces																																																								
<i>Candida glabrata</i>																																																								
1054jF3xl1	-	+	n	n	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	3	w	w	n	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	2	w	w	0	0	2	0	-	-	-	3	3	3	3	w	w	w			
1088jF3el*	-	+	n	n	3	w	w	w	w	w	w	w	w	1	2	w	w	n	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	2	0	-	-	-	3	3	3	3	w	w	w			
<i>Torulaspota globosa</i>																																																								
738sS1el*	-	+	n	n	3	w	w	w	w	w	w	w	w	2	w	w	w	w	w	w	w	2	w	2	w	w	w	w	w	1	w	w	w	w	w	2	w	w	0	3	w	w	w	0	0	0	-	-	-	3	3	3	0	3	s	1
964jS3pda	-	+	-	+	3	w	0	w	w	w	w	w	3	w	w	w	w	w	w	w	3	w	w	w	w	w	w	w	2	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	1	0	s	0	-	-	-	3	3	3	0	3	w	w		
674sS4el	-	+	-	+	3	w	n	w	w	w	w	w	3	1	1	w	w	w	w	w	3	w	1	w	w	w	w	2	w	w	w	w	w	1	w	w	3	w	w	1	0	0	0	-	-	-	3	3	3	0	3	w	2			
900jS4pda	-	+	-	+	3	w	3	w	w	w	w	w	3	w	w	w	w	w	w	w	3	w	w	w	w	w	w	3	w	w	w	w	w	w	w	w	2	w	w	w	0	s	0	-	-	-	3	3	3	0	2	w	2			
876jS1ym*	-	+	-	+	3	w	w	w	w	w	w	1	3	w	w	w	w	n	w	1	3	w	2	w	w	w	w	2	w	w	w	w	3	w	w	0	3	w	w	1	0	0	0	-	-	-	3	3	3	0	s	w	w			
<i>Candida incommunis</i>																																																								
1113jR1ym*	-	+	-	-	2	3	3	3	1	2	w	w	w	2	3	3	3	2	n	w	w	w	w	w	3	3	w	3	3	3	1	w	w	1	0	3	2	2	3	3	0	0	-	-	-	2	0	0	n	1	2	2				
952jR1ym*	-	+	n	n	3	2	3	3	w	1	w	w	3	3	3	3	1	w	w	w	w	w	w	3	3	w	2	2	1	w	w	1	2	2	w	w	0	3	3	1	3	3	0	0	-	-	-	3	2	0	n	2	w	3		

Isolado	reação DBB	F1 glicose	F2 galactose	F5 sacarose	C1 glicose	C2 galactose	C3 sorbose	C4 glucosamina	C5 ribose	C6 xilose	C7 L-arabinose	C8 D-arabinose	C9 ramnose	C10 sacarose	C11 maltose	C12 trealose	C13 AMD	C14 celobiose	C15 salicina	C17 melibiose	C18 lactose	C19 rafinose	C20 melezitose	C21 inulina	C23 glicol	C24-eritrol	C25 ribitol	C26 xilitol	C28 D-glucitol	C29 D-manitol	C30 galactitol	C31 inositol	C32 glu-1-5-lac.	C34 5-keto-D-g.	C38 lactato	C39 succinato	C40 citrato	C41 metanol	C42 etanol	N1 nitrito	N2 nitrato	Ciclo, 0,01 %	Ciclo, 0,1 %	10 % NaCl	15 % NaCl	prod. amido	verm. solível	cor rosa	36 °C	38 °C	40 °C	42 °C	C50 malato	oxalato	acetato			
<i>Pichia aff. fermentans</i>																																																										
1114jR1pda	-	+	-	-	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	-	-	-	4	3	1	0	3	w	2
1207jR1el	-	+	n	n	3	w	w	w	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	3	w	w	w	1	3	w	w	1	w	2	1	w	0	3	w	w	0	0	0	0	-	-	-	3	3	3	0	3	w	1			
933jR1pda*	-	+	n	n	3	1	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	3	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	-	-	-	3	3	3	0	3	3	3			
953jR1ym	+	+	-	-	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	2	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	-	-	-	4	3	3	0	3	w	3			
<i>Candida aff. colliculosa</i>																																																										
131sS1pda	+	+	n	n	2	w	3	2	w	2	w	w	w	w	w	w	w	w	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	1	w	w	w	3	w	w	0	0	0	0	-	-	-	3	0	n	n	2	n	3			
<i>Candida tartarivorans</i>																																																										
948jR1pda*	-	+	-	-	2	3	2	3	w	2	1	3	1	2	3	2	3	2	2	3	3	3	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	1	1	1	w	0	2	2	w	3	3	n	0	-	-	-	2	3	3	3	2	1	w				
<i>Candida aff. tschuyae</i>																																																										
813jR3pda*	n	+	-	+	3	3	3	1	w	w	w	w	3	3	3	w	w	1	w	w	1	3	1	w	w	2	1	3	3	2	w	3	w	1	1	2	0	3	w	1	3	n	2	0	-	-	-	0	n	n	n	3	3	2				
<i>Candida cf. valida</i>																																																										
1062bjR1e	-	-	n	n	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	-	-	-	3	n	n	0	3	w	2				
<i>Clado Wickerhamiella</i>																																																										
<i>Candida aff. sorbophila</i>																																																										
617sF1xl1	-	-	n	n	2	3	1	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	2	3	w	3	w	w	w	w	w	w	1	w	0	0	w	w	3	3	2	0	-	-	-	2	3	3	0	w	w	w			
744sF3xl1	-	-	n	n	3	2	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	2	2	w	3	w	w	w	w	w	w	0	1	w	w	4	4	3	w	-	-	-	3	3	3	0	2	w	w					
790jR3pda	-	-	n	n	2	3	2	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	n	w	w	w	w	w	w	w	2	2	2	3	w	w	w	w	w	w	0	0	w	w	3	3	2	0	-	-	-	3	3	3	w	w	w	w					
848jR2ym	-	-	n	n	1	2	2	w	w	1	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	2	3	w	3	w	w	w	w	w	w	w	0	0	w	w	3	3	1	0	-	-	-	2	n	3	0	w	w	w					
<i>Candida aff. azyma</i>																																																										
268sR3ym	-	-	n	n	3	3	3	w	w	1	w	w	w	3	3	3	3	w	w	w	w	w	3	w	1	w	w	2	2	3	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	3	3	3	3	-	-	-	0	n	n	n	1	w	w				
300sR2pda	-	-	n	n	3	3	3	w	w	1	w	w	w	3	3	3	3	w	w	w	w	w	3	w	3	w	w	3	2	3	w	w	1	w	w	w	w	2	w	w	3	3	3	3	-	-	-	0	n	n	n	1	w	1				
797jR3pda	-	-	n	n	3	3	3	w	w	1	w	w	w	3	3	3	3	w	w	w	w	w	3	w	2	w	w	2	2	2	w	w	w	w	w	w	3	w	w	3	3	3	2	-	-	-	0	n	n	n	1	w	1					
831jR4ym	-	-	n	n	3	3	3	w	w	1	w	w	w	3	3	3	3	w	w	w	w	w	3	w	2	w	w	2	2	3	w	w	w	w	w	w	3	w	w	3	3	3	2	-	-	-	0	n	n	n	1	w	1					
850jR2ym	-	-	n	n	3	3	3	w	w	1	w	w	w	2	3	3	3	w	w	w	w	w	2	w	3	w	w	3	1	3	w	w	1	w	w	w	n	n	w	w	3	3	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	w				
835jR4pda	-	-	n	n	2	3	3	w	w	2	1	w	w	2	3	3	3	w	n	w	w	w	3	w	2	w	w	2	3	2	w	w	w	w	w	w	0	2	w	w	3	3	w	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	w				
<i>Candida aff. drosophilae</i>																																																										
398sF3xl	-	-	n	n	2	3	2	w	w	1	w	w	w	1	1	w	w	w	n	w	w	1	w	w	w	2	3	w	3	w	w	w	w	w	w	0	0	w	w	3	3	2	0	-	-	-	3	1	0	n	w	w	w					
<i>Clado Wickerhamomyces/ Lindnera</i>																																																										
<i>Pichia caribbica</i>																																																										
618sF1xl1*	-	+	+	+	3	3	2	w	w	3	2	2	1	3	3	2	3	3	2	2	w	3	3	2	3	2	2	3	3	3	1	w	w	w	w	1	2	0	3	w	w	3	3	3	0	-	-	-	3	3	3	3	3	2	1			
1199jF4x	-	+	n	n	3	3	2	w	1	3	3	1	1	3	3	3	3	3	3	2	w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	2	w	w	w	w	2	2	0	3	w	w	3	3	3	3	-	-	-	3	3	3	0	3	w	2			
625sF2xl1	-	+	+	+	3	3	1	1	1	3	3	2	w	3	3	3	3	3	w	2	w	2	3	3	3	w	3	2	3	3	3	w	w	w	w	1	2	0	3	w	w	3	3	2	0	-	-	-	3	3	0	n	2	3	w			
954jR1ym	-	+	+	+	3	3	2	2	1	3	3	2	1	3	3	2	3	3	2	2	w	3	3	2	3	w	3	3	3	3	2	w	1	w	w	w	2	0	3	w	w	3	3	2	0	-	-	-	3	3	2	2	3	w				

Isolado	reação DBB	F1 glicose	F2 galactose	F5 sacarose	C1 glicose	C2 galactose	C3 sorbose	C4 glucosamina	C5 ribose	C6 xilose	C7 L-arabinose	C8 D-arabinose	C9 ramnose	C10 sacarose	C11 maltose	C12 trealose	C13 AMD	C14 celobiose	C15 salicina	C17 melibiose	C18 lactose	C19 rafinose	C20 melezitose	C21 inulina	C23 glicerol	C24 eritritol	C25 ribitol	C26 xilitol	C28 D-glucitol	C29 D-mannitol	C30 galactitol	C31 inositol	C32 glu-1-5-lac.	C34 5-keto-D-g.	C38 lactato	C39 succinato	C40 citrato	C41 metanol	C42 etanol	N1 nitrato	N2 nitrito	Ciclo. 0,01 %	Ciclo. 0,1 %	10 % NaCl	15 % NaCl	prod. amido	verm. solúvel	cor rosa	36 °C	38 °C	40 °C	42 °C	C50 malato oxalato	acetato			
<i>Pezyzomycotina</i> Clado fungos leveduriformes																																																									
<i>Aureobasidium pullulans</i>																																																									
402sF3xl*	-	-	n	n	2	2	4	w	2	2	2	2	2	1	2	3	3	3	2	2	1	2	w	2	3	w	3	2	3	3	2	1	2	w	w	w	w	n	w	3	2	0	0	3	0	-	-	-	0	n	n	n	2	3	w		
1011jF3pda*	-	-	n	n	1	1	2	w	1	2	1	1	2	w	1	2	2	2	w	2	w	2	2	w	3	3	w	w	w	3	3	1	2	1	w	w	w	n	2	3	2	0	0	2	0	+	-	-	-	3	0	0	n	w	1	w	
459sF4ym	-	-	n	n	2	2	2	w	2	2	2	1	2	2	2	2	w	2	1	2	1	3	1	w	2	2	w	3	1	2	w	1	1	w	w	w	0	1	2	s	0	0	2	0	-	-	-	0	n	n	n	2	2	w			
488sF1pda	-	-	n	n	1	1	w	w	w	2	2	1	2	2	2	2	w	3	1	w	2	2	1	w	2	2	w	3	1	2	w	1	1	2	w	w	w	1	1	2	s	0	0	1	0	-	-	-	0	n	n	n	1	s	w		
1049jF3xl	-	-	n	n	2	1	2	w	2	2	2	3	2	2	2	2	w	2	1	2	1	3	1	w	2	2	w	3	1	2	w	1	1	w	w	w	0	w	2	2	0	0	3	0	-	-	-	0	n	n	n	2	1	w			
537sF2pda*	-	-	n	n	2	1	w	w	?	2	2	w	1	2	2	2	w	3	1	w	1	2	1	w	3	2	c	3	1	3	w	1	1	w	w	w	w	2	2	s	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	2	2	w			
1149jF2ym	-	-	n	n	2	1	2	w	2	2	2	w	2	3	2	2	2	2	w	2	1	3	w	w	2	2	w	2	w	2	?	1	1	2	w	w	w	0	2	3	2	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	1	2	w		
413sF4xl	-	-	n	n	1	1	4	w	2	2	2	w	2	2	2	3	2	2	2	1	1	2	w	w	3	3	2	3	3	3	w	3	1	2	w	w	w	0	n	3	2	0	0	4	s	-	-	-	0	n	n	n	w	w	w		
<i>Mycosphaerella graminicola</i>																																																									
450sF4pda*	-	-	n	n	3	1	3	w	w	3	3	1	2	2	3	3	2	3	3	2	3	3	3	w	3	3	2	3	2	3	1	1	w	2	w	w	w	0	0	w	w	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	2	0		
441sF4pda*	+	-	n	n	3	3	2	w	3	3	3	3	3	1	3	3	w	3	n	3	3	3	3	w	3	3	s	3	1	3	2	1	1	3	1	w	w	1	2	2	s	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	w		
982jF3ym	n	-	n	n	2	3	2	w	2	2	2	3	2	1	3	3	w	2	n	3	w	3	2	w	2	2	s	2	w	3	2	1	1	2	w	w	w	1	3	1	n	w	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	w	
1007jF3pda*	-	-	n	n	3	3	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	w	w	w	w	3	3	3	w	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	n	0
985jF3ym	-	-	n	n	3	3	3	1	3	3	3	3	3	v	3	3	1	3	1	3	3	3	3	w	3	3	v	3	3	3	v	3	3	3	w	w	w	1	2	3	v	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	n	0		
982F3ym	-	-	n	n	2	2	3	w	2	3	3	2	3	v	2	3	w	3	2	3	3	3	2	w	v	3	3	2	3	2	2	2	2	w	w	w	w	1	3	v	w	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	n	0		
1001jF3pda	-	-	n	n	2	2	3	w	2	3	2	3	3	v	2	3	w	3	w	3	3	3	w	w	3	3	3	3	3	3	2	2	2	3	w	w	w	1	1	3	0	2	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	n	0		
1017jF3ym	-	-	n	n	3	3	3	1	3	3	3	3	3	3	2	3	1	3	w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	w	w	w	2	3	2	w	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	n	0	
1019jF3ym	-	-	n	n	2	2	3	w	3	3	3	2	3	1	3	2	w	2	2	3	3	3	3	w	3	3	3	3	s	2	2	2	1	3	w	w	n	n	3	0	w	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	n	0		
1010jF3pda	-	-	n	n	1	2	3	w	w	2	3	2	2	1	3	1	w	2	w	2	3	3	2	w	3	3	3	2	w	3	1	2	1	3	w	w	w	0	w	2	w	w	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	2	0	0	
1022jF3ym	-	-	n	n	2	3	3	w	w	3	3	2	2	2	3	1	w	2	w	2	3	3	2	w	3	3	3	2	w	3	1	2	1	3	w	w	w	0	w	2	w	w	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	2	0	0	
1166jF4ym	-	-	n	n	3	3	3	w	3	2	2	s	3	w	3	3	w	3	w	3	3	3	3	w	2	3	2	2	s	3	2	2	3	2	w	w	w	w	3	3	s	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	1	w	0		
<i>Lecytophora aff. decumbens</i>																																																									
200sS2ym*	-	-	n	n	1	2	c	2	?	1	2	w	c	1	1	3	w	2	c	3	2	1	w	w	3	1	2	1	c	c	c	n	c	w	w	w	w	3	1	1	n	0	0	0	0	+	-	-	3	w	w	w	1	n	w		
113sS1ym*	+	-	n	n	2	2	w	2	w	2	w	w	w	2	1	2	w	3	w	2	2	w	w	w	2	w	w	w	2	w	w	w	2	w	w	w	w	0	3	1	2	0	0	0	0	+	-	-	3	w	3	3	1	w	w		
<i>Lecytophora sp. 1</i>																																																									
743sF4xl	-	-	n	n	3	3	2	1	3	3	3	2	3	2	2	w	2	w	3	3	3	3	w	3	3	1	2	2	3	3	w	1	1	w	w	w	0	3	3	3	0	0	3	0	-	-	-	3	n	n	n	2	3	0			
<i>Exophilia spinifera</i>																																																									
217sS2pda*	-	-	n	n	2	3	2	2	1	2	2	3	3	1	2	2	1	2	1	2	w	3	1	w	3	3	1	3	2	2	1	w	2	3	2	w	w	1	2	3	3	3	3	0	0	-	-	-	2	0	0	n	1	3	1		
fungo filam. sp. 1																																																									
1006jF3pda	-	-	n	n	2	2	2	w	w	2	2	1	w	2	1	2	1	1	w	2	1	2	w	w	w	2	w	1	1	w	w	1	2	w	w	w	w	n	w	2	2	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	1	1	w		

