

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS E
FUNGOS SEMELHANTES A LEVEDURAS ISOLADOS DE FOLHAS DE
FIGUEIRAS DO PARQUE DE ITAPUÃ, RS, BRASIL.**

Juliana Nunes Mautone
Bióloga – PUCRS

Porto Alegre
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS E
FUNGOS SEMELHANTES A LEVEDURAS ISOLADOS DE FOLHAS DE
FIGUEIRAS DO PARQUE DE ITAPUÃ, RS, BRASIL.**

Juliana Nunes Mautone
Bióloga – PUCRS

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Orientador: Patricia Valente da Silva

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março, 2008

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

M459d Mautone, Juliana Nunes

Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de folhas de figueiras do Parque de Itapuã, RS, Brasil / Juliana Nunes Mautone. – 2008.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2008.

Orientação: Profª Patricia Valente da Silva

1. Leveduras. 2. Figueira. 3. Parque Estadual de Itapuã (Viamão, RS)
I. Silva, Patricia Valente, orient. II. Título.

CDU 579.2(043)

AGRADECIMENTOS

À professora Patricia Valente, pela oportunidade, apoio, pelo sorriso constante no rosto e, principalmente, pelo grande aprendizado que me proporcionou nestes quase quatro anos de convívio no laboratório.

Aos colegas de laboratório Alexandre Fuentefria, Melissa Landell, Gabriela Godoy, Ludmile Londero e Roberta Brito, pelo incentivo, aprendizado, apoio e amizade durante o mestrado.

Às colegas, Alana Poloni, Carolina Poletto, Franciele Bucker, Jandora Poli e Taís Letícia Bernardi, pela amizade, pelas tardes regadas a chimarrão e pelos momentos de descontração no laboratório.

À professora Maria Lúcia Scroferneker, pelo incentivo e amizade nestes quatro anos de alegre convivência.

À amiga Paula Santos, ao professor Paulo Brack e ao colega do Departamento de Botânica Rodney Schimdt pelo auxílio imprescindível na identificação das espécies de figueiras.

À minha família pelo apoio constante e principalmente a minha mãe, que sempre me incentivou mesmo nos momentos mais difíceis, com atenção e carinho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS E FUNGOS SEMELHANTES A LEVEDURAS ISOLADAS DE FOLHAS DE FIGUEIRAS DO PARQUE DE ITAPUÃ, RS, BRASIL.

Autor: Juliana Nunes Mautone

Orientador: Prof. Dr. Patrícia Valente

¹RESUMO

As figueiras são encontradas em abundância no Parque de Itapuã, onde interagem com diversos organismos superiores e, potencialmente, com microrganismos. Os objetivos do presente trabalho foram isolar, identificar e avaliar o potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras associados ao filoplano de figueiras no Parque de Itapuã, Viamão, RS. Foram realizadas 6 coletas em diferentes pontos do Parque de Itapuã durante o ano de 2005 e 2006. Fragmentos das folhas foram submetidos a lavagens sucessivas com 0,5% Tween 20. Diluições decimais seriadas da última lavagem foram inoculadas em meio YM modificado e incubadas a 25 °C por 5-7 dias. Representantes dos diferentes morfotipos foram purificados e identificados de acordo com características morfológicas e testes bioquímicos - fisiológicos. Foi testada a produção de enzimas de interesse industrial (amilase, celobiase, caseinase, gelatinase e esterase), além de toxinas “killer” pelos isolados. Dos 175 isolados obtidos, 125 são leveduras verdadeiras e 50 fungos semelhantes a leveduras. As 125 leveduras isoladas pertencem a 45 espécies, sendo oito de afinidade ascomicética e 37 de afinidade basidiomicética. Sete isolados tiveram as regiões D1/D2 do 26S rDNA seqüenciadas, sendo que quatro pertencem a duas espécies ainda não descritas do gênero *Bullera*. Dos 175 isolados 29,1% produziram amilase, 46,3% caseinase e 9,7% gelatinase. Foram testados 138 isolados para verificar a atividade de esterase, sendo 81,5% produtores da enzima. Das 126 cepas testadas para produção de celobiase, 74,8% produziram a enzima. Aproximadamente 4,5% dos isolados de leveduras e fungos semelhantes a leveduras apresentaram atividade “killer”. Assim sendo, o filoplano de figueiras demonstra ser um bom substrato para o isolamento de leveduras, inclusive de novas espécies. Estas leveduras demonstram ter potencial para contribuir efetivamente para a inovação biotecnológica.

¹ Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (113 p.) Março, 2008.

DIVERSITY AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF YEAST AND YEAST-LIKE FUNGI ISOLATED FROM LEAVES OF FIG TREES IN ITAPUÃ PARK, RS, BRAZIL.

Author: Juliana Nunes Mautone

Advisor: Dr. Patrícia Valente

²ABSTRACT

The fig trees are found in abundance in the Itapuã Park, where they interact with various higher organisms and, potentially, with microorganisms. The objectives of this study were to isolate, identify and evaluate the biotechnological potential of yeasts and yeast-like fungi associated with phylloplane of fig trees in the Itapuã Park, Viamão, RS. Six samples were performed at different points in the Itapuã Park during 2005 and 2006. Leaf pieces were submitted to successive washings with 0.5% Tween 20. Decimal serial dilutions from the last washing were inoculated in modified YM medium and incubated at 25° C for 5-7 days. Representatives of the different morphotypes were purified and identified according to morphological characteristics, physiological and biochemical tests. We tested the production of industrially interesting enzymes (amylase, cellobiase, caseinase, gelatinase and esterase), besides the production of killer toxins. Of the 175 isolates obtained, 125 are yeasts and 50 yeast-like fungi. The 125 yeasts isolated belong to 45 species, eight with ascomycetic affinity and 37 with basidiomycetic affinity. Seven isolates had their 26S rDNA D1/D2 regions sequenced and four belong to two yet undescribed species of the genus *Bullera*. Of the 175 isolates, 29.1% were positive for amylase, 46.3% for caseinase and 9.7% for gelatinase. One hundred and thirty-eight isolates were tested for esterase activity, and 81.5% were producers of the enzyme. Of the 126 strains tested for the production of cellobiase, 74.8% produced the enzyme. Approximately 4.5% of the isolates of yeasts and yeast-like fungi had "killer" activity. Therefore, the phylloplane of fig trees demonstrates to be a good substrate for the isolation of yeasts, including new species. These yeasts have the potential to contribute effectively to the biotechnological innovation.

² Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (113 p.). March, 2008.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	vii
RELAÇÃO DE TABELAS.....	ix
RELAÇÃO DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1 Mata Atlântica: reservatório de biodiversidade.....	04
2.2 Parque de Itapuã: unidade de conservação e proteção integral.....	06
2.3 As figueiras.....	07
2.4 Leveduras e fungos semelhantes a leveduras.....	09
2.5 Taxonomia convencional de leveduras e fungos semelhantes a leveduras.....	13
2.6 Taxonomia molecular de leveduras.....	14
2.7 Potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras.....	15
2.7.1 Potencial enzimático.....	15
2.7.2 Produção de toxinas “killer”.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Coleta, isolamento e conservação dos isolados de figueiras.....	19
3.2 Caracterização convencional de leveduras e fungos semelhantes a leveduras.....	20
3.2.1 Características macromorfológicas.....	21
3.2.1.1 Morfologia colonial.....	21
3.2.1.2 Detecção de balistosporos.....	21
3.2.2 Características micromorfológicas.....	22
3.2.2.1 Morfologia celular.....	22
3.2.2.2 Formação de ascosporos.....	23
3.2.2.3 Microcultivo em lâmina.....	23
3.2.3 Testes bioquímicos/fisiológicos.....	24
3.2.3.1 Testes de fermentação.....	24
3.2.3.2 Assimilação de fontes de carbono.....	25
3.2.3.3 Assimilação de fontes de nitrogênio.....	26
3.2.3.4 Teste de produção de urease e reação ao Diazonium Blue B (DBB).....	26
3.2.3.5 Crescimento em diferentes temperaturas.....	27
3.2.3.6 Teste de tolerância ao NaCl 10% e 16%.....	27
3.2.3.7 Teste de tolerância à glicose 50%.....	28
3.2.3.8 Produção de compostos amilóides.....	28
3.3 Taxonomia molecular de leveduras.....	29
3.3.1 Seqüenciamento do rDNA.....	29
3.4 Verificação do potencial biotecnológico.....	30
3.4.1 Avaliação semiquantitativa do perfil enzimático.....	30
3.4.1.1 Produção de celobiase e esterase.....	30
3.4.1.2 Produção de amilase.....	31
3.4.1.3 Produção de caseinase.....	31