continua

Isolado	reação DBB	F1 glicose	F2 galactose	F5 sacarose	C1 glicose	C2 galactose	C3 sorbose	C4 glucosamina	C5 ribose	C6 xilose	C7 L-arabinose	C8 D-arabinose	C9 ramnose	C10 sacarose	C11 maltose	C12 trealose	C13 AMD	C14 celobiose	C15 salicina	C17 melibiose	C18 lactose	C19 rafinose	C20 melezitose	C21 inulina	C23 glicol	C24 eritritol	C25 ribitol	C26 xilitol	C28 D-glucitol	C29 D-mannitol	C30 galactitol	C31 inositol	C32 glu-1-5-lac.	C34 5-keto-D-g.	C38 lactato	C39 succinato	C40 citrato	C41 metanol	C42 etanol	N1 nitrato	N2 nitrito	Ciclo. 0,01 %	Ciclo. 0,1 %	10 % NaCl	15 % NaCl	prod. amido	verm. solúvel	cor rosa	36 °C	38 °C	40 °C	42 °C	C50 malato	oxalato	acetato
Basidiomicetos																																																							
Basidiomiceto sp. 1																																																							
1085jR4xl	-	-	n	n	3	w	3	3	w	3	w	w	w	3	1	3	3	3	2	w	w	w	2	w	3	w	3	3	3	3	w	1	1	3	w	1	w	0	3	3	3	3	3	0	0	-	-	-	3	3	0	n	3	w	3
833jR4ym	n	-	n	n	3		3	3	w	3	w	w	w	2	3	3	3	3	2	w	1	1	1	w	3	1	3	1	3	3	w	2	3	1	w	w	1	0	3	3	3	3	3	0	0	-	-	-	3	1	0	n	2	3	2
Basidiomiceto sp. 2																																																							
257sR3ym	-	-	n	n	2	2	3	w	w	2	1	w	w	3	3	3	3	1	n	w	1	2	3	w	1	w	2	3	3	3	w	w	3	w	w	w	w	0	3	3	2	3	3	0	0	-	-	-	2	0	0	n	w	w	w
Basidiomiceto sp. 3																																																							
155jF4pda	+	-	n	n	3	3	3	2	2	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	1	3	2	3	2	3	3	2	3	3	1	3	w	w	1	2	3	3	0	0	3	0	-	+	-	3	n	n	0	3	n	0
Basidiomiceto sp. 4																																																							
914jR2pda	+	-	n	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	4	3	w	4	4	3	2	3	3	1	3	2	w	2	w	1	0	3	4	4	0	0	4	0	-	-	-	3	3	3	1	w	0	
1197jF1pda	+	-	n	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	4	3	1	4	4	3	2	3	3	1	2	3	w	2	1	w	w	3	4	3	3	0	2	0	-	-	-	3	0	n	n	2	w	0
Classe Hymenomycetous / Ordem Tremellales																																																							
<i>Bullera aff. coprosmaensis</i>																																																							
346sR4pda*	+	-	n	n	3	2	w	w	w	w	3	3	3	3	2	3	2	3	1	3	s	3	3	1	1	3	1	3	3	2	3	3	3	1	1	w	0	w	1	2	2	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	2	w	0	
1159jF4pda	+	-	n	n	2	2	1	w	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	1	2	w	3	2	w	w	3	w	w	1	2	w	2	3	2	1	w	w	0	0	w	w	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	2	2	0
338sR4pda*	+	-	n	n	3	3	1	w	3	2	3	3	2	3	3	2	1	3	w	3	w	3	3	w	w	3	1	3	3	2	3	1	3	3	1	w	w	0	0	1	1	2	0	1	0	-	-	-	0	n	n	n	3	w	0
263sR3ym	+	-	n	n	2	2	1	w	w	3	3	2	3	3	3	2	2	3	w	2	w	3	3	w	w	3	2	2	3	3	2	3	1	w	w	w	0	0	1	3	2	0	1	0	-	-	-	0	n	n	n	2	w	0	
998jF3pda*	+	-	n	n	3	3	w	w	2	3	3	3	3	2	3	3	2	3	w	3	w	3	3	w	w	3	3	3	3	3	s	3	3	1	2	w	0	0	1	w	s	0	s	0	-	-	-	3	0	0	n	w	0	0	
527sF2pda*	+	-	n	n	3	3	w	w	3	3	3	3	3	2	3	2	1	2	w	3	w	3	3	w	w	3	3	3	3	3	2	3	3	1	2	1	0	0	w	3	2	0	2	0	-	-	-	0	n	n	n	2	w	0	
<i>Cryptococcus aff. gilvescens</i>																																																							
1142jF2ym*	+	-	n	n	3	w	w	w	w	2	2	2	w	2	3	2	3	2	w	w	w	w	3	w	w	w	w	w	3	w	w	2	w	w	w	s	w	0	0	w	w	3	0	s	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	0
984jF3ym*	+	-	n	n	3	2	2	w	2	3	3	3	w	2	3	3	3	3	1	w	w	1	3	w	w	2	2	1	2	3	w	2	1	1	w	2	w	0	0	w	w	3	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	0	0
<i>Cryptococcus aff. laurentii</i>																																																							
1095jS1xl	+	-	n	n	3	3	w	2	w	3	3	2	3	3	3	1	2	2	w	3	3	3	3	w	w	3	3	3	w	3	2	2	2	3	1	1	w	n	n	1	w	s	0	3	0	-	-	-	3	w	n	n	2	1	0
1093jS1xl	+	-	n	n	3	3	w	2	2	3	3	1	2	3	3	s	2	3	w	3	2	3	3	w	w	3	3	3	1	3	3	2	2	3	1	1	w	0	3	1	1	s	0	3	0	-	-	-	2	2	n	2	1	0	
169sS4pda*	+	-	n	n	3	2	w	3	w	3	3	1	3	3	3	2	1	3	w	2	3	3	3	w	w	2	3	3	w	3	2	3	3	3	w	2	w	0	3	1	1	s	0	3	0	+	-	-	3	0	n	n	3	w	0
536sF2pda	+	-	n	n	3	3	1	3	1	3	3	2	3	3	3	2	3	3	2	3	3	3	3	1	w	3	3	3	1	3	3	2	3	3	2	1	1	0	3	1	w	s	0	3	0	+	-	-	2	2	0	n	3	2	0
411sF4xl	+	-	n	n	3	3	w	3	w	3	3	w	3	3	3	w	3	3	1	3	w	3	3	1	w	3	3	3	w	2	3	2	3	3	2	2	w	0	3	s	1	s	0	3	0	-	-	-	3	0	n	n	3	w	0
431sR3xl	+	-	n	n	3	3	w	2	w	3	3	w	2	3	3	s	3	2	2	3	3	3	3	w	w	3	3	2	w	2	2	2	3	1	1	w	0	3	w	w	s	0	3	0	-	-	-	2	w	0	n	2	1	0	
<i>Cryptococcus aff. luteolus</i>																																																							
487sF1pda*	+	-	n	n	3	3	w	w	3	3	3	3	3	2	3	2	1	2	w	3	w	3	3	w	w	3	2	3	3	3	3	2	3	3	2	2	1	0	0	w	2	3	1	s	0	-	-	-	0	n	n	n	2	w	0
<i>Cryptococcus aff. taibaiensis</i>																																																							
581sF3ym*	+	-	n	n	2	2	2	1	2	2	3	s	3	w	3	w	w	3	w	3	3	3	2	w	w	3	1	w	w	2	3	3	3	2	1	w	w	0	0	w	1	n	0	3	3	+	-	-	0	n	n	n	2	s	0