3.4.1.4 Produção de gelatinase.....	32
3.5 Teste para detectar linhagens com fenótipo “killer”.....	32
3.6 Listagem de meios de cultura utilizados.....	33
3.7 Listagem de equipamentos utilizados no laboratório.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Isolamento e purificação dos isolados de figueira.....	34
4.2 Identificação fenotípica dos isolados de figueiras.....	34
4.2.1 Testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos das culturas isoladas de figueiras.....	51
4.3 Taxonomia molecular de leveduras.....	51
4.3.1 Seqüenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA	51
4.4 Freqüência das espécies isoladas segundo as plantas amostradas.....	57
4.5 Potencial biotecnológico.....	60
4.5.1 Avaliação semi-quantitativa do perfil enzimático.....	60
4.5.2 Avaliação de atividade “killer”	71
5. CONCLUSÕES.....	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
7. APÊNDICES.....	77
8. VITA.....	110

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1:	Listagem das culturas isoladas, identificação presuntiva, substrato de origem e amostra correspondentes.....	36
Tabela 2:	Freqüência das espécies de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados segundo as plantas amostradas.....	58
Tabela 3:	Perfil enzimático das leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de figueiras no Parque de Itapuã.....	61

APÊNDICES

Tabela 1:	Listagem de meios de cultura utilizados.....	83
Tabela 2:	Listagem dos equipamentos utilizados no laboratório.....	85
Tabela 3:	Resultados dos testes morfológicos e bioquímicos/fisiológicos das culturas isoladas de figueiras.....	86
Tabela 4:	Perfil bioquímico dos isolados de figueiras.....	98

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1:	Seqüência consenso da região D1/D2 do 26S rDNA dos isolados FI 50, FI 91 e FI 113 (<i>Bullera</i> sp. nov. 1).....	52
Figura 2:	Alinhamento da região D1/D2 da seqüência consenso das leveduras FI113, FI50 e FI91 e <i>Bullera arundinariae</i> TISTR 5798 (AF547661.1).....	53
Figura 3:	Seqüência da região D1/D2 do 26S rDNA da cepa FI 87 (<i>Bullera</i> sp. nov. 2).....	54
Figura 4:	Alinhamento entre as seqüências da região D1/D2 das leveduras FI87 e <i>Bullera arundinariae</i> TISTR 5798 (AF547661.1).....	55
Figura 5:	Alinhamento entre as seqüências da região D1/D2 consenso entre as leveduras FI113, FI50 e FI91 e a levedura FI87.....	56
Figura 6:	Porcentagem absoluta do perfil enzimático avaliado nos isolados de figueiras.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

cm: Centímetro

DNA: Ácido desoxirribonucléico

h: hora

mL: Mililitro

min: minuto

μL: Microlitro

μm: Micrômetro

pH: Logaritmo decimal do inverso da atividade de íons hidrogênio numa solução

RNA: Ácido ribonucléico

rpm: Rotações por minuto

S: Svedberg, unidade de sedimentação

s: segundo (segundos)

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um dos mais ricos conjuntos de ecossistemas em termos de biodiversidade do mundo e, devido ao seu desmatamento, várias espécies podem ter sido extintas antes mesmo de serem conhecidas. Infelizmente, ainda hoje a Mata continua sob ameaça e principalmente espécies endêmicas correm risco de extinção. O estudo e a identificação das espécies existentes, juntamente com a sua conservação são as maiores garantias para a estabilidade física dessa área tão importante. Apesar de sua história de devastação, a Mata Atlântica ainda possui remanescentes florestais, como próximo a Porto Alegre, o Parque Estadual de Itapuã, uma unidade de conservação de proteção integral, que detém nas suas formações vegetais e animais uma diversidade de organismos superiores e, potencialmente, de microrganismos. Dentre as plantas, a figueira destaca-se por sua abundância no parque e por interagir com diversos organismos, tanto no macroambiente como no microambiente.

As leveduras estão presentes em quase todos os habitats da Terra, interagindo de forma saprofítica com as plantas por estas apresentarem um grande número de nutrientes disponíveis, oriundos da própria folha, fruto ou de outras fontes que se acumulam na superfície pela ação do vento, chuva, e insetos. Desta forma, associam-se tanto à superfície externa das folhas, quanto ao interior de frutos, entre outros (exudatos, etc). A capacidade das leveduras colonizarem diferentes plantas contribui para a diversidade de espécies. No Brasil, poucas espécies de leveduras foram descritas, mas devido à grande biodiversidade brasileira, há possibilidade de descoberta de novas espécies.

As leveduras têm sido utilizadas pelo homem há milhares de anos em processos fermentativos, e atualmente novos potenciais biotecnológicos têm sido explorados na indústria. Uma das áreas onde este potencial pode ser verificado é na produção de enzimas. A procura de novos microrganismos com potencial biotecnológico, representada pela etapa inicial de seleção, pode ser feita através da exploração da biodiversidade como uma fonte de inovação biotecnológica. Outra das aplicações biotecnológicas das leveduras é a inibição do crescimento de fungos patogênicos para o homem. Há relatos que na competição entre leveduras, as saprofíticas inibem o crescimento das linhagens patogênicas. A ampliação do número de isolados com capacidade de inibir leveduras patogênicas é de extremo interesse para o estudo do controle de infecções fúngicas. Outra forma de manifestação desta inibição é por meio da produção de toxinas "killer". Apesar da presença de leveduras associadas a plantas ser um fato conhecido, poucos estudos tem sido

realizados visando à avaliação do seu potencial biotecnológico, com isso, a real extensão deste potencial permanece desconhecida. Estudos que avaliem o potencial biotecnológico destas diferentes leveduras poderão contribuir efetivamente para a inovação biotecnológica.

Baseado nas afirmações acima, este trabalho teve como objetivos:

- Isolar e identificar leveduras associadas ao filoplano de figueiras no Parque de Itapuã;
- Verificar a produção de enzimas extracelulares de interesse biotecnológico (celobiase, amilase, esterase, caseinase e gelatinase) pelas leveduras isoladas e selecionar cepas com boa produção;
- Verificar a produção de toxinas “killer” pelas leveduras isoladas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mata Atlântica: reservatório de biodiversidade

As florestas tropicais são os ecossistemas que detêm a maior diversidade de espécies dentre todos os demais do planeta. A Mata Atlântica é considerada atualmente como um dos mais ricos conjuntos de ecossistemas em termos de diversidade biológica. Alguns fatores que contribuem para esta diversidade são a grande variação latitudinal (de 5° a 25° de latitude sul), e a variação de altitudes (desde o nível do mar até mais de 1000 metros acima). A Mata Atlântica está presente tanto na região litorânea como nos planaltos e serras do interior, do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, representada principalmente pela Floresta Ombrófila Densa, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Estacional Decidual, associadas a ecossistemas costeiros de restingas, mussunungas e mangue (Almeida, 2000).

Nestes cinco séculos pós-descobrimento, o país passou por diferentes ciclos econômicos (pau-brasil, cana-de-açúcar, mineração, café e pecuária), todos concentrados na faixa litorânea e responsáveis pelo

desmatamento e fragmentação da Mata Atlântica (Almeida, 2000). A população que vive na área da Mata Atlântica é de aproximadamente 100 milhões de habitantes, os quais exercem enorme pressão sobre seus remanescentes, seja por seu espaço, seja por seus inúmeros recursos. Ainda que restem somente 7,3% de sua área original e que a maioria das espécies brasileiras ameaçadas de extinção pertençam a este ecossistema, a Mata Atlântica apresenta uma das maiores biodiversidades do planeta. Justamente pela ameaça que sofre e por sua imensa riqueza, traduzida em um alto grau de endemismo. A Mata Atlântica foi classificada como um dos 25 “hot spots” do mundo para a conservação (Simões & Lino, 2002).

A primeira iniciativa para buscar uma definição científica para a Mata Atlântica ocorreu em 1989, baseada em critérios botânicos e fitofisionômicos, cruzados com considerações de natureza geológica e geográfica e, considerando ainda, as questões relativas a conservação ambiental. Esta definição foi posteriormente aprimorada e submetida ao Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, que a aprovou em 1992, estabelecendo o conceito de Domínio da Mata Atlântica. Desta forma, passaram a ter a denominação genérica de Mata Atlântica as áreas primitivamente ocupadas pelas formações vegetais constantes no Mapa de Vegetação do Brasil (IBGE, 1990) que formavam originalmente uma cobertura florestal praticamente contínua nas regiões sul, sudeste e, parcialmente, nordeste e centro-oeste.

2.2. Parque de Itapuã: unidade de conservação e proteção integral

O Parque Estadual de Itapuã foi criado em 1973 e fechado 18 anos depois, sendo reaberto apenas em abril de 2002. Localizado a 57 km de Porto Alegre, no município de Viamão, coordenadas: 30°20' a 30°27' S; 50°50' a 51°05' W, o Parque de Itapuã (ponta de pedra) protege a última amostra dos ecossistemas originais da região metropolitana de Porto Alegre, com campos, dunas, lagoas, banhados, praias e morros, às margens do lago Guaíba e da laguna dos Patos (<http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/bioconh5.htm>, acessado em 06/02/2008). As restrições às visitas, durante dez anos, foram necessárias para proteger a natureza, que estava sendo prejudicada pela interferência do homem e amenizar a descaracterização e ameaça à unidade de conservação de proteção integral. O espaço acabou vítima de visitação desordenada, exploração de pedreiras e sua área foi ocupada por loteamentos clandestinos. Em 1991, por decisão judicial foram retiradas as cerca de mil casas existentes na área (<http://www.popa.com.br/docs/misc/itapoa/itapoa.htm>, acessado em 06/02/2008).

Nas suas formações vegetais, características dos morros graníticos, ocorrem mais de 300 espécies, destacando-se a figueira, a corticeira-do-banhado, o jerivá, o butiazeiro, além de orquídeas, cactos e bromélias. A cobertura vegetal apresenta-se bastante diversificada em função de fatores ambientais determinantes, registrando-se não somente a restinga litorânea, como formações bastante distintas, nas quais ocorrem, de modo geral, fragmentos florestais com elementos da Mata Atlântica e com fâcies xerofíticas

(mata baixa) nas encostas dos morros graníticos (Escudo Riograndense) e vales com grande diversidade de tipos fisionômicos-florísticos. Esta variedade vegetal, poucas vezes encontrada em áreas desta dimensão, normalmente encontradas separadas por muitos quilômetros, são vizinhas na área do Parque. O Parque de Itapuã abriga várias espécies animais, como o bugio-ruivo, a lontra e o jacaré - do - papo - amarelo. A lagoa Negra, com 1.750 ha, é importante ponto de parada de aves migratórias e refúgio para outras espécies. No parque existem locais históricos como o morro da Fortaleza, a ilha do Junco e a Ferraria dos Farrapos, ligados à Revolução Farroupilha; o Farol de Itapuã, construído em 1860, marca o encontro do lago Guaíba com a laguna dos Patos (Rio Grande do Sul, 1997). Além de receber o público, o parque tem como objetivos a conservação da biodiversidade, a pesquisa científica e a educação ambiental.

2.3 As figueiras

As figueiras pertencem ao grupo das Angiospermas, ou seja, das plantas cujas sementes ficam dentro de um fruto, e segundo a classificação de muitos autores incluem-se na família Moraceae (Carauta & Diaz, 2002). Há mais de 1000 espécies distribuídas por todas as regiões tropicais do planeta, atingindo também regiões subtropicais. A metade das espécies ocorre na Ásia e Oceania, um terço na África e as restantes nas Américas. No Brasil, onde não são encontradas muitas figueiras nativas, estima-se que existam cerca de 100 espécies, mas somente 65 já foram descritas. A região norte é a mais rica em espécies, seguindo-se a centro-oeste, sudeste, sul e nordeste (Carauta,

1989). Segundo Carauta & Diaz (2002), no Rio Grande do Sul há sete espécies nativas: *Ficus pertusa*, *F. organensis*, *F. monckii*, *F. guaranítica*, *F. glabra*, *F. enormis* e *F. adhatodifolia*. Em um trabalho mais atual de Sobrel *et al.* (2006), *F. cestrifolia* Schott é o nome válido para *F. organensis* (Miq.) Miq., sendo as outras espécies nativas do Rio grande do Sul: *Brosimum glazioui* Taub., *F. adhatodifolia* Schott, *F. citrifolia* Mill., *F. eximia* Schott, *F. luschnathiana* (Miq.) Miq., *Machura tinctoria* (L) Don ex Steud e *Sorocea bonplandii* (Baill.). Algumas plantas classificadas como sendo de outras famílias, que não Moraceae, também são conhecidas como figueiras. É o caso de *Coussapoa microcarpa* (Schott) Rizzini, classificada como Urticaceae, mas conhecida popularmente como figueira mata-pau (Sobrel *et al.*, 2006).

As figueiras foram das primeiras plantas cultivadas pelo homem. Desde a antigüidade, gregos, romanos e outros povos utilizavam os figos na alimentação, as folhas na medicina e o caule na indústria. Além disso, possuem outras utilidades: o sistema radicular é tão extenso que é capaz de fixar o solo e impedir a erosão; o caule escultural as torna indispensáveis em parques e jardins; a sombra das copas fornece abrigo para homens e animais; suas cascas e reentrâncias abrigam várias epífitas; as folhas podem ser usadas como lixa, em mistura à forragem para a alimentação do gado ou como germinador de cevada; os figos maduros são consumidos por mamíferos, aves, répteis e até peixes, além do homem; o látex, folhas e figos das espécies do subgênero *Pharmacosycea* são tidos como medicinais (Carauta, 1989).

As figueiras são caracterizadas pelo agrupamento das flores masculinas e femininas numa inflorescência, popularmente confundida com um

fruto, denominada sicônio, ou figo. Sabe-se que a autopolinização dentro do figo não ocorre, pois as flores masculinas amadurecem depois da época em que as flores femininas precisam ser polinizadas. Com isso, estima-se que há cerca de 100 milhões de anos, as figueiras dependam das vespas-do-figo para sua polinização (Figueiredo *et al.*, 1995). As figueiras não geram sementes sem a vespa e, esta não pode procriar sem a figueira, formando uma associação de mutualismo. De acordo com Atlas & Bartha (1997), há uma relação estreita entre figos, leveduras e vespas-do-figo.

2.4 Leveduras e fungos semelhantes a leveduras

As leveduras constituem um grupo de microrganismos unicelulares pertencentes ao Reino Fungi que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou por fissão binária. Possuem núcleo organizado com membrana nuclear (célula eucariótica), são aclorofiladas, a nutrição é heterotrófica através de absorção dos nutrientes, a parede celular é rígida, podem produzir células especializadas: os esporos. Mas ao contrário dos fungos filamentosos, elas não formam corpos de frutificação (Kurtzman & Fell, 1998). Apresentam uma relação bastante grande com os basidiomicetos e com os ascomicetos, devido à produção de esporos e por isso são encontradas em seus respectivos filos. Podem também ser encontradas entre os fungos mitospóricos, que são aqueles sem reprodução sexuada conhecida, constituindo um grupamento artificial (Hawksworth *et al.*, 1995).

Os fungos semelhantes a leveduras são fungos dimórficos, cujo dimorfismo não está associado à temperatura, mas a algum outro fator

ambiental, como nutrientes. Estes fungos apresentam-se na forma filamentosa na maior parte do tempo, por isso são identificados como os filamentosos, com base na morfologia. Mas, também crescem na forma de levedura (unicelular), em meios de cultura ricos em açúcar, como os de isolamento de leveduras.

Algumas leveduras são capazes de crescimento anaeróbico facultativo. Quando usam o oxigênio, fazem a respiração aeróbica para metabolizar os hidratos de carbono, formando assim CO_2 e água. Na falta do oxigênio, elas podem fazer fermentação, ou seja, fermentar os hidratos de carbono, produzindo CO_2 e etanol. Leveduras basidiomicéticas e muitas ascomicéticas não são capazes de fermentar, mas outras, como *Saccharomyces cerevisiae* são fortes fermentadoras. Devido a essa fermentação, estes microrganismos apresentam um papel muito importante na indústria. O homem há muito tempo vem utilizando leveduras para a produção de bebidas alcoólicas fermentadas (vinho e cerveja) ou destiladas (rum, vodca, uísque, etc), álcool industrial, alimentos, remédios, entre outros.