continua

Isolado	reação DBB	F1 glicose	F2 galactose	F5 sacarose	C1 glicose	C2 galactose	C3 sorbose	C4 glucosamina	C5 ribose	C6 xilose	C7 L-arabinose	C8 D-arabinose	C9 ramnose	C10 sacarose	C11 maltose	C12 trealose	C13 AMD	C14 celobiose	C15 salicina	C17 melibiose	C18 lactose	C19 rafinose	C20 melezitose	C21 inulina	C23 glicol	C24 eritritol	C25 ribitol	C26 xilitol	C28 D-glucitol	C29 D-mannitol	C30 galactitol	C31 inositol	C32 glu-1-5-lac.	C34 5-keto-D-g.	C38 lactato	C39 succinato	C40 citrato	C41 metanol	C42 etanol	N1 nitrato	N2 nitrito	Ciclo. 0,01 %	Ciclo. 0,1 %	10 % NaCl	15 % NaCl	prod. amido	verm. solúvel	cor rosa	36 °C	38 °C	40 °C	42 °C	C50 malato	oxalato	acetato
<i>Cryptococcus cellulolyticus</i>																																																							
438sF4pda	+	-	n	n	2	3	w	3	2	3	3	3	3	2	3	3	3	3	1	3	2	3	3	1	3	w	3	3	3	2	3	2	1	w	w	0	2	1	w	3	3	s	0	-	-	-	0	n	n	n	1	1	0		
1144jF2ym	+	-	n	n	2	3	2	2	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	2	3	1	3	3	w	2	3	2	3	3	3	3	3	3	3	1	2	w	w	1	2	2	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	2	n	0
454sF4ym	+	-	n	n	3	3	w	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	2	3	3	w	1	w	3	2	3	3	3	2	3	3	w	w	w	0	2	1	1	0	3	2	0	-	-	-	0	n	n	n	1	w	0	
194sS4ym*	+	-	n	n	2	3	w	3	2	3	3	3	3	2	3	3	3	3	w	3	3	3	w	1	w	2	3	2	3	3	1	3	2	w	2	w	w	1	2	w	0	0	3	0	-	-	-	0	n	n	n	2	1	0	
473sF1pda	+	-	n	n	3	w	w	s	2	3	3	3	3	3	3	3	2	3	n	3	3	3	2	w	w	w	3	3	3	3	2	3	2	w	2	w	0	2	w	w	2	3	1	0	-	-	-	0	n	n	n	2	1	w	
461sF4ym	+	n	n	n	3	3	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	w	2	3	3	w	w	w	3	3	3	1	3	2	3	3	w	w	w	w	3	w	w	2	3	1	0	-	-	-	0	n	n	n	3	w	0	
435sF4pda	+	n	n	n	3	3	w	3	3	3	3	3	2	3	3	3	2	3	1	3	3	3	w	3	w	3	3	3	3	3	3	3	w	w	w	w	1	w	w	s	s	1	0	-	+	-	0	n	n	n	1	w	0		
480sF1pda*	+	-	n	n	3	3	w	w	1	2	2	2	2	3	3	3	2	3	w	1	2	3	w	3	w	w	3	3	2	3	w	2	w	w	w	w	0	2	1	w	0	0	2	0	-	-	-	0	n	n	n	1	w	0	
458sF4ym*	+	-	n	n	2	3	w	3	w	3	3	3	3	1	3	3	2	3	w	2	2	3	w	1	w	3	3	2	3	2	3	2	w	1	w	n	1	w	w	3	3	s	0	-	-	-	0	n	n	n	2	2	0		
<i>Cryptococcus flavescens</i>																																																							
247sR3pda*	+	-	n	n	3	3	w	w	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	2	3	3	3	1	3	3	3	3	2	3	3	2	1	1	0	3	2	1	0	0	2	0	-	-	-	0	n	n	n	3	2	0			
408sF1xl	+	-	n	n	3	3	w	w	2	3	2	2	3	3	3	2	2	3	2	3	3	3	1	2	3	3	3	3	3	3	3	3	w	1	w	w	3	3	3	0	0	3	0	+	-	-	0	n	n	n	3	w	0		
430sR3xl	+	-	n	n	3	3	w	w	1	3	3	2	2	3	3	3	1	3	w	2	2	3	w	1	2	3	3	3	3	2	2	3	1	1	w	0	3	2	2	0	0	2	0	-	-	-	0	n	n	n	3	w	0		
639sS4xl1*	+	-	n	n	3	3	w	w	3	2	3	w	3	3	3	3	2	3	2	3	3	3	w	w	w	w	2	3	3	2	3	3	1	w	w	w	0	0	w	w	3	3	3	0	-	-	-	3	0	0	n	2	w	0	
<i>Cryptococcus flavus</i>																																																							
1161jF4ym	+	-	n	n	3	2	w	w	3	3	3	2	2	3	3	2	3	2	1	2	1	2	3	w	w	2	w	1	1	1	w	1	3	w	w	w	w	2	w	w	0	0	0	0	-	-	-	3	0	n	n	2	w	0	
1173jF1ym	+	-	n	n	3	2	w	w	3	3	3	1	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	w	w	3	w	3	2	3	2	2	3	3	w	w	w	0	3	3	s	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	3	n	0	
969jS3pda*	+	-	n	n	3	3	w	w	3	w	2	1	2	3	3	3	2	2	w	3	w	3	w	w	3	w	w	s	w	1	2	w	w	w	0	0	w	w	0	0	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	1	1	0	
1190jF1pda	-	-	n	n	2	3	w	w	3	3	3	1	3	3	3	3	3	n	3	2	3	3	w	w	2	2	3	3	3	2	2	3	2	1	1	0	w	w	s	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	1	1	w		
1130jF2ym*	+	-	n	n	3	3	w	w	3	3	3	2	3	3	3	3	3	1	3	1	3	3	w	w	3	1	3	2	3	3	3	2	3	3	2	2	1	0	0	w	w	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	2	2	0
<i>Cryptococcus laurentii</i>																																																							
160sS3pda	+	-	n	n	3	2	w	3	w	3	3	3	3	3	3	2	2	3	w	3	3	3	w	w	3	3	3	w	3	2	2	3	3	2	2	w	w	3	1	w	0	0	1	0	+	-	-	3	0	n	n	3	w	w	
1082jR4xll	n	-	n	n	2	3	2	w	1	2	w	w	w	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	n	w	w	w	3	s	3	3	1	w	0	2	1	-	1	0	w	0	n	n	-	w	n	0	n	n	n	
1109jR1ym	+	-	n	n	2	3	w	3	w	2	2	2	2	3	3	2	3	3	w	3	2	3	w	w	3	3	2	w	1	3	3	2	3	2	1	w	0	2	2	w	s	0	3	0	-	-	-	3	0	n	n	2	1	0	
189sS4ym*	+	-	n	n	2	3	w	3	w	3	3	2	3	3	3	2	3	3	w	3	3	3	w	w	3	3	3	w	2	3	w	3	2	1	2	1	0	3	1	w	0	0	3	0	+	-	-	0	n	n	n	2	w	0	
349sR4pda*	+	-	n	n	2	3	w	3	w	1	2	w	2	2	3	1	2	2	w	2	2	3	w	w	2	3	2	w	1	3	w	2	w	1	w	w	0	3	w	w	0	0	3	0	-	-	-	2	0	0	n	1	1	0	
412sF4xl*	+	-	n	n	2	3	w	2	w	3	3	1	3	3	3	1	3	3	2	3	s	3	w	w	3	3	3	w	3	3	3	3	2	3	2	1	w	0	3	1	1	s	0	3	0	-	-	-	2	3	3	0	3	s	0
828jR4ym*	+	-	n	n	2	3	w	2	w	3	2	2	2	3	3	2	2	3	w	3	2	3	w	w	2	3	3	w	2	3	3	w	2	1	2	1	w	0	3	w	w	s	0	3	0	-	-	-	3	0	w	n	3	1	0
250sR3pda*	+	-	n	n	3	3	w	3	1	3	3	2	3	3	3	2	2	3	1	2	3	3	w	w	3	3	3	1	3	3	2	3	3	1	2	w	1	3	1	1	0	0	2	0	+	-	-	3	0	n	n	3	w	0	
719sS1xl*	+	-	n	n	3	3	w	3	1	3	3	2	3	2	3	1	2	3	1	3	3	3	1	w	3	3	2	w	2	2	2	3	3	2	1	w	0	3	1	w	s	0	3	0	-	-	-	3	0	0	n	2	2	0	
903jS4ym*	+	-	n	n	3	3	w	3	1	3	3	3	3	2	3	1	3	3	1	3	3	3	2	1	3	3	3	w	2	2	2	3	3	2	1	w	0	w	1	w	s	0	3	0	-	-	-	0	n	n	n	2	2	0	
128sS1pda*	+	-	n	n	3	3	w	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	3	3	3	w	w	3	3	3	w	3	3	3	3	3	3	w	2	w	w	3	1	1	0	0	3	0	+	-	-	3	0	n	n	3	w	s

continua

Isolado	reação DBB	F1 glicose	F2 galactose	F5 sacarose	C1 glicose	C2 galactose	C3 sorbose	C4 glucosamina	C5 ribose	C6 xilose	C7 L-arabinose	C8 D-arabinose	C9 ramnose	C10 sacarose	C11 maltose	C12 trealose	C13 AMD	C14 celobiose	C15 salicina	C17 melibiose	C18 lactose	C19 rafinose	C20 melezitose	C21 inulina	C23 glicerol	C24-eritrol	C25 ribitol	C26 xilitol	C28 D-glucitol	C29 D-mannitol	C30 galactitol	C31 inositol	C32 glu-1-5-lac.	C34 5-keto-D-g.	C38 lactato	C.39 succinato	C40 citrato	C41 metanol	C42 etanol	N1 nitrato	N2 nitrito	Ciclo. 0,01 %	Ciclo. 0,1 %	10 % NaCl	15 % NaCl	prod. amido	verm. solível	cor rosa	36 °C	38 °C	40 °C	42 °C	C50 malato	oxalato	acetato		
<i>Cryptococcus nemorosus</i>																																																									
1044jF2xl*	+	-	n	n	3	3	w	s	2	1	3	w	2	3	3	s	1	2	w	2	3	3	3	w	w	w	w	w	3	3	2	2	2	3	w	1	w	0	0	1	w	2	0	1	0	-	-	-	0	n	n	n	1	w	0		
999jF3pda	+	-	n	n	3	3	2	w	3	3	2	1	3	3	3	3	1	3	n	1	3	3	3	w	w	w	1	1	3	3	3	2	3	2	w	1	w	0	0	2	w	2	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	1	w	w		
621sF1xl1*	+	-	n	n	3	3	2	w	2	3	3	3	3	3	3	2	2	3	1	3	3	3	3	1	1	2	3	3	3	3	2	3	3	3	2	1	1	0	3	2	1	2	0	2	0	-	-	-	0	n	n	n	2	1	0		
392sF2xl*	+	-	n	n	3	3	w	1	3	2	2	3	2	3	3	3	w	2	w	3	2	3	3	w	w	w	2	2	3	2	2	2	1	1	w	w	w	0	0	w	w	s	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	0		
457sF4ym	+	-	n	n	3	3	2	w	2	3	3	w	3	3	3	3	2	3	2	3	2	3	3	w	w	w	w	w	1	3	2	2	3	3	w	1	1	0	0	1	w	0	0	s	0	-	-	-	1	w	n	n	2	2	0		
689sF4xl1*	+	-	n	n	3	3	w	w	3	2	2	w	2	2	3	2	2	3	w	2	2	3	3	w	w	w	w	w	3	1	3	w	2	w	w	w	w	0	0	w	w	s	0	1	0	-	-	-	0	n	n	n	1	w	0		
1198sF3xl1	+	-	n	n	3	2	1	1	3	3	3	s	3	3	3	3	2	3	1	2	3	3	3	w	w	w	w	w	1	3	2	2	3	2	w	w	w	0	w	1	1	0	0	-	-	-	0	n	n	n	2	w	0				
987jF3ym	-	-	n	n	3	3	s	w	3	2	2	2	2	3	2	1	2	2	c	3	3	3	3	w	1	w	2	2	2	2	1	w	1	2	w	w	w	0	w	c	c	s	0	3	0	-	-	-	0	n	n	n	3	n	1		
428sR3xl	+	-	n	n	3	2	1	w	2	3	2	3	3	3	3	3	2	3	2	3	3	3	3	w	3	2	3	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	w	w	2	3	3	0	0	3	0	+	-	-	-	0	n	n	n	3	w	0
<i>Cryptococcus podzolicus</i>																																																									
130sS1pda	+	-	n	n	3	3	2	w	2	3	3	3	3	3	3	3	2	3	w	3	3	3	3	w	w	2	w	3	3	2	3	3	3	3	w	w	w	w	0	1	2	3	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	n	0		
904sS4ym	+	-	n	n	2	2	2	w	1	3	3	3	3	w	3	1	3	3	w	3	3	3	3	w	w	w	w	w	w	3	2	3	3	w	w	1	0	0	w	2	s	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	1	1	0			
779sS2em	+	-	n	n	2	3	2	w	2	3	3	3	3	1	3	1	3	3	w	3	3	3	3	w	w	w	w	w	2	3	3	3	3	w	w	1	0	3	w	1	3	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	0			
748jS2pda*	+	-	n	n	2	3	2	w	w	3	3	3	3	2	3	3	3	3	w	3	3	3	3	w	w	w	w	w	w	2	2	3	3	w	w	1	0	0	w	1	3	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	1	1	0			
110sS1ym*	+	-	n	n	2	3	w	w	w	3	2	3	2	2	2	s	3	3	w	3	3	3	3	1	w	w	w	w	s	w	2	2	2	w	w	w	0	0	2	1	1	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	0			
284sR1pda	+	-	n	n	3	3	1	w	1	3	3	3	3	w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	w	w	1	w	w	1	3	s	2	2	2	w	w	w	w	w	w	3	3	0	1	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	0		
327sR2ym	+	-	n	n	3	3	2	w	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	w	3	3	3	2	w	w	1	w	1	2	2	3	3	1	3	w	w	w	w	1	1	3	3	0	s	0	-	-	-	0	n	n	n	2	w	0		
945jR1pda*	+	-	n	n	2	3	w	w	w	1	2	2	2	2	3	2	2	3	w	3	1	3	3	3	w	w	w	w	w	3	3	2	2	w	0	w	0	0	1	2	3	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	0			
839jR4pda*	+	-	n	n	2	3	w	w	w	2	2	3	2	2	3	3	3	3	1	3	3	3	3	1	w	w	w	w	w	2	2	3	2	w	1	w	0	2	1	1	3	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	0			
320sR2ym*	+	-	n	n	3	3	3	w	1	3	3	2	2	2	3	3	3	3	w	3	3	3	3	w	w	w	w	w	w	2	3	3	3	w	w	w	0	w	w	1	3	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	0			
464sF4ym	-	-	n	n	1	2	2	w	w	3	3	w	2	2	3	2	w	3	c	2	2	3	2	1	3	3	2	w	2	2	w	w	w	3	w	w	w	0	2	1	w	s	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	1	2	0		
763jS4em	+	-	n	n	3	3	3	w	w	3	2	1	3	2	3	2	3	2	w	3	3	3	2	w	w	w	s	1	w	2	3	3	3	3	w	w	w	0	1	w	2	2	s	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	2	0		
864jS1pda*	+	-	n	n	1	3	s	w	2	3	3	2	w	3	2	3	2	w	3	2	3	3	w	w	w	s	w	w	2	3	3	3	w	w	w	0	2	w	1	2	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	0				
725sR2el*	+	-	n	n	3	3	w	w	3	3	3	3	2	3	3	3	2	3	w	3	3	4	2	w	w	1	w	1	3	3	3	3	3	w	w	w	w	1	1	3	3	0	0	0	w	-	-	-	0	n	n	n	w	w	0		
749sS2pda	+	-	n	n	3	3	1	w	1	2	3	3	3	w	3	3	2	3	w	3	3	3	3	w	w	w	w	1	2	3	2	3	2	0	w	w	0	0	w	2	1	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	0			
778sS2em	+	-	n	n	2	3	w	w	2	3	3	3	3	2	3	3	3	3	w	3	3	3	3	w	w	1	w	w	1	3	3	3	2	3	w	w	w	0	w	w	3	3	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	2	w	0		
1083bjR4xl1	+	-	n	n	3	3	3	1	3	3	3	3	2	3	3	2	3	w	3	3	3	3	3	w	3	3	3	1	3	3	w	3	1	3	2	2	1	0	2	3	3	1	1	3	0	-	-	-	0	n	n	n	2	w	0		
770jS3em	+	-	n	n	2	3	2	w	1	3	3	3	3	1	2	3	3	3	1	3	3	3	3	1	w	w	w	w	3	1	1	3	2	4	2	w	w	w	w	1	2	3	0	0	0	w	-	-	-	0	n	n	n	w	w	w	
<i>Cryptococcus</i> sp. 1																																																									
410sF4xl	-	-	n	n	3	3	2	w	3	3	2	2	3	w	3	3	w	3	w	3	3	3	3	w	2	3	2	3	1	3	2	3	3	3	w	0	w	w	1	3	w	0	0	1	0	-	-	-	0	n	n	n	1	w	0		
<i>Cryptococcus</i> sp. 2																																																									
1187jF1pda	+	-	n	n	3	3	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	w	3	3	1	w	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	1	w	0	2	1	3	s	0	3	0	-	-	-	0	n	n	n	3	w	0	
1035jF1xl	+	-	n	n	3	3	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	w	3	3	w	w	w	3	3	3	3	3	2	3	3	2	1	w	0	3	2	3	s	0	3	0	-	-	-	0	n	n	n	3	3	0		

Isolado	reação DBB	F1 glicose	F2 galactose	F5 sacarose	C1 glicose	C2 galactose	C3 sorbose	C4 glucosamina	C5 ribose	C6 xilose	C7 L-arabinose	C8 D-arabinose	C9 ramnose	C10 sacarose	C11 maltose	C12 trealose	C13 AMD	C14 celobiose	C15 salicina	C17 melibiose	C18 lactose	C19 rafinose	C20 melezitose	C21 inulina	C23 glicerol	C24 eritritol	C25 ribitol	C26 xilitol	C28 D-glucitol	C29 D-mannitol	C30 galactitol	C31 inositol	C32 glu-1-5-lac.	C34 5-keto-D-g.	C38 lactato	C39 succinato	C40 citrato	C41 metanol	C42 etanol	N1 nitrato	N2 nitrito	Ciclo, 0,01 %	Ciclo, 0,1 %	10 % NaCl	15 % NaCl	prod. amido	verm. solível	cor rosa	36 °C	38 °C	40 °C	42 °C	C50 malato	oxalato	acetato
<i>Cryptococcus</i> sp. 3																																																							
205sS2ym	+	-	n	n	2	2	w	w	1	1	2	2	3	w	3	2	1	3	w	3	2	3	c	1	w	w	w	w	1	3	3	3	2	w	w	w	0	w	w	3	1	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	1	w	0	
207sS2ym	+	-	n	n	3	3	1	w	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	w	w	3	w	2	2	3	3	3	3	2	w	w	w	w	w	2	3	3	0	1	0	-	-	-	0	n	n	n	2	w	0
<i>Cryptococcus</i> sp. 5																																																							
481sF1pda	+	-	n	n	2	2	2	w	w	3	2	2	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	w	w	w	s	s	3	3	2	3	3	s	1	1	2	0	3	3	3	1	0	1	0	-	-	-	0	n	n	n	2	w	w
<i>Cryptococcus</i> sp. 7																																																							
997jF3pda	+	-	n	n	3	2	w	w	2	3	3	2	3	2	3	3	3	3	2	3	1	3	2	w	1	3	2	2	3	2	w	2	3	3	w	w	w	w	2	1	1	0	0	1	0	-	-	-	0	n	n	n	3	n	0
<i>Tremella</i> aff. <i>globispora</i>																																																							
429sR3x1	+	-	n	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	w	w	2	3	3	3	3	2	3	3	w	w	w	w	1	3	2	w	3	3	1	0	-	-	-	3	0	n	n	3	w	0
614jF4x1*	+	-	n	n	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	3	2	w	3	1	3	3	w	2	2	2	1	1	2	2	1	3	w	w	w	w	3	3	3	3	3	3	1	0	-	-	-	4	0	n	n	2	w	0	
225sR3pda*	-	-	n	n	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	1	3	3	3	3	w	2	3	3	3	3	3	3	w	3	3	1	2	1	0	3	w	3	3	3	0	0	-	-	-	0	n	n	n	2	3	0	
Classe <i>Urediniomycetes</i> /Clado <i>Nahoidea</i>																																																							
<i>Occultifur</i> aff. <i>externus</i>																																																							
1181jF1ym*	+	-	n	n	1	2	1	w	w	3	3	w	w	1	3	3	w	3	w	w	w	w	3	w	3	w	2	w	3	3	w	w	3	2	w	w	w	0	3	w	w	3	s	w	0	-	-	-	0	n	n	n	2	0	w
228sR3pda*	+	-	n	n	2	1	w	w	w	3	3	w	1	1	2	2	w	2	w	w	w	w	w	3	w	1	w	w	3	w	w	3	w	w	w	0	2	w	w	3	3	w	0	-	-	+	0	n	n	n	2	w	0		
846jR2ym*	+	-	n	n	1	w	w	w	w	3	3	s	w	1	3	3	w	3	w	w	1	1	3	w	3	w	w	w	w	2	2	1	w	w	0	2	w	w	3	3	0	0	-	-	+	2	0	n	n	2	0	0			
147sS3pda	+	-	n	n	2	3	3	w	w	3	3	3	w	2	1	3	w	1	w	w	w	1	3	w	3	w	2	w	2	2	w	w	3	3	w	w	w	3	1	1	3	2	0	0	-	-	+	0	n	n	n	2	n	0	
829jR4ym	+	-	n	n	1	w	w	w	w	3	3	w	w	1	3	3	w	2	3	w	w	w	3	w	3	w	w	w	w	w	w	2	1	w	w	w	0	3	w	w	3	0	0	0	-	-	+	3	0	n	n	2	w	w	
<i>Rhodotorula</i> aff. <i>marina</i>																																																							
1150jF4pda*	+	-	n	n	1	3	w	w	w	3	3	3	w	1	3	2	1	3	w	w	w	w	2	2	3	w	2	1	3	3	1	w	w	w	w	2	w	0	0	w	w	0	0	0	0	-	-	+	3	0	0	n	w	0	0
472sF1pda*	+	-	n	n	3	3	w	3	1	3	3	3	3	3	3	2	3	3	w	3	3	3	3	w	w	3	3	3	w	3	3	2	3	1	2	w	0	3	w	w	0	0	3	0	+	-	+	0	n	n	n	2	0	0	
<i>Rhodotorula</i> <i>marina</i>																																																							
437sF4pda*	+	-	n	n	s	2	w	w	w	3	3	2	s	2	w	w	w	w	w	w	w	2	w	3	3	w	w	w	3	2	w	w	2	w	w	w	0	0	w	0	0	0	0	0	0	-	-	+	0	n	n	n	w	0	0
477sF1pda	+	-	n	n	0	2	2	w	w	3	2	1	2	w	2	2	w	w	w	w	0	3	w	3	w	w	w	2	w	w	1	w	w	w	w	0	0	w	w	0	0	0	0	0	-	-	+	0	n	n	n	w	w	0	
1159jF4ym	+	-	n	n	1	2	2	w	w	3	3	1	w	2	3	w	1	1	w	w	w	1	2	1	3	w	1	w	1	3	w	w	2	1	w	w	w	0	0	w	w	0	0	0	0	-	-	+	0	n	n	n	1	w	0
1004jF3pda	+	-	n	n	3	3	2	1	1	3	3	2	w	3	3	1	1	2	w	w	w	2	3	w	3	1	3	2	3	3	1	w	2	w	w	w	w	0	1	w	0	0	0	0	-	-	+	0	n	n	n	w	n	0	
<i>Rhodotorula</i> sp. 1																																																							
753jS2pda	+	-	n	n	1	3	2	w	w	2	3	w	3	1	3	2	2	w	2	2	w	3	w	w	3	w	2	w	w	w	w	3	w	w	w	1	0	1	2	2	3	0	0	0	-	-	+	0	n	n	n	w	w	w	
<i>Rhodotorula</i> sp. 4																																																							
490sF1pda	+	-	n	n	1	2	1	3	3	3	3	3	3	1	3	3	2	3	2	w	3	3	3	1	w	3	2	2	3	3	w	3	1	w	w	1	w	0	0	1	w	0	0	0	0	-	-	+	0	n	n	n	w	s	0
Classe <i>Urediniomycetes</i> / Clado <i>Sporobdiales</i>																																																							
<i>Erythrobasidium</i> <i>hasegawian</i>																																																							
1012jF3pda*	+	-	n	n	1	n	2	s	w	2	3	w	2	1	3	3	w	s	n	w	w	2	3	w	2	w	1	2	3	3	w	s	3	2	w	w	w	0	w	w	1	0	0	0	0	-	-	+	0	n	n	n	w	w	w