As leveduras têm ampla distribuição na natureza. Podemos encontrá-las em solos nus ou em solos com vegetação natural (campos, matos e florestas) ou em cultivados (parreiras, pomares, jardins, etc.). A superfície externa da folha (filoplano) é um importante substrato para o desenvolvimento de leveduras. Segundo Kurtzman & Fell (1998), o filoplano é um nicho ecológico habitado por saprófitas e parasitas. Os nutrientes que estão disponíveis no filoplano, servindo de base ao desenvolvimento das populações de leveduras são depositados através do vento ou carreamento por insetos e outros organismos (Andrews & Harris, 2000; Herzberg, 2004). A população de

microrganismos varia conforme condições físicas e nutricionais no filoplano, como: luz, temperatura, umidade e, principalmente, disponibilidade de água (Ruinen, 1963). Algumas leveduras produzem abundantes pigmentos carotenóides, provavelmente, como fator de proteção à exposição de luz direta na folha (Atlas & Bartha, 1997). Outras, apresentam características que contribuem para sua permanência na superfície externa de diversas plantas, como produção de balistosporos, que são esporos que são lançados à distância e podem ser dispersos pelo vento (Bab'eva & Chernov, 1995; Lindow & Brandl, 2003). A disponibilidade de carbono como nutriente nas folhas é o principal determinante na colonização epifítica (Lindow & Brandl, 2003). De acordo com Mercier & Lindow (2000), fontes de nitrogênio e moléculas inorgânicas essenciais também devem estar presentes, sendo que a abundância de nutrientes pode variar de acordo com a espécie da planta, idade da folha e condições de crescimento (Fiala *et al.*, 1990). A alta especificidade entre algumas comunidades de leveduras e seus microhabitats pode ser influenciada por características do habitat e vetores (Araújo *et al.*, 1998). Em figueiras, a dispersão de leveduras para as folhas pode ocorrer por animais como: bugios e insetos, atraídos pelo figo. Sabe-se que, frutas são importantes microhabitats para uma variedade de espécies de leveduras na natureza devido à alta concentração de açúcares e baixo pH (Lachance & Starmer, 1998). Entretanto, no Brasil, Gomes *et al.* (2003) em pesquisa realizada com leveduras associadas a figos infestados por *Zaprionus indianus* (Dip.: Drosophilidae), isolaram somente uma espécie de levedura - *C. tropicalis.*, demonstrando que existe uma interação estreita e incomum entre o

microrganismo e o inseto em figos (*Ficus carica*). Estudos realizados a respeito da identificação de leveduras isoladas do filoplano de figueiras não são conhecidos, assim como, em figos nativos do Brasil.

A maioria das espécies de leveduras encontradas no filoplano é de afinidade basidiomicética. Estas leveduras possuem um perfil assimilativo amplo com relação às fontes de carbono quando comparadas com as leveduras ascomicéticas, que se restringem a poucas fontes de carbono (Kutzman & Fell, 1998). As leveduras basidiomicéticas são normalmente encontradas em substratos que possuam componentes mais complexos, como folhas e solo, enquanto as com afinidade ascomicética são freqüentemente encontradas em substratos ou fontes ricas em açúcares simples, como frutos (Santos *et al.*, 1997).

Os gêneros de leveduras basidiomicéticas comumente encontrados associados ao filoplano de plantas são: *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* (*Sporidiobolus*). Dentre as leveduras ascomicéticas, o gênero mais comum é *Candida*. Porém, em um trabalho realizado por Middelhoven, (1997), *Debaryomyces hansenii*, de afinidade ascomicética, foi encontrada como a levedura predominante em filoplano de diversas plantas nas Ilhas Canárias. Contudo, a presença de espécies ascomicéticas tem sido pouco relatada na literatura. De acordo com Do Carmo-Souza (1969), as espécies de leveduras capazes de utilizar grande variedade de compostos são encontradas com maior freqüência no filoplano, pois as fontes de carbono simples estão presentes em concentrações muito baixas. Dentre os fungos semelhantes a leveduras, os mais comumente encontrados em filoplano de diversas plantas

são os do gênero *Aureobasidium*, destacando-se *A. pulullans*, que pertence a um grupo denominado de leveduras pretas devido à coloração que adquire depois de algum tempo mantido em laboratório. Isto ocorre, provavelmente, devido à formação de clamidósporos (células resistentes, com parede celular espessa) melanizados (de Hoog & Yurlova, 1994).

Estima-se que existam 1,5 milhões de espécies de fungos no planeta, sendo 100 mil de leveduras. Hoje, cerca de 1400 espécies de leveduras estão descritas. Considerando a diversidade de ecossistemas e a estimativa do nosso país abrigar 20% da biodiversidade do planeta, o estudo de biodiversidade com leveduras no Brasil está no começo, pois apenas 32 espécies foram publicadas, correspondendo a 1,6% do total de espécies já descritas (Dr. Carlos Rosa, UFMG, comunicação pessoal). Trabalhos sobre este tema são recentes, e foram principalmente desenvolvidos na década de 90 (Morais *et al.*, 1992; Hagler *et al.*, 1993; Morais *et al.*, 1996; Prada & Pagnocca, 1997; Abranches *et al.*, 1998; Araujo *et al.*, 1998; Abranches *et al.*, 2000; Buzzini & Martini 2000; Pimenta, 2001) em regiões de Mata Atlântica no sudeste brasileiro. No exterior, cada vez mais trabalhos surgem focalizando a descrição de espécies novas (Fungsin *et al.*, 2001; Fungsin *et al.*, 2002; Inácio *et al.*, 2002; Inácio & Fonseca, 2004; Prakitchaiwattana *et al.*, 2004; Wang & Bai, 2004; Wang *et al.*, 2004; Inácio *et al.*, 2005; Fungsin *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Kurtzman, 2007; Peter *et al.*, 2007).

2.5 Taxonomia convencional de leveduras e fungos semelhantes a leveduras

A identificação das culturas de leveduras é realizada de acordo com caracteres morfológicos e testes bioquímico-fisiológicos. Com relação à morfologia, são observadas as características coloniais e celulares. E com relação à fisiologia, são realizados testes de fermentação de diferentes açúcares, de urease e reação ao corante *diazonium blue B* (DBB), de crescimento em diferentes temperaturas, assimilação de diversas fontes de carbono e nitrogênio, tolerância ao NaCl, formação de compostos amilóides, entre outros (Barnett *et al.*, 2000).

2.6 Taxonomia molecular de leveduras

A taxonomia agrupa organismos relacionados filogeneticamente dentro de um mesmo táxon, utilizando caracteres informativos no nível genético em conjunto com os testes convencionais. Os testes moleculares são cada vez mais utilizados para identificação de espécies com difícil visualização de características micromorfológicas, como os esporos. Além disso, são uma ferramenta indispensável na análise filogenética de leveduras (Kurtzman & Robnett, 1998). A escolha da região a ser seqüenciada é vital para a análise entre os organismos, sendo normalmente utilizado o rDNA, entre outras razões, por estar presente e ser homólogo em todos os organismos vivos, e por possuir partes muito conservadas intercaladas por outras variáveis. A região gênica do rDNA possui as seguintes estruturas na disposição 5'-3': a região espaçadora externa (ETS), o gene 18S, a região espaçadora interna (ITS1), o gene 5.8S, uma segunda região espaçadora interna (ITS2) e o gene 26S. Este último gene apresenta as seqüências menos conservadas, em relação aos genes 18S e

5.8S, sendo a região de escolha para estudos de filogenia de espécies e grupos taxonômicos mais relacionados. A região D1/D2 do 26S rDNA tem sido utilizada para diferenciar quase todas espécies estudadas (Kurtzman & Robnett, 1998). Porém, o sequenciamento desta região não é capaz de diferenciar todas as espécies de leveduras de afinidade basidiomicéticas, sendo necessário o sequenciamento conjunto da região ITS (Scorzetti *et al.*, 2002).

2.7 Potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras

As leveduras destacam-se por seu potencial biotecnológico, ou seja, por portar genes responsáveis por características interessantes industrialmente, como por exemplo, capazes de produzir enzimas de interesse industrial. Elas também podem ter o seu potencial biotecnológico aplicado à inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos e patogênicos para o ser humano, tendo uma atividade antagonista realizada pelas leveduras saprofiticas (Shigemori *et al.*, 1998).

2.7.1 Potencial enzimático

A triagem de microrganismos com potencial para uso biotecnológico se inicia com a seleção do microrganismo que possui a característica desejada (Steele & Stowers, 1991). Algumas indústrias têm preferência por seleção de microrganismos de ambientes naturais, pois estes são mais aceitos para comercialização. Pesquisas demonstram que microrganismos produtores de

enzimas de interesse biotecnológico são aplicados nas indústrias de alimentos, farmacêutica, têxtil, dentre outras (Strauss *et al.*, 2001; Subash *et al.*, 2005). Outros estudos demonstram o alto potencial de leveduras isoladas de ambientes tropicais na produção de várias enzimas utilizadas na indústria (Buzzini & Martini, 2002; Abranches, 1997; Braga *et al.*, 1998; Fuentesfria & Valente, 2005; Landell *et al.*, 2005).

Uma grande variedade de segmentos industriais utiliza enzimas amilolíticas de origem microbiana para converter o amido em unidades fundamentais de glicose. Apesar da produção de amilase ser obtida principalmente a partir de linhagens de fungos filamentosos, várias espécies de leveduras têm sido relatadas com capacidade de degradação do amido, podendo ter alguma aplicação industrial direta ou indireta (Gundllapalli *et al.*, 2002). As α -amilases fúngicas são utilizadas em processos de panificação e em rações para melhorar a digestão.

As esterases são capazes de catalisar reações de hidrólise, esterificação, transesterificação e lactonização, conferindo a estas enzimas um potencial enorme de aplicações. Possuem aplicações diretas nas indústrias de química fina e farmacêutica, como, por exemplo, na resolução de misturas racêmicas nos processos de modificações estruturais em moléculas de drogas, na síntese de flavorizantes para a indústria de alimentos e na modificação de triglicerídeos para a indústria de óleos. Embora as esterases possuam importantes aplicações industriais, uma importante limitação na propriedade físico-química desta enzima impede o seu uso em larga escala na indústria: as

esterases são termolábeis, principalmente em altas temperaturas, prejudicando processos químicos industriais (Kademi *et al.*, 1999; Molinari *et al.*, 1996).

As proteases são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, principalmente nos processos de fermentação e produção de alimentos orientais como o molho soyo, na produção de gelatina hidrolisada e leite de soja e na clarificação de sucos através da hidrólise das proteínas solúveis neles contidas em altas concentrações (Rao *et al.*, 1998). As proteases são também empregadas na produção de derivados lácticos como os queijos, atuando na maturação e desenvolvimento da textura e sabor, devido à ação das proteases na beta-caseína do leite (Visser, 1993).

2.7.2 Produção de toxinas “killer”

Leveduras “killer” (micocinogênicas) produzem uma toxina extracelular letal a outras leveduras, que são chamadas leveduras sensíveis (Golubev, 1997), através de um mecanismo específico que atua em receptores da parede e membrana celular da célula sensível. As cepas micocinogênicas são imunes para o efeito de sua própria toxina, mas podem ser suscetíveis a toxinas produzidas por outras cepas produtoras da toxina (Schmitt & Breinig, 2002). O fenômeno “killer” em leveduras foi relatado pela primeira vez por Makower e Bevan em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Buzzini & Martini, 2000). A função e o papel destas toxinas em comunidades naturais de leveduras não são bem conhecidos, porém a maioria dos autores sugere que estas toxinas representam um importante papel na ecologia das leveduras, através da eliminação de linhagens sensíveis em substratos onde estas co-

existem com leveduras “killer”, conforme relata Abranches *et al.*, (1997). A natureza do fenômeno micocinogênico sugere que este seja um mecanismo potencial de competição por interferência, onde a produção de compostos tóxicos evita que o competidor tenha acesso aos recursos. Buzzini & Martini (2000) relataram alta incidência de atividade “killer” em leveduras isoladas de floresta brasileira. Nos últimos anos, inúmeras aplicações potenciais para o fenômeno “killer” têm sido descobertas. Dentre estas, a inibição do crescimento de fungos patogênicos para o homem com o objetivo de desenvolvimento de novos agentes antifúngicos para o tratamento de micoses humanas (Séguy *et al.*, 1998; Schmitt & Breinig, 2002). Walker *et al.* (1995) estudaram leveduras com ampla atividade contra fungos fitopatogênicos, deterioradores de madeira e patógenos humanos oportunistas, indicando que tais leveduras podem ter potencial para um novo agente de biocontrole antimicótico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta, isolamento e conservação dos isolados de figueiras

Foram realizadas 6 coletas de exemplares de figueiras, a cada dois meses, entre os dias 21 de abril de 2005 e 08 de março de 2006, em diferentes pontos do Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul. As leveduras foram isoladas a partir do filoplano e do sicônio das seguintes espécies de figueiras: *Ficus cestrifolia*, *F. luschnathiana* e *Coussapoa microcarpa*. Em cada coleta foram amostrados 10 exemplares de folhas, totalizando 60 amostras. Foram amostrados 3 exemplares de sicônio, sendo 1 na primeira coleta e 2 na segunda. As folhas e sicônios foram fotografadas, coletadas assepticamente e colocadas em sacos plásticos individuais etiquetados. As amostras foram levadas ao laboratório para processamento, onde foram lavadas com água destilada estéril para retirada da poeira acumulada e outros artefatos eventualmente presentes. Após, as folhas foram

cortadas assepticamente com bisturi, em fragmentos de 1 a 3 cm², totalizando uma área de 10 cm², colocadas em Erlenmeyer com 50mL de água estéril e mantidas no agitador mecânico do tipo orbital por 10 min. Esta água foi descartada e acrescentou-se 30mL de uma solução de Tween 20 0,5% ao frasco, que foi então levado novamente ao agitador mecânico por 30 minutos. A solução de Tween 20 foi descartada e este processo repetido mais uma vez. Após nova agitação, foram feitas diluições decimais seriadas até 10⁻². Já no isolamento de leveduras do sicônio, a polpa foi retirada e um grama pesado em balança de precisão em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar), onde a polpa foi macerada com gral e pistilo. Após foram feitas diluições seriadas até 10⁻⁵. As diluições das folhas (10⁰, 10⁻¹ e 10⁻²) e dos sicônios (10⁻² até 10⁻⁵) foram semeadas em duplicata pela técnica de espalhamento em superfície em meio Ágar YM (tabela 1 - Apêndices) acrescido de 0,04% cloranfenicol pH 4,0. Estas placas foram incubadas a 25°C por 5 a 7 dias. Após foi realizado o isolamento das culturas de leveduras por esgotamento em placa duas vezes consecutivas em meio Ágar YEPG (tabela 1 - Apêndices) para verificação da pureza. Os isolados obtidos foram conservados em tubos de ensaio com meio GYMP (tabela 1 - Apêndices) cobertos por uma camada de óleo mineral estéril e mantidos em geladeira. Posteriormente, foram armazenados nas Coleções de Culturas do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS.

3.2 Caracterização convencional de leveduras e fungos semelhantes a leveduras

As leveduras e fungos semelhantes a leveduras foram caracterizados fenotipicamente conforme características morfológicas e fisiológicas (Yarrow, 1998). A identificação das leveduras foi realizada de acordo com Barnett *et al.*, 2000 e o banco de dados do Centralbureau voor Schimmelcultures (Holanda), que compara as características fisiológicas das leveduras a serem identificadas com as de espécies já descritas. A classificação dos fungos semelhantes a leveduras foi realizada com base em fatores macro e micromorfológicos, tais como cor, textura da colônia e morfologia da hifa. Em algumas vezes, características fisiológicas também foram avaliadas, tais como testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, e crescimento em diferentes temperaturas. Os testes foram analisados baseados nos métodos empregados para a identificação convencional de leveduras (Yarrow, 1998; Barnett *et al.*, 2000).

3.2.1 Características macromorfológicas

3.2.1.1 Morfologia colonial

Foram observadas as características coloniais como cor (branca, creme, amarelada, laranja, rosa, vermelha, marrom, preta); brilho (brilhante, opaca); forma (circular, oval ou fusiforme); margem (regular, irregular, lobada ou com raízes); superfície (lisa ou rugosa); elevação (plana, convexa, umbonada ou vulcão) e consistência (cremosa, mucóide, butirosa, membranosa, esfarelada, dura, seca), de acordo com Yarrow (1998).

3.2.1.2. Detecção de balistosporos

A produção de balistosporos é um fator importante para a diferenciação entre espécies de leveduras com afinidade basidiomicética. Os balistosporos, quando amadurecidos, são ejetados para o meio ambiente violentamente. Uma característica indicativa de que os balistosporos estão sendo produzidos pelo isolado é a produção espontânea de colônias satélites (Kreger-van Rij, 1984; Neufeld, 1999). Para a visualização dessa característica, a levedura suspeita foi inoculada na superfície de uma placa contendo Ágar água (Ágar 2% e água). Logo após, a base desta placa foi fechada com a base de outra placa contendo Ágar YEPG, selando ambas, assepticamente, com fita adesiva. A placa foi incubada com a base contendo o inóculo para cima, por 7 dias a 25°C. As culturas produtoras de balistosporos cresceram no Ágar YEPG de maneira idêntica ao semeado no Ágar água.

3.2.2 Características micromorfológicas

3.2.2.1 Morfologia celular

Foram realizadas lâminas a fresco a partir do crescimento de culturas recentes em Agar YEPG incubadas a 22-25°C. A observação foi feita em microscopia óptica com aumento de 400 a 1000 vezes. Foram observadas as seguintes características celulares: forma (circular, oval, cilíndrica, fusiforme, apiculada, entre outras); tamanho da célula; presença de pseudomicélio; tipo de reprodução assexuada (brotamento e/ou fissão); tipo de brotamento (multipolar, bipolar, unipolar); presença de ascosporos e de balistosporos, conforme Kurtzman & Fell (1998) e Barnett *et al.* (2000).