continua

Isolado	reação DBB	F1 glicose	F2 galactose	F5 sacarose	C1 glicose	C2 galactose	C3 sorbose	C4 glucosamina	C5 ribose	C6 xilose	C7 L-arabinose	C8 D-arabinose	C9 ramnose	C10 sacarose	C11 maltose	C12 trealose	C13 AMD	C14 celobiose	C15 salicina	C17 melibiose	C18 lactose	C19 rafinose	C20 melezitose	C21 inulina	C23 glicerol	C24 eritritol	C25 ribitol	C26 xilitol	C28 D-glucitol	C29 D-mannitol	C30 galactitol	C31 inositol	C32 glu-1-5-lac.	C34 5-keto-D-g.	C38 lactato	C39 succinato	C40 citrato	C41 metanol	C42 etanol	N1 nitrato	N2 nitrito	Ciclo, 0,01 %	Ciclo, 0,1 %	10 % NaCl	15 % NaCl	prod. amido	verm. solúvel	cor rosa	36 °C	38 °C	40 °C	42 °C	C50 malato	oxalato	acetato		
<i>Rhodosporidium aff. paludigenum</i>																																																									
922jR2ym*	+	-	n	n	3	1	w	w	w	2	w	2	s	2	w	3	w	1	n	w	w	2	w	w	2	w	3	3	3	3	2	w	3	1	w	w	w	0	0	3	3	0	0	0	-	-	+	0	n	n	n	w	1	w			
<i>Rhodosporidium aff. sphaerocarpum</i>																																																									
184sS4ym*	+	-	n	n	3	3	2	s	3	3	2	3	3	2	3	3	s	3	n	s	2	3	3	w	2	w	3	3	3	3	1	s	3	1	w	2	1	w	1	2	2	0	3	0	-	-	+	0	n	n	n	2	w	w			
453sF4ym	+	-	n	n	3	2	2	w	w	3	3	3	w	2	3	2	1	2	w	w	w	1	2	w	4	w	1	2	3	3	1	w	2	w	w	w	w	0	1	1	0	0	0	0	-	-	+	0	n	n	n	w	w	0			
1050jF3xl*	+	-	n	n	3	3	2	w	2	3	2	3	w	2	3	3	s	3	n	w	w	3	3	w	3	w	3	3	3	3	2	w	3	1	w	2	1	0	w	2	2	3	0	3	0	-	-	+	0	n	n	n	2	w	w		
462sF4ym*	+	-	n	n	3	3	s	w	3	2	2	3	2	2	3	3	3	3	n	w	w	3	3	w	3	w	3	3	3	3	w	w	2	1	w	1	w	0	2	2	2	0	0	0	0	-	-	+	0	n	n	n	s	w	w		
163sS4pda	+	-	n	n	3	2	3	w	2	2	w	2	w	2	2	1	w	2	2	w	w	2	2	w	2	w	1	w	w	w	w	2	w	w	2	w	w	2	w	w	3	2	1	0	0	3	0	-	-	+	0	n	n	n	3	w	0
Classe <i>Ustilaginomycetes / Pseudozyma</i>																																																									
<i>Pseudozyma</i> sp. 1																																																									
339sR4pda	+	-	n	n	1	w	3	1	2	1	2	1	w	w	w	w	w	1	w	w	1	w	w	1	w	w	w	2	w	w	w	w	w	w	0	w	w	0	w	3	w	0	0	-	-	-	0	n	n	n	1	w	0				
401b	-	-	n	n	3	3	3	w	3	3	3	w	w	3	3	3	2	w	w	3	3	w	3	2	3	1	3	3	1	w	3	w	1	1	w	1	2	3	3	0	0	0	0	-	-	-	1	0	n	n	w	n	0				
1164jF4ym	+	-	n	n	3	3	1	1	3	3	3	2	w	3	3	3	3	1	3	3	w	3	3	w	3	3	3	1	2	3	s	3	3	1	1	w	1	w	2	3	2	0	0	-	-	-	4	0	n	n	3	w	0				
399bsF3xl	+	-	n	n	3	3	1	w	2	3	3	1	w	3	3	1	3	1	1	w	3	3	w	3	3	3	1	2	3	w	2	1	w	2	2	1	w	3	3	3	0	0	3	0	-	-	-	3	0	n	n	1	w	0			
<i>Pseudozyma</i> sp. 2																																																									
448sF4pda	-	-	n	n	3	3	3	1	2	3	3	2	w	3	3	3	1	2	3	3	3	3	3	w	2	2	3	3	3	3	w	2	2	w	w	w	w	1	2	3	3	0	0	2	0	-	-	-	4	3	3	2	3	n	0		
1152jF4pda	+	-	n	n	3	3	3	1	2	3	3	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	w	2	2	3	3	3	3	w	3	2	w	w	w	w	1	3	3	3	2	0	s	0	-	-	-	4	0	n	n	3	n	0		
1154jF4pda	+	-	n	n	3	2	3	w	2	2	2	1	w	3	3	3	2	w	w	w	2	2	w	3	3	w	w	2	2	w	1	w	1	w	w	0	w	3	3	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	0				
<i>Pseudozyma</i> sp. 3																																																									
139sS3ym	+	-	n	n	3	3	w	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	w	w	1	w	1	1	1	3	3	3	3	w	0	w	0	1	w	3	1	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	0					
209sS2ym	-	-	n	n	3	3	2	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	w	w	w	w	1	2	2	3	2	3	3	w	w	w	w	3	2	3	3	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	n	0			
347sR4pda	+	-	n	n	3	2	3	1	2	w	2	3	w	2	w	3	w	3	1	2	3	2	w	3	2	3	1	3	2	w	w	w	w	w	w	w	w	1	3	3	3	0	2	0	-	-	-	0	n	n	n	3	n	0			
108sS1ym	+	-	n	n	3	3	w	w	w	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	w	w	w	w	w	1	w	3	3	3	3	w	w	1	w	3	3	3	0	0	-	-	-	0	n	n	n	2	w	0					
112sS1ym	+	-	n	n	3	2	2	w	2	3	3	3	3	3	3	3	3	w	3	3	3	3	w	w	1	w	s	1	3	3	3	2	3	w	w	0	3	w	3	2	0	s	0	-	-	-	0	n	n	n	1	w	0				
<i>Pseudozyma</i> sp. 6																																																									
1153jF4pda	+	-	n	n	3	3	2	1	3	3	3	2	w	3	3	3	3	w	3	2	1	3	3	w	3	3	3	2	3	3	1	2	3	w	w	1	w	w	2	3	3	0	0	s	0	-	-	-	4	0	n	n	3	n	0		
<i>Pseudozyma aff. prunii</i>																																																									
822jR4ym	+	-	n	n	3	1	w	1	2	3	3	2	1	3	3	3	3	2	2	3	w	4	3	1	3	3	3	3	3	1	w	w	2	w	w	w	w	3	3	3	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	0			
340sR4pda	+	-	n	n	1	w	3	2	2	1	2	3	w	3	3	2	2	w	1	w	w	3	2	w	1	2	w	3	2	2	w	1	w	w	w	w	0	3	3	3	0	0	-	-	-	0	n	n	n	1	w	0					
1046jF2xl*	+	-	n	n	3	3	1	s	2	3	3	2	w	2	3	3	3	w	n	w	w	3	2	w	2	w	s	3	3	3	w	w	2	s	2	w	w	0	3	1	2	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	1	w	w		
1147jF2ym	+	-	n	n	2	3	3	w	2	3	3	2	w	2	w	3	w	1	n	3	3	3	3	w	2	2	w	2	3	3	w	w	w	w	w	w	2	0	w	2	1	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	2	w	w		
1192jF1pda	+	-	n	n	3	w	w	1	2	2	3	2	w	3	3	3	2	w	w	2	w	3	3	2	1	2	2	3	3	2	1	w	w	w	w	w	w	3	3	2	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	n	0			
1157jF4pda	-	-	n	n	2	w	1	s	2	3	3	1	w	2	3	2	3	2	n	w	1	3	2	w	2	2	1	3	3	3	1	w	s	s	1	w	w	0	3	2	3	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	0		

continua

Isolado	reação DBB	F1 glicose	F2 galactose	F5 sacarose	C1 glicose	C2 galactose	C3 sorbose	C4 glucosamina	C5 ribose	C6 xilose	C7 L-arabinose	C8 D-arabinose	C9 ramnose	C10 sacarose	C11 maltose	C12 trealose	C13 AMD	C14 celobiose	C15 salicina	C17 melibiose	C18 lactose	C19 rafinose	C20 melezitose	C21 inulina	C23 glicol	C24 eritritol	C25 ribitol	C26 xilitol	C28 D-glucitol	C29 D-mannitol	C30 galactitol	C31 inositol	C32 glu-1-5-lac.	C34 5-keto-D-g.	C38 lactato	C39 succinato	C40 citrato	C41 metanol	C42 etanol	N1 nitrato	N2 nitrito	Ciclo, 0,01 %	Ciclo, 0,1 %	10 % NaCl	15 % NaCl	prod. amido	verm. solúvel	cor rosa	36 °C	38 °C	40 °C	42 °C	C50 malato	oxalato	acetato				
Pseudozyma jejuensis																																																											
358sR4ym	+	-	n	n	3	1	3	1	3	3	3	2	w	3	2	1	w	w	3	w	3	1	2	w	3	3	2	2	3	3	w	w	2	w	w	w	1	w	2	3	3	0	0			-	-	-	0	n	n	n	2	w	0				
1138jF2ym*	+	-	n	n	2	w	3	w	2	3	3?	2	w	1	1	3	w	w	2	3	2	3	w	w	3	3	3	2	2	3	w	w	2	w	w	w	1	0	w	3	1	3	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	w			
840jR4pda	+	-	n	n	3	2	2	3	3	3	3	2	w	3	1	w	3	w	3	3	1	3	2	w	2	3	3	3	3	3	w	1	1	w	w	w	w	1	2	3	2	0	0	3	0	-	-	-	0	n	n	n	3	n	0				
442sF4pda	+	-	n	n	1	1	3	w	3	1	2	3	w	3	1	1	w	1	3	1	3	3	1	w	3	3	1	3	2	1	w	w	1	w	w	w	1	0	0	3	2	0	0			-	-	-	0	n	n	n	2	w	0				
1191jF1pda	+	-	n	n	3	3	w	1	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3	4	3	w	w	1	w	2	2	3	3	2	3	3	w	w	w	0	0	1	2	2	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	1	w	0				
787bjS3em	+		n	n	3	3	w	w	w	3	3	2	2	3	3	3	2	3	w	2	3	2	2	w	w	2	3	3	3	3	3	3	3	3	1	w	w	w	3	1	1	s	0			-	-	-	0	n	n	n	2	w	0				
563sF3pda*	+	-	n	n	1	2	2	w	2	3	3	2	w	1	w	3	w	w	2	3	3	3	2	1	3	3	w	w	2	2	w	w	1	w	w	w	0	w	2	1	s	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	2	w	0					
Classe Ustilaginomycetes / Ordem Ustilaginales																																																											
Ustilago spermophora																																																											
401sF3xl	+	-	n	n	3	3	2	w	2	3	3	1	w	3	3	3	2	w	w	w	3	2	3	w	2	2	2	w	3	2	1	w	2	w	s	1	w	w	3	3	3	0	0	3	0	-	-	-	w	3	3	3	w	n	0				
394sF3xl	+	-	n	n	3	1	3	1	3	2	3	2	w	3	2	1	1	w	w	w	3	3	3	w	2	3	2	w	2	3	w	w	3	w	1	w	w	w	3	3	3	0	0			-	-	-	3	0	n	n	2	w	0				
551sF3pda	+	-	n	n	3	3	3	3	3	3	2	3	w	3	3	3	3	w	1	3	3	3	3	w	2	2	2	2	3	3	w	3	3	w	w	w	w	w	3	3	3	2	0	0	0	-	-	-	2	0	n	n	2	n	0				
1003jF3pda	+	-	n	n	3	2	3	1	2	3	3	3	w	2	3	3	3	2	3	3	3	3	2	1	1	2	3	3	3	3	w	2	3	w	w	w	w	1	2	3	3	s	0	3	0	-	-	-	3	2	0	n	3	n	0				
399sF3xl*	+	-	n	n	3	2	3	1	1	2	2	1	w	3	2	3	3	w	w	w	2	3	3	w	3	s	1	w	3	3	w	1	w	s	w	w	0	3	3	3	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	n	0					
980jF3ym*	+	-	n	n	3	3	2	w	2	3	3	1	w	1	3	1	3	w	n	w	3	2	2	w	3	2	2	w	3	3	w	2	1	w	2	1	2	0	0	2	2	0	0	3	0	-	-	-	0	n	n	n	1	w	w				
Prototheca (Algae)																																																											
Prototheca zopfii																																																											
1097jS2xll	-	-	n	n	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	n	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	2	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	-	-	-	3	3	3	0	3	w	2
Prototheca wickerhamii																																																											
836jR4pda	-	-	n	n	2	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	3	w	w	n	w	w	w	w	w	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	2	w	w	s	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	s	w	w			
954jR2pda	-	-	n	n	2	2	w	w	w	w	w	w	w	w	?	w	3	w	w	w	w	w	w	w	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	n	n	w	w	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	w	w	0			
863jS1pda	-	-	n	n	2	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	3	w	w	w	w	w	1	s	w	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	0	2	1	1	s	0	0	0	-	-	-	w	0	n	n	2	w	w				
861jR2pda	-	-	n	n	2	3	w	w	w	w	w	w	w	w	1	3	w	w	w	w	w	1	w	w	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	2	3	2	2	0	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	2	n	3			
140sS3ym	-	-	n	n	2	3	w	w	w	w	w	w	1	1	w	3	w	1	1	1	w	1	1	w	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	3	3	3	2	0	0	0	-	-	-	1	0	n	n	2	n	s				
747sS2pda	-	-	n	n	2	3	w	w	w	w	w	w	w	w	1	3	w	w	w	w	w	1	w	w	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	3	2	2	0	0	0	-	-	-	0	n	n	n	2	n	3					
Prototheca sp. 1																																																											
1096sS2xll	-	-	n	n	3	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	2	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	-	-	-	3	0	0	n	3	2	3

Tabela 4: Amostras sequenciadas, número de depósito na coleção do Instituto de Microbiologia IM -UFRJ, número de acesso das sequencias, tamanho do fragmento ITS+D1D2 em pares de bases (pb) e seqüências, presentes em base de dados, mais similares às seqüências do isolados de cana-de-açúcar, com percentual de similaridade e tamanho do fragmento da região D1-D2 ou ITS utilizada na comparação.

Identificação (molecular)	Isolado	ITS+ D1D2 pb	D1D2 – similaridade em % (FASTA), tamanho do segmento considerado em pares de base (pb) e sequencias mais próximas com n°. de acesso	ITS – similaridade em % (FASTA), tamanho do segmento considerado em pares de base (pb) e sequencias mais próximas com n°. de acesso	n°. acesso EMBL	n°. IM-UFRJ
<i>Saccharomycetales incertae sedis</i>						
<i>Zygoascus meyeriae</i>	1027jS2el	1300	99,4% 524pb - DQ438189 <i>Zygoascus meyeriae</i> NRRL Y-17319 (<i>typo</i>)	100% 555pb – AY447030 <i>Zygoascus meyeriae</i> strain CBS 7521 (<i>typo</i>)	FN428881	52042
<i>Saccharomycetes, Clado Pichia anomala</i>						
<i>Williopsis saturnus</i>	684sF4el	1250	99,8% 526pb – EF550318 <i>Williopsis saturnus</i> var. subsufficiens NRRL Y-1657 / 98,9% 526pb – U75958 <i>Williopsis saturnus</i> NRRL Y-17396 (<i>typo</i>)	-	FN428867	52040
<i>Williopsis saturnus</i>	728sR2xll	1281	99,8% 567pb – EF550318 <i>Williopsis saturnus</i> var. subsufficiens NRRL Y-1657 / 98,9% 526pb – U75958 <i>Williopsis saturnus</i> NRRL Y-17396 (<i>typo</i>)	-	FN428868	52041
<i>Saccharomycetes/Clado Pichia/Saturnispora/Dekkera</i>						
<i>Candida bentonensis</i>	741sF4xll	816	100% 313 pb – <i>Candida bentonensis</i> NRRL YB-2364 (<i>typo</i>)	-	FN428870	51966
<i>Pichia kudriavzevii</i>	1059jR1el	1122	100% EF550222 <i>Issatchenkia orientalis</i> NRRL Y-5396 (<i>typo</i>)	-	FN428858	51976
<i>Pichia caribbica</i>	1029jS3el	1278	100% 573 pb – AY518531 <i>Pichia caribbica</i> BG98814133	98,3% 539pb – EU568913 <i>Pichia caribbica</i> CBS 2022 (<i>typo Torula fermentati</i>)	FN428882	51967
<i>Pichia caribbica</i>	1090jF4e	1300	99,7% 583 pb – AY518531 <i>Pichia caribbica</i> BG98814133	99,8% 607pb – EU568913 <i>Pichia caribbica</i> CBS 2022 (<i>typo Torula fermentati</i>)	FN428887	51968
<i>Pichia caribbica</i>	618sF1xll	1224	99,7% 582 pb – AY518531 <i>Pichia caribbica</i> BG98814133	99,5% 590pb – EU568913 <i>Pichia caribbica</i> CBS 2022 (<i>typo Torula fermentati</i>)	FN428948	51969
<i>Pichia caribbica</i>	871jS1ym	1250	100% 575 pb – AY242287 <i>Pichia caribbica</i> BG988511	100% 607pb – EU568913 <i>Pichia caribbica</i> CBS 2022 (<i>typo Torula fermentati</i>)	FN428931	51970
<i>Pichia caribbica</i>	917jR2pda	1222	100% 589 pb - EU177571 <i>Pichia caribbica</i> WB26S/ 100% <i>Pichia guilliermondii</i>	97,4% 537pb – EU568913 <i>Pichia caribbica</i> CBS 2022 (<i>typo Torula fermentati</i>)	FN428935	51971
<i>Pichia caribbica</i>	959bjR1ym	1250	100% 551 pb – EU348786 <i>Pichia caribbica</i> NRRL Y-27274 (<i>typo</i>)	100% 565pb – EU568913 <i>Pichia caribbica</i> CBS 2022 (<i>typo Torula fermentati</i>)	FN428941	51972