3.2.2.2 Formação de ascósporos

A observação da produção de ascósporos pelas leveduras com afinidade ascomicética foi realizada utilizando como meio para induzir a sua produção Ágar acetato (tabela 1 - Apêndices) e incubação a 22-25°C por até um mês. A pequena quantidade de carboidratos nesse meio de indução restringe o crescimento vegetativo e aumenta a produção de ascósporos. Foram observadas, em microscopia óptica, a presença ou ausência de conjugação, forma e número de ascósporos por asca e liberação ou não de esporos logo após a sua formação.

3.2.2.3 Microcultivo em lâmina

O microcultivo (cultivo em lâmina) foi a técnica escolhida para observação de pseudohifa ou de hifa verdadeira, utilizando o meio de cultura Ágar Fubá (tabela 1 - Apêndices). Dentro de uma placa de Petri, foram colocados dois palitos, uma lâmina de microscopia (sobre os palitos), uma lamínula e um chumaço de algodão. Após esterilização, por autoclave, do material, foram colocados assepticamente 1-2 mL de meio de cultura sobre a lâmina de microscopia dentro da placa de Petri. Após solidificação do meio, as leveduras e fungos semelhantes a leveduras foram inoculados por estriamento da agulha de inoculação sobre o meio de cultivo. Então, a lamínula foi colocada sobre o inóculo e foi adicionada água destilada estéril sobre o algodão. As placas foram incubadas por 7 dias a 22-25°C (Barnett *et al.*, 2000), sendo realizada a observação em microscópio óptico no aumento de 400 vezes.

3.2.3 Testes bioquímicos / fisiológicos

3.2.3.1 Testes de fermentação

A fermentação alcoólica pode ser considerada como a oxidação anaeróbica de um carboidrato com a produção final de álcool etílico e anidrido carbônico, além de outros produtos secundários. Se um carboidrato é fermentado, será assimilado, porém o contrário não é necessariamente uma verdade. Caso a fermentação ocorra, a glicose será sempre fermentada (Neufeld, 1999; Barnett *et al.*, 2000).

O teste de fermentação verificou a capacidade de cada levedura e fungo semelhante a levedura fermentar a glicose. Antes da realização dos testes, as culturas foram crescidas em Ágar YEPG para obtenção de células metabolicamente ativas. Estas culturas foram inoculadas em tubos de ensaios com meio para fermentação (MBF) (tabela 1 - Apêndices) contendo tubos de Durham invertidos no seu interior. Os tubos de fermentação foram lidos regularmente em 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 e 21 dias após a inoculação. A produção de gás foi observada pelo seu acúmulo nos tubos de Durham. A leitura foi considerada negativa quando não houve acúmulo de gás ou quando apenas foram observadas bolhas de gás no tubo de Durham, +1 quando somente 1/3 do tubo de Durham estava ocupado por gás, +2 quando o gás esteve presente em 2/3 do tubo e +3 quando o tubo de Durham tornou-se cheio de gás. As cepas com resultado +2 ou +3 foram consideradas fermentadoras. As que tiveram resultado positivo para fermentação de glicose foram testadas para fermentação de galactose e de maltose (Yarrow, 1998; Neufeld, 1999; Barnett *et al.*, 2000).

3.2.3.2 Assimilação de fontes de carbono

A capacidade de assimilação de diferentes fontes de carbono pelas leveduras foi testada utilizando as seguintes fontes: glicose, galactose, ribose, xilose, L-arabinose, D-arabinose, ramnose, maltose, trealose, inulina, amido solúvel, glicerol, eritritol, ribitol, glucitol, manitol, celobiose, salicina, melibiose, lactose, rafinose, inositol, lactato, citrato, N-acetil-glicosamina, e Tween 20. A propriedade de assimilar ou não diferentes fontes de carbono permite a distinção das espécies de acordo com seu padrão assimilativo. O método escolhido neste trabalho foi o de réplica em placas (Barnett *et al.*, 2000). As cepas metabolicamente ativas foram inoculadas em tubos contendo 2 mL de água destilada estéril por 1 a 2 dias (para que as leveduras esgotassem suas reservas energéticas). A padronização do inóculo foi realizada através do cartão de Wickerham, que estima a densidade celular através da turvação da solução, sendo que um número de células/mL entre 10^5 e 10^6 equivale ao grau 1 de Wickerham (Pfaller *et al.*, 1988). A densidade do inóculo nos tubos com água estéril foi medida pelo cartão de Wickerham no grau 0,5. Logo após, uma alíquota de 400 μ L de cada levedura foi adicionada em cada um dos 25 poços do replicador de Steer, instrumento que permite que vinte e cinco leveduras sejam testadas por vez. Placas contendo as fontes de carbono descritas anteriormente foram semeadas com as leveduras a serem testadas e incubadas por 21 dias a 22-25°C (Yarrow, 1998; Barnett *et al.*, 2000). Como controle positivo foi utilizada uma placa com meio yeast nitrogen base (YNB), glicose e Ágar, e como controle negativo uma placa com apenas YNB e Ágar. A leitura foi realizada conforme o crescimento das culturas sobre as placas.

3.2.3.3 Assimilação de fontes de nitrogênio

Leveduras e fungos semelhantes a leveduras possuem a capacidade de utilizar sulfato de amônia, asparagina, peptona e uréia aerobicamente como única fonte de nitrogênio. Porém, alguns compostos nitrogenados como nitrato de potássio, nitrito de sódio, lisina, creatina, creatinina, aminas alifáticas e alguns aminoácidos são seletivamente utilizados por diferentes leveduras (Neufeld, 1999; Barnett *et al.*, 2000).

Os testes seguiram a mesma técnica do teste de assimilação de fontes de carbono. As cepas foram inoculadas, a partir de culturas recentes em Ágar YEPG, em tubos contendo 2 mL de água destilada estéril, por até 2 dias, para que as leveduras esgotassem suas fontes energéticas. A densidade do inóculo nos tubos com água estéril foi de grau 0,5 pelo cartão de Wickerham. Então, uma alíquota de 400 μ L de cada levedura foi adicionada em cada um dos 25 poços do replicador de Steer. As placas contendo nitrato de sódio, lisina, etilamina, creatina e creatinina, como únicas fontes de nitrogênio, e yeast carbon base (YCB), como fonte de carbono, foram semeadas com as leveduras a serem testadas e incubadas por 21 dias a 22-25°C.

3.2.3.4 Teste de produção de urease e reação ao DBB

As cepas de leveduras foram inoculadas a partir de culturas recentes, em Ágar YCB-Uréia (tabela 1 - Apêndices), acrescido de fucsina ácida em quantidade até obter a cor desejada (rosa escuro). Os tubos de ensaio foram incubados a 25°C por 3 dias, sendo as leituras realizadas diariamente. A atividade da enzima urease quando presente na cepa provocou

uma viragem do indicador de uma cor rosa (fucsina) para branco. Após os três dias de leitura, as culturas foram incubadas a 60°C por 18 horas, sendo posteriormente adicionadas sobre o inóculo algumas gotas de uma solução contendo o reagente “Diazonium Blue B” (DBB) tamponado com Tris-HCL 1M para um pH 7.0. As culturas que adquiriram coloração avermelhada após o contato com o reagente DBB foram consideradas DBB positivas e de afinidade basidiomicética. As cepas que não desenvolveram cor avermelhada foram consideradas negativas e relacionadas aos ascomicetos (Barnett *et al.*, 2000; Yarrow, 1998).

3.2.3.5 Crescimento em diferentes temperaturas

As leveduras podem crescer numa ampla faixa de variação térmica (de 0 a 47°C), por isso o teste de crescimento em diferentes temperaturas pode contribuir para sua identificação. Este teste avalia a capacidade de crescimento das leveduras e fungos semelhantes a leveduras nas temperaturas de 37°C, 40°C e 42°C, sendo a temperatura ótima de crescimento para a maioria das espécies entre 20°C e 30°C. O teste de crescimento em diferentes temperaturas foi realizado com a utilização do caldo YEPG. Após a inoculação, os tubos foram incubados por três dias em banho-maria nas respectivas temperaturas testadas, sendo a leitura realizada diariamente pelo grau de turvação, de acordo com a escala de Wickerham (Yarrow, 1998; Barnett *et al.*, 2000).

3.2.3.6 Teste de tolerância ao NaCl 10% e 16%

As espécies de leveduras podem diferir na capacidade de crescimento em soluções hipertônicas, tornando essa característica mais uma ferramenta no conjunto de testes fenotípicos para a identificação desses microrganismos. Sendo assim, a capacidade de crescimento das leveduras foi avaliada durante 21 dias, em duas concentrações de soluções salinas hipertônicas: NaCl 10% e 16%. O meio utilizado foi o caldo YEPG acrescido de NaCl. Como controle positivo foi utilizado o meio sem NaCl. As cepas foram incubadas a 22-25°C por 21 dias, sendo a leitura realizada semanalmente pelo grau de turvação, de acordo com a escala de Wickerham (Barnett *et al.*, 2000).