Identificação (molecular)	Isolado	ITS+ D1D2 pb	D1D2 – similaridade em % (FASTA), tamanho do segmento considerado em pares de base (pb) e sequencias mais próximas com n°. de acesso	ITS – similaridade em % (FASTA), tamanho do segmento considerado em pares de base (pb) e sequencias mais próximas com n°. de acesso	n°. acesso EMBL	n°. IM- UFRJ
Saccharomycetes/ Clado Wickerhamiela						
<i>Candida aff. azyma</i>	398sF3xl		99,8% 412 pb - FJ666082 <i>Candida</i> sp. MC- B1C2(2) 26S r isolado de fermentado artesanal de cachaça em PE/ 88,3% 538 pb – <i>Candida drosophilae</i> NRRL Y-27366 (<i>typo</i>)	-	FN428861	51963
Saccharomycetes /Clado Saccharomyces						
<i>Candida aff. tsuchiyae</i>	813jR3pda	889	92,7% 478 pb -DQ400372 <i>Candida</i> sp. isolado ST-49 não descrito Tailandia, Nakase, 2008, unpub/ 86,2% 465 pb - U49064 <i>Candida tsuchiyae</i> NRRL Y-17840 (<i>typo</i>)	-	FN428871	51965
<i>Candida glabrata</i>	1088jF3el	1583	99,8% 605 pb - AY198398 <i>Candida glabrata</i> CBS 138 (<i>typo</i>)	99,3% 822 pb - AY198398 <i>Candida glabrata</i> CBS 138 (<i>typo</i>)	FN428886	51973
<i>Candida incommunis</i>	1113jR1ym	958	99,6% 498pb – U62303 <i>Candida incommunis</i> NRRL Y17085 (<i>typo</i>)	-	FN428859	51974
<i>Candida incommunis</i>	952jR1ym	980	100% 477pb – U62303 <i>Candida incommunis</i> NRRL Y17085 (<i>typo</i>)	99,7% 398pb – EU343836 <i>Candida</i> <i>incommunis</i> MUCL29843	FN428940	51975
<i>Candida tartarivorans</i>	948jR1pda	1467	99,6% 521pb - AF105335 <i>Candida</i> <i>tartarivorans</i> (<i>typo</i>) 99,6% 486pb - EF554827 <i>Pichia aff.</i> <i>fermentans</i> GDB742/ 99,4% 531 pb - EF460655 <i>Pichia</i> sp. SA18S04 e mais 3 sequencias de isolados de solo em Taiwan, não descrita/ 95,1% 566pb - EF550234	sem sequencias para a espécie / 80% 217pb – AJ697745 <i>Candida digboiensis</i> (<i>typo</i>)	FN428939	51977
<i>Pichia aff. fermentans</i>	933jR1pda	1061	<i>Pichia fermentans</i> NRRL Y-1619 (<i>typo</i>)	-	FN428873	51964
<i>Torulaspota aff. globosa</i>	876jS1ym	1450	98,2% 573pb – U72166 <i>Torulaspota globosa</i> NRRL Y-12650 (<i>typo</i>)	99,8% 587pb - AY046184 <i>Torulaspota</i> <i>globosa</i> NRRL Y-12650 (<i>typo</i>)	FN428932	52031
<i>Torulaspota globosa</i>	738sS1el	1450	99,8% 573pb - U72166 <i>Torulaspota globosa</i> NRRL Y-12650 (<i>typo</i>)	-	FN428869	52032
Pezyzomycotinal/ Clado levedura preta						
<i>Aureobasidium pullulans</i>	537sF2pda	1175	98,1% 591pb - FJ744598 <i>Aureobasidium</i> <i>pullulans</i>	97,1% 513pb - FJ744598 <i>Aureobasidium</i> <i>pullulans</i>	FN428911	51956
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1011jF3pda	1222	99,7% 584pb - AY213693 <i>Aureobasidium</i> <i>pullulans</i> UWFP993	99,5% 581pb - AY213639 <i>Aureobasidium</i> <i>pullulans</i> UWFP 769	FN428878	51957

Identificação (molecular)	Isolado	ITS+ D1D2 pb	D1D2 – similaridade em % (FASTA), tamanho do segmento considerado em pares de base (pb) e sequencias mais próximas com n°. de acesso	ITS – similaridade em % (FASTA), tamanho do segmento considerado em pares de base (pb) e sequencias mais próximas com n°. de acesso	n°. acesso EMBL	n°. IM-UFRJ
<i>Aureobasidium pullulans</i>	402sF3xl	1200	99,5% 573pb - AY213693 <i>Aureobasidium pullulans</i> UWFP993	99,7% 582pb - AY213639 <i>Aureobasidium pullulans</i> UWFP 769	FN428912	51958
<i>Exophiala spinifera</i>	217sS2pda	1254	99,3% 595pb- EU257702 <i>Exophiala spinifera</i> UTHSCSA 06-3355	-	FN428876	52012
Pezizomycotinal/ Clado fungos leveduriformes						
<i>Lecytophora aff. decumbens</i>	200sS2ym	1209	95% 537pb DQ523176 <i>Lecytophora</i> sp. NGV-1 26S r / 92,3% 566pb AF353597 <i>Lecytophora decumbens</i> CBS 153.42 (typo)	-	FN428875	52013
<i>Lecytophora aff. decumbens</i>	113sS1ym	1218	94,8% 539pb- DQ523176 <i>Lecytophora</i> sp. NGV-1 / 92,3% 568pb- AF353597 <i>Lecytophora decumbens</i> CBS 153.42 (typo)	91,6% 465pb AY700129 Fungal endophyte sp. CEY 10/ 85,5% 588pb - AY999132 <i>Zopfiella tabulata</i> CBS 230.78	FN428890	52014
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	441sF4pda	1060	99,2% 503pb - EU019297 <i>Mycosphaerella graminicola</i> CBS 100335	96,1% 467pb - EU019297 <i>Mycosphaerella graminicola</i> CBS 100335	FN428888	52015
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	450sF4pda	1184	98,6% 578pb - EU019297 <i>Mycosphaerella graminicola</i> CBS100335	-	FN428864	52016
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	1007jF3pda	1200	99,3% 587pb - EU019297 <i>Mycosphaerella graminicola</i> CBS100335	95,8% 553pb - EU019297 <i>Mycosphaerella graminicola</i> CBS100335	FN428877	52017
Hymenomycetous/ Clado Podzolicus						
<i>Cryptococcus aff. luteolus</i>	487sF1pda	1080	99,3% 545pb - AF444705 <i>Cryptococcus Vuillemin</i> CBS 8369/9343/9344/ 92,8% 545pb - <i>Bullera coprosmaiensis</i> CBS 8284 (typo)	99 % 477pb - AF444705 <i>Cryptococcus Vuillemin</i> CBS 8369/9343/9344/ 94,2% 480pb – EU252551 <i>Cryptococcus luteolus</i> ATCC32044	FN428914	51981
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	839jR4pda	1137	100% 569pb FJ743620 <i>Cryptococcus cf. podzolicus</i> ATT204	-	FN428872	52004
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	110sS1ym	1184	100% 609pb FJ743620 <i>Cryptococcus cf. podzolicus</i> ATT204	99,8% 515pb- AF444321 <i>Cryptococcus podzolicus</i> CBS 6819	FN428889	52005
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	320sR2ym	1153	100% 616pb- FJ743620 <i>Cryptococcus cf. podzolicus</i> ATT204	98,8% 501pb- AF444321 <i>Cryptococcus podzolicus</i> CBS 6819	FN428906	52006
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	725sR2el	1200	100% 599pb- FJ743620 <i>Cryptococcus cf. podzolicus</i> ATT204	100% 417pb- EF211245 <i>Cryptococcus podzolicus</i> CBS6819	FN428923	52007
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	748jS2pda	1200	100% 609pb FJ743620 <i>Cryptococcus cf. podzolicus</i> ATT204	100% 426pb- EF211245 <i>Cryptococcus podzolicus</i> CBS 6819	FN428924	52008

Identificação (molecular)	Isolado	ITS+ D1D2 pb	D1D2 – similaridade em % (FASTA), tamanho do segmento considerado em pares de base (pb) e sequencias mais próximas com n°. de acesso	ITS – similaridade em % (FASTA), tamanho do segmento considerado em pares de base (pb) e sequencias mais próximas com n°. de acesso	n°. acesso EMBL	n°. IM-UFRJ
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	864jS1pda	1175	99,5% 592pb- FJ743620 <i>Cryptococcus cf. podzolicus</i> ATT204	100% 417pb- EF211245 <i>Cryptococcus podzolicus</i> CBS6819	FN428930	52009
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	945jR1pda	1192	100% 616pb- FJ743620 <i>Cryptococcus cf. podzolicus</i> ATT204	100% 417pb- EF211245 <i>Cryptococcus podzolicus</i> CBS6819	FN428938	52010
Classe Hymenomycetous / Ordem Tremellales						
<i>Bullera aff. coprosmaensis</i>	338sR4pda	1161	100% 549pb - AY313001 <i>Bullera</i> sp. TY-176 / 93,8% 585pb - AF363660 <i>Bullera coprosmaensis</i> CBS 8281 (typo)	99,8% 450pb - AY313025 <i>Bullera</i> sp. TY-143 / 94,7% 472pb - AY301024 <i>Cryptococcus luteolus</i> CBS 943 (typo)	FN428907	51959
<i>Bullera aff. coprosmaensis</i>	346sR4pda	1130	99,8% 558pb - AY313001 <i>Bullera</i> sp. TY-176 / 94% 616pb - AF363660 <i>Bullera coprosmaensis</i> CBS 8281 (typo)	99,8% 447pb - AY313025 <i>Bullera</i> sp. TY-143 / 94,5% 468pb - AY301024 <i>Cryptococcus luteolus</i> CBS 943 (typo)	FN428908	51960
<i>Bullera aff. coprosmaensis</i>	527sF2pda	1100	100% 549pb - AY313001 <i>Bullera</i> sp. TY-176 / 93,8% 585pb - AF363660 <i>Bullera coprosmaensis</i> CBS 8281 (typo)	99,8% 450pb - AY313025 <i>Bullera</i> sp. TY-143 / 94,7% 472pb - AY301024 <i>Cryptococcus luteolus</i> CBS 943 (typo)	FN428915	51961
<i>Bullera aff. coprosmaensis</i>	998jF3pda	1125	100% 549pb - AY313001 <i>Bullera</i> sp. TY-176 / 93,8% 585pb - AF363660 <i>Bullera coprosmaensis</i> CBS 8281 (typo)	99,8% 450pb - AY313025 <i>Bullera</i> sp. TY-143 / 94,7% 472pb - AY301024 <i>Cryptococcus luteolus</i> CBS 943 (typo)	FN428945	51962
<i>Cryptococcus aff. gilvoscens</i>	1142jF2ym	1281	97,2% 539pb - EU627787 <i>Cryptococcus agriensis</i> sp. nov., não publicado/ 93,7% 563pb - AF181547 <i>Cryptococcus gilvoscens</i> CBS 7525 (typo)	78,6% 575pb – AF444362 <i>Cryptococcus arrabidensis</i> CBS 8678 (typo)	FN428893	51978
<i>Cryptococcus aff. gilvoscens</i>	984jF3ym	1250	97,2% 531pb - EU627787 <i>C. agriensis</i> sp. nov., não publicado/ 93,7% 554pb - AF181547 <i>C. gilvoscens</i> CBS 7525 (typo)	78,6% 575pb – AF444362 <i>Cryptococcus arrabidensis</i> CBS 8678 (typo)	FN428943	51979
<i>Cryptococcus aff. laurentii</i>	169sS4pda	1150	98,6% 586pb – AY315663 <i>Cryptococcus laurentii</i> CBS7140	99,6% 537pb – AY315665 <i>Cryptococcus laurentii</i> CBS7140	FN428898	51980
<i>Cryptococcus aff. taibaiensis</i>	581sF3ym	1100	99,3% 557pb - AF444696 <i>Cryptococcus Vuillemin</i> CBS 8355 / 97,8% 557 pb AY557601 <i>Cryptococcus taibaiensis</i> AS2.2444 (typo)	99,4% 495pb - AF444696 <i>Cryptococcus Vuillemin</i> CBS 8355 / 94,4% 499 pb AY557601 <i>Cryptococcus taibaiensis</i> AS2.2444 (typo)	FN428916	51982
<i>Cryptococcus cellulolyticus</i>	194sS4ym	1226	99,8% 600 pb – <i>Cryptococcus cellulolyticus</i> CBS 8294 (typo)/ 99,8% 600pb – <i>Bullera pseudoalba</i> CBS 7227 (typo)	99,6% 547 pb – <i>Cryptococcus cellulolyticus</i> CBS 8294 (typo)/ 99,5% 547pb – <i>Bullera pseudoalba</i> CBS 7227 (typo)	FN428904	51983