3.2.3.7 Teste de tolerância à glicose 50%

Seguindo o teste de tolerância a soluções hipertônicas, foi testada a capacidade de a levedura crescer em meio com alta concentração de glicose (solução glicosilada hipertônica). O meio utilizado foi o caldo YEPG acrescido de glicose 50%. Como controle positivo foi utilizado meio com glicose 2%. A incubação foi por 21 dias a 22-25°C, sendo a leitura realizada semanalmente conforme o grau de turvação, de acordo com a escala de Wickerham (Barnett *et al.*, 2000).

3.2.3.8 Produção de compostos amilóides

Este teste tem como objetivo auxiliar na identificação de determinadas espécies, principalmente as do gênero *Cryptococcus*, que possuem por característica formar compostos polissacarídeos amilóides (Barnett *et al.*, 2000). Para avaliar esta característica, uma solução de lugol

(solução de iodo com iodeto de potássio 1:5) foi adicionada à placa de Petri com crescimento evidente da amostra em meio sólido contendo YNB e glicose. O resultado positivo foi observado pela coloração azulada da colônia, devido à reação do composto amilóide com a solução de iodo.

3.3 Taxonomia molecular de leveduras

3.3.1 Seqüenciamento do rDNA

As linhagens FI 50, FI 91, FI 113 e FI 87 foram seqüenciadas e analisadas por Jesus Ramos no Instituto do Câncer (INCA), RJ. A extração de DNA e amplificação da região D1/D2 do gene 26S rDNA das linhagens FI 50, FI 87, FI 91 e FI 113 foram realizadas conforme descrito em Ramos et al. (2001), utilizando os primers NL1-5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3' e NL4-5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3' (O'Donnell, 1993). Os produtos amplificados por PCR foram purificados usando o Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado (100 ng) foi utilizado para seqüenciamento com os primers NL e NL4, respectivamente, utilizando o DyEnamic ET Dye terminator Cycle sequencing Kit for MegaBASE (Pharmacia), seguindo o protocolo recomendado. A seqüência foi obtida utilizando o seqüenciador automático MegaBASE DNA Analysis System 1000 (Pharmacia). As seqüências de dados foram editadas usando SeqMan II expert sequence analysis software (SeqMan400, 1989-1999, DNASTAR Inc) e analisadas com o programa Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn), (Altschul *et al.*, 1997) disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

3.4 Verificação do potencial biotecnológico

3.4.1 Avaliação semiquantitativa do perfil enzimático

As cepas foram previamente cultivadas em ágar GYP (tabela 1 - Apêndices) e utilizadas na inoculação dos meios de triagem enzimática. O nível de produção da enzima nos meios sólidos foi avaliado pelo diâmetro do halo de reação ao redor da colônia, medido em centímetros. Para a enzima caseinase, um halo de degradação menor ou igual a 0,5 cm foi considerado como de fraca produção enzimática, um halo entre 0,5 e 0,9 cm foi considerado como produção positiva e um halo maior ou igual a 1 cm foi considerado como alta produção. Para a enzima amilase, um halo de degradação menor que 1,5 cm foi considerado como de fraca produção enzimática, já um halo entre 1,5 e 2,4 cm foi considerado como produção positiva, e um halo maior ou igual a 2,5 cm foi considerado como alta produção. Estes limites foram padronizados empiricamente, utilizando cepas previamente reconhecidas como boas produtoras, fracas produtoras e não produtoras de cada enzima analisada. Os resultados foram classificados como negativo (-), fraco (W), positivo (+) e alta produção (++)

3.4.1.1 Produção de celobiase e esterase

A capacidade de degradar celobiose e a atividade de esterase foi verificada pelo método réplica em placas. As cepas foram previamente inoculadas em água destilada por 24 h para exaurir suas reservas energéticas endógenas. Então, foram inoculadas nos respectivos meios, conforme Yarrow (1998). Após 7 dias de incubação a 25°C, a atividade enzimática foi mensurada

através da intensidade do crescimento colonial, sendo classificado como negativo (-), fraco (W), positivo (+) e ótimo (++), em comparação ao crescimento das mesmas cepas no controle negativo (sem celobiose ou Tween 20) e no controle positivo (com glicose). O crescimento em meio contendo o substrato enzimático como única fonte de carbono foi considerado evidência de que a levedura produzia a respectiva enzima.

3.4.1.2 Produção de amilase

Para verificação da produção de amilase, as leveduras foram incubadas por sete dias a 25°C em meio contendo amido solúvel, pH 6,0. (Strauss *et al.*, 2001; Buzzini & Martini, 2002). Após crescimento celular, a revelação foi feita com adição de lugol sobre o meio e visualização de formação de um halo amarelo ao redor do crescimento das cepas consideradas positivas. O restante do meio torna-se corado de azul escuro.

3.4.1.3 Produção de caseinase

A hidrólise da caseína foi testada através da inoculação das leveduras em placas de Petri contendo o meio ágar caseína, ajustado para pH 7,0 com KOH. (Strauss *et al.*, 2001; Braga *et al.*, 1998; Trindade *et al.*, 2002) A revelação foi realizada após sete dias de incubação a 25°C, com a adição de HCl 1N na superfície do meio e incubação por 1 hora. O resultado foi considerado positivo quando ao redor do inóculo houve a formação de um halo transparente circundado por um fundo com coloração esbranquiçada

correspondendo à área onde a caseína não tinha sido hidrolisada, sendo, portanto, desnaturada por ação do ácido clorídrico.

3.4.1.4 Produção de gelatinase

A hidrólise da gelatina também foi usada para testar a produção de protease. As leveduras foram inoculadas em meio malte-gelatina em tubos de ensaio (Abranches *et al.*, 1997; Yarrow, 1998; Trindade *et al.*, 2002) e incubadas durante 21 dias a 25°C. Após esse período, resfriaram-se os tubos cerca 2 horas a 4°C e, em seguida, foi avaliada a atividade enzimática através do grau de hidrólise do meio. Aqueles isolados que liquefizeram parcial ou completamente o meio de cultura após a retirada dos tubos da refrigeração foram considerados produtores de gelatinase.

3.5 Teste para detectar linhagens com fenótipo “killer”

A atividade micocinogênica (*killer*) foi testada de acordo com Abranches *et al.* (1997). As leveduras isoladas de figueiras foram testadas contra fungos patogênicos das espécies *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. A atividade “killer” foi testada em meio YM contendo 0,003% de azul de metileno, pH 4,2. A cepa patogênica foi diluída em água destilada estéril e semeada sobre a superfície do meio com auxílio de um suabe. As leveduras isoladas de folhas de figueiras foram inoculadas com alça de platina na superfície do meio contendo a cepa sensível previamente inoculada. As placas foram incubadas a 25°C por sete dias. As cepas foram consideradas como possuidoras de atividade “killer” quando houve um halo de inibição do

crescimento dos fungos patogênicos ao redor do crescimento das leveduras de figueiras.

3.6 Listagem de meios de cultura utilizados

Os meios de cultura utilizados estão listados na Tabela 1 (Apêndices).

3.7 Listagem dos equipamentos utilizados no laboratório

Os equipamentos utilizados nos experimentos estão listados na Tabela 2 (Apêndices).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e purificação dos isolados de figueiras

A técnica empregada para isolamento de leveduras e fungos semelhantes a leveduras a partir de figueiras resultou em 175 isolados, sendo que 174 foram obtidos a partir de filoplano e um de sicônio de figueiras. As amostras de sicônios foram obtidas apenas nas duas primeiras coletas porque este demonstrou não ser um bom substrato para o isolamento de leveduras. Os isolados obtidos foram purificados para posterior identificação e avaliação do potencial biotecnológico.

4.2 Identificação fenotípica dos isolados de figueiras

Dos 175 isolados obtidos, 125 representam leveduras verdadeiras e 50 fungos semelhantes a leveduras. As 125 linhagens de leveduras isoladas pertencem a 42 espécies, sendo 8 de afinidade ascomicética e 34 de afinidade basidiomicética. A listagem com a identificação presuntiva das linhagens de leveduras e fungos semelhantes a leveduras, assim como a espécie de figueira

de onde foram isoladas, pode ser vista na Tabela 1. Os fungos semelhantes a leveduras foram classificados segundo suas características macromorfológicas, sendo a maioria destes fungos pertencente às leveduras pretas ou “black-yeasts”. Não foi possível identificar 12 isolados, pois estes não cresceram de forma suficiente para a identificação. Sendo assim, foram denominados de “isolado não identificado”.