Identificação (molecular)	Isolado	ITS+ D1D2 pb	D1D2 – similaridade em % (FASTA), tamanho do segmento considerado em pares de base (pb) e sequencias mais próximas com n°. de acesso	ITS – similaridade em % (FASTA), tamanho do segmento considerado em pares de base (pb) e sequencias mais próximas com n°. de acesso	n°. acesso EMBL	n°. IM-UFRJ
<i>Cryptococcus cellulolyticus</i>	480sF1pda	1216	100% 590 pb – <i>Cryptococcus cellulolyticus</i> CBS 8294 (typo)/ 100% 590pb – <i>Bullera pseudoalba</i> CBS 7227 (typo)	99,3% 546 pb – <i>Cryptococcus cellulolyticus</i> CBS 8294 (typo)/ 99,4% 545pb – <i>Bullera pseudoalba</i> CBS 7227 (typo)	FN428913	51984
<i>Cryptococcus cellulolyticus</i>	458sF4ym	1110	100% 576 pb – <i>Cryptococcus cellulolyticus</i> CBS 8294 (typo)/ 100% 576pb – <i>Bullera pseudoalba</i> CBS 7227 (typo)	96,7% 513 pb – <i>Cryptococcus cellulolyticus</i> CBS 8294 (typo)/ 96,9% 514pb – <i>Bullera pseudoalba</i> CBS 7227 (typo)	FN428946	51985
<i>Cryptococcus flavescens</i>	247sR3pda	1229	99,8% 584pb – AF444707 <i>Cryptococcus</i> sp. CBS 8372/ 99,5% 593pb AM160631 <i>Cryptococcus flavescens</i> HB1178=CBS 9956/ 99,5% 547pb – AB035042 <i>Cryptococcus flavescens</i> CBS 942 (typo)	100% 529pb – EF444707 <i>Cryptococcus</i> sp. CBS 8372/ 98% 440pb AB034042 <i>Cryptococcus flavescens</i> CBS942 (typo)	FN428902	51986
<i>Cryptococcus flavescens</i>	639sS4xll	1192	100% 607pb – AF444707 <i>Cryptococcus</i> sp. CBS 8372/ 99,7% 607pb AM160631 <i>Cryptococcus flavescens</i> HB1178=CBS 9956/ 99,6% 570pb – AB035042 <i>Cryptococcus flavescens</i> CBS 942 (typo)	-	FN428866	51987
<i>Cryptococcus flavus</i>	1130jF2ym	1192	99,8% 611pb AF075497 <i>Cryptococcus flavus</i> CBS 331 (typo)	99,2% 525pb AF075497 <i>Cryptococcus flavus</i> CBS 331 (typo)	FN428891	51988
<i>Cryptococcus flavus</i>	969jS3pda	1200	99,6% 623pb AF444338 <i>Cryptococcus flavus</i> CBS 331 (typo)	99% 525pb AF444338 <i>Cryptococcus flavus</i> CBS 331 (typo)	FN428942	51989
<i>Cryptococcus laurentii</i>	412sF4xl	1100	99,6% 492pb- AF075469 <i>Cryptococcus laurentii</i> CBS 139 (typo)	-	FN428863	51990
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1023jF3ym	1200	99,4% 534pb – AF075469 <i>Cryptococcus laurentii</i> CBS 139 (typo)	100% 508pb - FJ545224 <i>Cryptococcus laurentii</i> ATCC MYA-2946	FN428880	51991
<i>Cryptococcus laurentii</i>	128sS1pda	1100	99,6% 539pb – AF075469 <i>Cryptococcus laurentii</i> CBS 139 (typo)	99,8% 479pb - FJ545224 <i>Cryptococcus laurentii</i> ATCC MYA-2946	FN428897	51992
<i>Cryptococcus laurentii</i>	189sS4ym	1200	100% AF075469 <i>Cryptococcus laurentii</i> CBS 139 (typo)	99,6% 537pb -AY315665 <i>Cryptococcus laurentii</i> CBS 7140	FN428860/ FN428900	51993
<i>Cryptococcus laurentii</i>	250sR3pda	1100	99,8% 618pb – AF075469 <i>Cryptococcus laurentii</i> CBS 139 (typo)	100% 508pb - FJ545224 <i>Cryptococcus laurentii</i> ATCC MYA-2946	FN428903	51994
<i>Cryptococcus laurentii</i>	349sR4pda	1225	99% 519pb - AF075469 <i>Cryptococcus laurentii</i> CBS 139 (typo)	100% 508pb - FJ545224 <i>Cryptococcus laurentii</i> ATCC MYA-2946	FN428909	51995

Identificação (molecular)	Isolado	ITS+ D1D2 pb	D1D2 – similaridade em % (FASTA), tamanho do segmento considerado em pares de base (pb) e sequencias mais próximas com n°. de acesso	ITS – similaridade em % (FASTA), tamanho do segmento considerado em pares de base (pb) e sequencias mais próximas com n°. de acesso	n°. acesso EMBL	n°. IM-UFRJ
<i>Cryptococcus laurentii</i>	719sS1xl	1153	100% 611pb- AF075469 <i>Cryptococcus laurentii</i> CBS 139 (typo)	100% 508pb - FJ545224 <i>Cryptococcus laurentii</i> ATCC MYA-2946	FN428921	51996
<i>Cryptococcus laurentii</i>	828jR4ym	1150	99,8% 551pb – AF075469 <i>Cryptococcus laurentii</i> CBS 139 (typo)	99,6% 537pb -AY315665 <i>Cryptococcus laurentii</i> CBS 7140	FN428926/ FN428927	51997
<i>Cryptococcus laurentii</i>	903jS4ym	1137	99,7% 601pb – AF075469 <i>Cryptococcus laurentii</i> CBS 139 (typo)	100% 508pb - FJ545224 <i>Cryptococcus laurentii</i> ATCC MYA-2946	FN428934	51998
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	1044jF2xl	1207	99,2% 597pb – AF472625 <i>Cryptococcus nemorosus</i> VKM Y-2906 (typo)	96,1% 518pb – AF472628 <i>Cryptococcus nemorosus</i> VKM Y-2906 (typo)	FN428883	51999
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	392sF2xl	1184	98,9% 560pb- AF472625 <i>Cryptococcus nemorosus</i> VKM Y-2906 (typo)	100% 575pb- AF444699 <i>Cryptococcus</i> sp. CBS 8363/ 98,9% 560pb- AF472625 <i>Cryptococcus nemorosus</i> VKM Y-2906 (typo)	FN428910	52000
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	621sF1xll	1200	99,3% 585pb- AF472625 <i>Cryptococcus nemorosus</i> VKM Y-2906 (typo)	100% 575pb- AF444699 <i>Cryptococcus</i> sp. CBS 8363/ 98,9% 560pb- AF472625 <i>Cryptococcus nemorosus</i> VKM Y-2906 (typo)	FN428918	52001
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	689sF4xll	1175	98,9% 544pb- AF472625 <i>Cryptococcus nemorosus</i> VKM Y-2906 (typo)	96,3% 515pb- AF472625 <i>Cryptococcus nemorosus</i> VKM Y-2906 (typo)	FN428919	52002
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	987jF3ym	1150	98,3% 595pb – AF472625 <i>Cryptococcus nemorosus</i> VKM Y-2906 (typo)	96,3% 518pb – AF472628 <i>Cryptococcus nemorosus</i> VKM Y-2906 (typo)	FN428944	52003
<i>Tremella aff. globispora</i>	225sR3pda	1168	97,7% 608pb - AF189869 <i>Tremella globispora</i> CBS 6972	87,5% 472pb - FJ534883 <i>Tremella globispora</i> CBS 6972	FN428949	52033
<i>Tremella aff. globispora</i>	614jF4xll	1050	98% 596pb - AF189869 <i>Tremella globispora</i> CBS 6972	88,3% 471pb - FJ534883 <i>Tremella globispora</i> CBS 6972	FN428917	52034
<i>Tremella aff. globispora</i>	723sS3xl	1050	98% 588pb - AF189869 <i>Tremella globispora</i> CBS 6972	88,1% 471pb - FJ534883 <i>Tremella globispora</i> CBS 6972	FN428922	52035
<i>Tremella aff. globispora</i>	859jR2pda	1050	97,6% 590pb - AF189869 <i>Tremella globispora</i> CBS 6972	89,6% 509pb - FJ534883 <i>Tremella globispora</i> CBS 6972	FN428929	52036
<i>Tremella aff. globispora</i>	920jR2ym	1050	98% 594pb - AF189869 <i>Tremella globispora</i> CBS 6972	89,6% 509pb - FJ534883 <i>Tremella globispora</i> CBS 6972	FN428936	52037
Classe Urediniomycetes /Clado Nahoidea						
<i>Occultifur aff. externus</i>	1181jF1ym	1272	98,4% 631pb - AY745723 <i>Occultifur externus</i> CBS 8732 (typo)	96,6% 594pb - AF444567 <i>Occultifur externus</i> CBS 8732 (typo)	FN428895	52018

Identificação (molecular)	Isolado	ITS+ D1D2 pb	D1D2 – similaridade em % (FASTA), tamanho do segmento considerado em pares de base (pb) e sequencias mais próximas com n°. de acesso	ITS – similaridade em % (FASTA), tamanho do segmento considerado em pares de base (pb) e sequencias mais próximas com n°. de acesso	n°. acesso EMBL	n°. IM-UFRJ
<i>Occultifur aff. externus</i>	228sR3pda	1254	98,7% 629pb - AY745723 <i>Occultifur externus</i> CBS 8732 (typo)	96,8% 594pb - AF444567 <i>Occultifur externus</i> CBS 8732 (typo)	FN428901	52019
<i>Occultifur aff. externus</i>	846jR2ym	1250	98,4% 557pb - AY745723 <i>Occultifur externus</i> CBS 8732 (typo)	95,4% 587pb - AF444567 <i>Occultifur externus</i> CBS 8732 (typo)	FN428928	52020
<i>Rhodotorula aff. marina</i>	1150jF4pda	1276	99,8% 610pb - AY520389 Basidiomiceto (filoplano)/ 98,3% 605pb - AF189944 <i>Rhodotorula marina</i> type CBS 2365/ 98,2% 614pb - AY364836 <i>Sporobolomyces symmetricus</i> (typo)	99,3% 586pb - AY313070 <i>Sporobolomyces</i> sp. (filosfera)/ 95,1% 597 - AY364836 <i>Sporobolomyces symmetricus</i> (typo) /94,3% 597pb - AF444504 <i>Rhodotorula marina</i> CBS 2365 (typo)	FN428894	52025
<i>Rhodotorula aff. marina</i>	472sF1pda	1200	99,7% 606pb - AY520389 Basidiomiceto (filosfera)/ 98,2% 599 - AF189944 <i>Rhodotorula marina</i> CBS 2365 (typo)/ 98% 608pb - AY364836 <i>Sporobolomyces symmetricus</i> (typo)	99,2% 580pb - AY313070 <i>Sporobolomyces</i> sp. (filosfera)/ 95,1% 593 - AY364836 <i>Sporobolomyces symmetricus</i> (typo) /94,4% 595pb - AF444504 <i>Rhodotorula marina</i> CBS 2365 (typo)	FN428925	52026
<i>Rhodotorula marina</i>	437sF4pda	1200	99,8% 611pb - AF189944 <i>R. marina</i> CBS 2365 (typo)/ 99,3% 611pb - AB279731 <i>Sporobolomyces vermiculatus</i> (typo)	99,4% 552pb - AF444504 <i>R. marina</i> CBS 2365 (typo)/ 98% 543pb - AB030335 <i>Sporobolomyces vermiculatus</i> (typo)	FN428896/ FN428947	52027
Classe Urediniomycetes/ Clado Sporobdiales						
<i>Erythrobasidium hasegawian</i>	1012jF3pda	1261	100% 575pb- DQ663696 <i>E. hasegawianum</i> AFTOL-ID 177/ 99,8% 601pb- AB030353 <i>Sporobolomyces yunnanensis</i> JCM 10687 (typo)	99,2% 600pb- AB030353 <i>Sporobolomyces yunnanensis</i> JCM 10687 (typo)	FN428879	52011
<i>Rhodosporeidium aff. paludigenum</i>	922jR2ym	1261	96,3% 572pb - AF363640 <i>Rhodosporeidium paludigenum</i> CBS 6566 (typo)	93% 558pb - AF444492 <i>Rhodosporeidium paludigenum</i> CBS 6566 (typo)	FN428937	52024
<i>Rhodosporeidium aff. sphaerocarpum</i>	1050jF3xl	1230	99,5% 569pb - AF444745 <i>Rhodotorula</i> sp. CBS 8885 /97,4% 569pb - AF070432 <i>Rhodotorula mucilagiosa</i> CBS 316 (typo) / 97,4% 569pb -AF070425 <i>Rhodosporeidium sphaerocarpum</i> CBS 5939 (typo)	99,8% 598pb - AF444650 <i>Rhodotorula</i> sp. CBS 8885 /96% 599pb - AF444499 <i>Rhodosporeidium sphaerocarpum</i> CBS 5938 (typo)/ 94,7% 605pb - AF444541 <i>Rhodotorula mucilagiosa</i> CBS 316 (typo)	FN428885	52028

Identificação (molecular)	Isolado	ITS+ D1D2 pb	D1D2 – similaridade em % (FASTA), tamanho do segmento considerado em pares de base (pb) e sequencias mais próximas com n°. de acesso	ITS – similaridade em % (FASTA), tamanho do segmento considerado em pares de base (pb) e sequencias mais próximas com n°. de acesso	n°. acesso EMBL	n°. IM-UFRJ
<i>Rhodosporeidium aff. sphaerocarpum</i>	184sS4ym	1254	99,7% 581pb - AF444745 <i>Rhodotorula</i> sp. CBS 8885 /97,6% 581pb - AF070432 <i>Rhodotorula mucilagiosa</i> CBS 316 (typo) / 97,6% 581pb -AF070425 <i>Rhodosporeidium sphaerocarpum</i> CBS 5939 (typo)	99,7% 597pb – AF444650 <i>Rhodotorula</i> sp. CBS 8885 /95,8% 598pb - AF444499 <i>Rhodosporeidium sphaerocarpum</i> CBS 5938 (typo)/ 94,5% 604pb – AF444541	FN428899	52029
<i>Rhodosporeidium aff. sphaerocarpum</i>	462sF4ym	1175	100% 498pb - AF387142 <i>Rhodotorula</i> sp. IGC 4884 /97,8% 497pb - AF070432 <i>Rhodotorula mucilagiosa</i> CBS 316 (typo) / 97,8% 497pb -AF070425 <i>Rhodosporeidium sphaerocarpum</i> CBS 5939 (typo)	99,8% 512pb – AF444650 <i>Rhodotorula</i> sp. CBS 8885 / 95,5% 513pb - AF444499 <i>Rhodosporeidium sphaerocarpum</i> CBS 5938 (typo)/ 93,8% 519pb – AF444541 <i>Rhodotorula mucilagiosa</i> CBS 316 (typo)	FN428933	52030
Classe Ustilaginomycetes /Pseudozyma						
<i>Pseudozyma jejuensis</i>	1138jF2ym	1485	100% 636pb - DQ866822 <i>Pseudozyma</i> sp. não descrita /96,5% 636pb - DQ008955 <i>Pseudozyma shanxiensis</i> (ex-typo)	98,1% 738pb - EF079966 <i>Pseudozyma</i> sp. CBS 10454	FN428892	52021
<i>Pseudozyma aff. prunii</i>	1046jF2xl	1455	98,4% 631 pb EU379942 <i>Pseudozyma pruni</i> CBS 10937 (typo)	85,8% 668 pb EU379942 <i>Pseudozyma pruni</i> CBS 10937 (typo)	FN428884	52022
<i>Pseudozyma jejuensis</i>	563sF3pda	1400	100% 636pb - DQ866822 <i>Pseudozyma</i> sp. não descrita /96,5% 636pb - DQ008955 <i>Pseudozyma shanxiensis</i> (ex-typo)	98,1% 738pb - EF079966 <i>Pseudozyma</i> sp. CBS 10454	FN428865/ FN428905	52023
Ustilaginomycetes/ Ustilaginales						
<i>Ustilago spermophora</i>	399sF3xl	1450	99,4% 525pb – AY740171 <i>Ustilago spermophora</i> /99,4% 516pb – AJ235297 <i>Pseudozyma tsukubaensis</i> JCM 10324 (typo)	-	FN428862	52038
<i>Ustilago spermophora</i>	980jF3ym	1455	100% 601pb – AY740171 <i>Ustilago spermophora</i> /100% 588pb – AJ235297 <i>Pseudozyma tsukubaensis</i> JCM 10324 (typo)	-	FN428874	52039

Tabela 5: Características das colônias dos taxos isolados de cana-de-açúcar nos meios da triagem.

Hipotetical ID to EMBL	isolado	BIL	CMA	YCB uréia (DBB)	BILvbml pH5,5	BILvbml pH4	BILem 0,5%el	BILem 0,05%el	Ymct pH4,3	YCB ON
<i>Zygoascus meyeriae</i>	1027jS2el									
<i>Williopsis saturnus</i>	684sF4el									
<i>Williopsis saturnus</i>	728sR2xll									
<i>Candida bentonensis</i>	741sF4xll									
<i>Pichia kudriavzevii/ C. krusei</i>	1059jR1el									
<i>Pichia caribbica</i>	1029jS3el									
<i>Pichia caribbica</i>	1090jF4e									
<i>Pichia caribbica</i>	618sF1xll									
<i>Pichia caribbica</i>	871jS1ym									
<i>Pichia caribbica</i>	917jR2pda									
<i>Pichia caribbica</i>	959bjR1ym									
<i>Candida aff. drosophilae</i>	398sF3xl									
<i>Candida aff. tsuchiyae</i>	813jR3pda									
<i>Candida glabrata</i>	1088jF3el									
<i>Candida incommunis</i>	1113jR1ym									
<i>Candida incommunis</i>	952jR1ym									
<i>Candida tartarivorans</i>	948jR1pda									

<i>Hipotetical ID to EMBL</i>	isolado	BIL	CMA	YCB uréia (DBB)	BILvbmI pH5,5	BILvbmI pH4	BILem 0,5%el	BILem 0,05%el	Ymct pH4,3	YCB 0N
<i>Pichia aff. fermentans</i>	933jR1pda									
<i>Torulaspora aff. globosa</i>	876jS1ym									
<i>Torulaspora globosa</i>	738sS1el									
<i>Cryptococcus aff. luteolus</i>	487sF1pda									
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	839jR4pda									
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	110sS1ym									
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	320sR2ym									
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	725sR2el									
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	748jS2pda									
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	864jS1pda									
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	945jR1pda									
<i>Bullera aff. coprosmaensis</i>	338sR4pda									
<i>Bullera aff. coprosmaensis</i>	346sR4pda									
<i>Bullera aff. coprosmaensis</i>	527sF2pda									
<i>Bullera aff. coprosmaensis</i>	998jF3pda									
<i>Cryptococcus aff. gilvescens</i>	1142jF2ym									
<i>Cryptococcus aff. gilvescens</i>	984jF3ym									
<i>Cryptococcus aff. laurentii</i>	169sS4pda									
<i>Cryptococcus aff. taibensis</i>	581sF3ym									

<i>Hipotetical ID to EMBL</i>	isolado	BIL	CMA	YCB uréia (DBB)	BILvbmI pH5,5	BILvbmI pH4	BILem 0,5%el	BILem 0,05%el	Ymct pH4,3	YCB 0N
<i>Cryptococcus cellulolyticus</i>	194sS4ym									
<i>Cryptococcus cellulolyticus</i>	480sF1pda									
<i>Cryptococcus cellulolyticus</i>	458sF4ym									
<i>Cryptococcus flavescens</i>	247sR3pda									
<i>Cryptococcus flavescens</i>	639sS4xll									
<i>Cryptococcus flavescens</i>	689bsF4xll									
<i>Cryptococcus flavus</i>	1130jF2ym									
<i>Cryptococcus flavus</i>	969jS3pda									
<i>Cryptococcus laurentii</i>	412sF4xl									
<i>Cryptococcus laurentii</i>	128sS1pda									
<i>Cryptococcus laurentii</i>	189sS4ym									
<i>Cryptococcus laurentii</i>	250sR3pda									
<i>Cryptococcus laurentii</i>	349sR4pda									
<i>Cryptococcus laurentii</i>	719sS1xl									
<i>Cryptococcus laurentii</i>	828jR4ym									
<i>Cryptococcus laurentii</i>	903jS4ym									
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	1044jF2xl									
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	392sF2xl									
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	621sF1xll									

<i>Hipotetical ID to EMBL</i>	isolado	BIL	CMA	YCB uréia (DBB)	BILvbmI pH5,5	BILvbmI pH4	BILem 0,5%el	BILem 0,05%el	Ymct pH4,3	YCB ON
<i>Cryptococcus nemorosus</i>	987jF3ym									
<i>Tremella aff. globispora</i>	225sR3pda									
<i>Tremella aff. globispora</i>	614jF4xlI									
<i>Tremella aff. globispora</i>	723sS3xl									
<i>Tremella aff. globispora</i>	859jR2pda									
<i>Tremella aff. globispora</i>	920jR2ym									
<i>Occultifur aff. externus</i>	1181jF1ym									
<i>Occultifur aff. externus</i>	228sR3pda									
<i>Occultifur aff. externus</i>	846jR2ym									
<i>Rhodotorula aff. marina</i>	1150jF4pda									
<i>Rhodotorula aff. marina</i>	472sF1pda									
<i>Rhodotorula marina</i>	437sF4pda									
<i>Erythrobasidium hasegawian</i>	1012jF3pda									
<i>Rhodosporidium aff. paludigenum</i>	922jR2ym									
<i>Rhodosporidium aff. sphaerocarpum</i>	1050jF3xl									
<i>Rhodosporidium aff. sphaerocarpum</i>	184sS4ym									
<i>Rhodosporidium aff. sphaerocarpum</i>	462sF4ym									
<i>Pseudozyma aff. prunii</i>	1046jF2xl									
<i>Pseudozyma jejuensis</i>	1138jF2ym									

Hipotetical ID to EMBL	isolado	BIL	CMA	YCB uréia (DBB)	BILvbmI pH5,5	BILvbmI pH4	BILem 0,5%el	BILem 0,05%el	Ymct pH4,3	YCB 0N
<i>Pseudozyma jejuensis</i>	563sF3pda									
<i>Ustilago spermophora</i>	399sF3xl									
<i>Ustilago spermophora</i>	980jF3ym									
<i>Aureobasidium pullulans</i>	537sF2pda									
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1011jF3pda									
<i>Aureobasidium pullulans</i>	402sF3xl									
<i>Exophilia spinifera</i>	217sS2pda									
<i>Lecytophora aff. decumbens</i>	200sS2ym									
<i>Lecytophora aff. decumbens</i>	113sS1ym									
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	441sF4pda									
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	450sF4pda									
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	1007jF3pda									
<i>Candida sp. 1- Pichia aff. fermentans</i>	958jR1ym									
<i>Candida sp. 2- Candida aff. colliculosa</i>	500sF1ym									
<i>Candida sp. 3- P. caribbica</i>	1116jR1pda									
<i>Candida sp. 4- Candida cf. sorbophila</i>	680sF3xll									
<i>Candida sp. 5- Pichia caribbica</i>	625sF2xll									
<i>Candida sp. 6- Candida aff. azyma</i>	268sR3ym									

Hipotetical ID to EMBL	isolado	BIL	CMA	YCB uréia (DBB)	BILvbmI pH5,5	BILvbmI pH4	BILem 0,5%el	BILem 0,05%el	Ymct pH4,3	YCB ON
<i>Candida sp. 8- P. caribbica</i>	622sF1xll									
<i>Candida sp. 9</i>	830jR4ym									
<i>Candida sp. 10 – P. caribbica</i>	967jS3pda									
<i>Candida sp. 11 - C. cf. valida</i>	1062jR1e									
<i>Mycosphaerella cf. sp. 1</i>	1155jF4pda									
<i>Mycosphaerella cf. sp. 2</i>	1197jF1pda									
<i>Rhodotorula sp. 1</i>	753jS2pda									
<i>Rhodotorula sp. 2</i>	959jR1ym									
<i>Rhodotorula sp. 3</i>	163sS4pda									
<i>Rhodotorula sp. 4</i>	490sF1pda									
<i>C. cf. podzolicus</i>	196sS4ym									
<i>Cryptococcus sp. 1</i>	426sR4xl									
<i>Cryptococcus sp. 2</i>	1187jF1pda									
<i>Cryptococcus sp. 3</i>	205sS2ym									
<i>Cryptococcus sp. 4</i>	742sF4xll									
<i>Cryptococcus sp. 5</i>	556sF3pda									
<i>Cryptococcus sp. 6</i>	563sF3pda									
<i>Cryptococcus sp. 7</i>	997jF3pda									

Hipotetical ID to EMBL	isolado	BIL	CMA	YCB uréia (DBB)	BILvbmI pH5,5	BILvbmI pH4	BILem 0,5%el	BILem 0,05%el	Ymct pH4,3	YCB 0N
<i>Cryptococcus sp. 8</i>	1056jF4xl									
<i>Pseudozyma sp. 1</i>	983jF3ym									
<i>Pseudozyma sp. 2</i>	981jF3ym									
<i>Pseudozyma sp. 3</i>	139asS3ym									
<i>Pseudozyma sp. 4</i>	504sF1ym									
<i>Pseudozyma sp. 5</i>	551bsF3pda									
<i>Pseudozyma sp. 6</i>	990jF3ym									
<i>Basidiomiceto sp 1</i>	833jR4ym									
<i>Basidiomiceto sp 2</i>	257sR3ym									
<i>fungo filamentoso sp. 1</i>	1008jF3pda									
<i>fungo filamentoso sp. 2</i>	135sS3ym									
<i>Lecythophora sp. 1</i>	384sR4pda									
<i>Lecythophora sp. 2</i>	455sF4ym									
<i>Prototheca wickerhamii</i>	896jS4pda									
<i>Prototheca zoopfi</i>	1097jS2xll									
<i>Prototheca sp. 1</i>	1096jS2xll									