Os isolados identificados com o nome da espécie seguido pelo sufixo “-similar” significam que são muito semelhantes a uma determinada espécie, entretanto diferem da descrição da cepa tipo desta espécie. Algumas linhagens foram identificadas apenas em nível de gênero seguido pelo sufixo “sp”, significando que a identificação pelos métodos convencionais não foi possível. Os identificados com o nome da espécie seguidos por “?” significam que provavelmente são aquela espécie, mas necessitam de confirmação de alguns testes. Esses isolados podem representar possíveis biotipos ou espécies novas.

No presente trabalho, seis isolados de leveduras foram identificados dentro do gênero *Candida*. Conforme os resultados dos testes morfológicos e bioquímicos/fisiológicos, as cepas FI 11 e FI 24 foram classificadas como *Candida albicans*, porém não foram realizados testes específicos para a confirmação desta identificação. O isolamento de *C. albicans* a partir de folhas de figueiras não é um resultado esperado, já que essa levedura faz parte da microbiota normal de animais de sangue quente e é o principal agente etiológico de candidíase (Sullivan, 2004). Podem existir duas explicações possíveis para esse resultado: ou a identificação está incorreta, ou houve

contaminação das folhas por leveduras carreadas por algum animal que tenha entrado em contato com elas.

TABELA 1: Listagem das culturas isoladas, identificação presuntiva, substrato de origem e amostra correspondentes.

Linhasgens	Amostra	Isolado	Substrato
ASCOMICETOS			
<i>Candida albicans</i>	Am 04 21/04/05	FI 11	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 07 21/04/05	FI 24	<i>Ficus luschnathiana</i>
<i>Candida ernobii</i> – similar	Am 06 21/04/05	FI 36	<i>Ficus luschnathiana</i>
<i>Candida</i> sp 01	Am 05 12/01/06	FI 144	<i>Ficus cestripholia</i>
<i>Candida</i> sp 02	Am 06 12/01/06	FI 146	<i>Ficus cestripholia</i>
<i>Candida</i> sp 03	Am 08 12/01/06	FI 148	<i>Coussapoa microcarpa</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Am 04 29/07/05	FI 76	<i>Ficus cestripholia</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Am 09 29/07/05	FI 95	<i>Coussapoa microcarpa</i>
<i>Pichia pini</i> – similar	Am 10 22/09/05	FI 123	<i>Ficus cestripholia</i>
BASIDIOMICETOS			
<i>Bullera</i> sp nov.01	Am 10 21/04/05	FI 50	<i>Ficus cestripholia</i>
<i>Bullera</i> sp nov.01	Am 09 29/07/05	FI 91	<i>Coussapoa microcarpa</i>
<i>Bullera</i> sp nov.01	Am 08 22/09/05	FI 113	<i>Ficus cestripholia</i>
<i>Bullera</i> sp nov.02	Am 07 29/07/05	FI 87	<i>Ficus cestripholia</i>
<i>Bullera</i> sp nov.02	Am 04 29/07/05	FI 88	<i>Ficus cestripholia</i>
<i>Bullera kunmingensis</i>	Am 05 08/03/06	FI 170	<i>Ficus cestripholia</i>
<i>Cryptococcus</i> sp 1	Am 06 21/04/05	FI 16	<i>Ficus luschnathiana</i>
<i>Cryptococcus</i> sp 2	Am 02 29/07/05	FI 103	<i>Coussapoa microcarpa</i>
<i>Cryptococcus</i> sp 3	Am 08 08/03/06	FI 180	<i>Coussapoa microcarpa</i>
<i>Cryptococcus flavescens</i>	Am 01 29/07/05	FI 51	<i>Ficus cestripholia</i>
<i>Cryptococcus humicola</i> - similar	Am 03 21/04/05	FI 37	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 06 29/07/05	FI 81	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 05 29/07/05	FI 84	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 09 29/07/05	FI 94	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 01 22/09/05	FI 106	<i>Coussapoa microcarpa</i>
<i>Cryptococcus hungaricus</i>	Am 08 08/03/06	FI 181	<i>Coussapoa microcarpa</i>
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Am 06 21/04/05	FI 15	<i>Ficus luschnathiana</i>
"	Am 05 21/04/05	FI 17	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 04 21/04/05	FI 45	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 02 29/07/05	FI 53	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 06 29/07/05	FI 56	<i>Coussapoa microcarpa</i>

TABELA 1: Continuação - Listagem das culturas isoladas, identificação presuntiva, substrato de origem e amostra correspondentes.

<i>Linhagens</i>	<i>Amostra</i>	<i>Isolado</i>	<i>Substrato</i>
"	Am 03 29/07/05	FI 57	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 05 29/07/05	FI 63	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 09 29/07/05	FI 64	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 04 29/07/05	FI 71	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 07 29/07/05	FI 89	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 01 29/07/05	FI 101	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 03 17/11/05	FI 133	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 04 12/01/06	FI 143	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 03 08/03/06	FI 164	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 09 08/03/06	FI 184	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 05 08/03/06	FI 188	<i>Ficus cestripholia</i>
<i>Cryptococcus laurentii</i> – similar	Am 08 21/04/05	FI 28	<i>Ficus luschnathiana</i>
"	Am 03 29/07/05	FI 67	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 04 29/07/05	FI 69	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 07 29/07/05	FI 97	<i>Ficus cestripholia</i>
<i>Cryptococcus macerans</i> – similar	Am 08 22/09/05	FI 27	<i>Ficus cestripholia</i>
<i>Rhodotorula</i> sp 01	Am 01 21/04/05	FI 03	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 02 21/04/05	FI 08	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 03 21/04/05	FI 09	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 07 21/04/05	FI 21	<i>Ficus luschnathiana</i>
"	Am 08 21/04/05	FI 23	<i>Ficus luschnathiana</i>
"	Am 11 21/04/05	FI 34	<i>Ficus cestripholia</i> (fruto)
"	Am 09 21/04/05	FI 41	<i>Ficus luschnathiana</i>
"	Am 03 21/04/05	FI 44	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 04 21/04/05	FI 46	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 05 21/04/05	FI 49	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 01 29/07/05	FI 54	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 02 29/07/05	FI 61	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 06 29/07/05	FI 83	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 09 29/07/05	FI 98	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 08 29/07/05	FI 99	<i>Ficus cestripholia</i>
<i>Rhodotorula</i> sp 02	Am 07 21/04/05	FI 19	<i>Ficus luschnathiana</i>
<i>Rhodotorula</i> sp 03	Am 03 22/09/05	FI 119	<i>Ficus cestripholia</i>
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	Am 02 22/09/05	FI 118	<i>Ficus cestripholia</i>
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Am 01 21/04/05	FI 02	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 02 21/04/05	FI 05	<i>Coussapoa microcarpa</i>

TABELA 1: Continuação - Listagem das culturas isoladas, identificação presuntiva, substrato de origem e amostra correspondentes.

<i>Linhagens</i>	<i>Amostra</i>	<i>Isolado</i>	<i>Substrato</i>
"	Am 08 21/04/05	FI 20	<i>Ficus luschnathiana</i>
"	Am 09 21/04/05	FI 26	<i>Ficus luschnathiana</i>
"	Am 08 21/04/05	FI 29	<i>Ficus luschnathiana</i>
"	Am 09 21/04/05	FI 30	<i>Ficus luschnathiana</i>
"	Am 02 29/07/05	FI 60	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 03 29/07/05	FI 65	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 03 29/07/05	FI 66	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 04 29/07/05	FI 77	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 05 29/07/05	FI 79	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 07 29/07/05	FI 86	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 09 29/07/05	FI 93	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 05 29/07/05	FI 109	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 08 22/09/05	FI 114	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 03 22/09/05	FI 120	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 03 08/03/06	FI 163	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 06 08/03/06	FI 173	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 05 08/03/06	FI 187	<i>Ficus cestripholia</i>
<i>Rhodotorula glutinis ?</i>	Am 06 21/04/05	FI 14	<i>Ficus luschnathiana</i>
"	Am 07 21/04/05	FI 18	<i>Ficus luschnathiana</i>
"	Am 10 21/04/05	FI 32	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 04 21/04/05	FI 47	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 04 29/07/05	FI 70	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 05 29/07/05	FI 104	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 10 22/09/05	FI 124	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 05 22/09/05	FI 126	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 02 08/03/06	FI 159	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 04 08/03/06	FI 167	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 04 08/03/06	FI 168	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 10 08/03/06	FI 186	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 06 08/03/06	FI 190	<i>Coussapoa microcarpa</i>
<i>R. glutinis / R. aurantiaca</i>	Am 01 08/03/06	FI 191	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 01 21/04/05	FI 04	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 08 21/04/05	FI 25	<i>Ficus luschnathiana</i>
"	Am 09 22/09/05	FI 117	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 07 22/09/05	FI 121	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 08 12/01/06	FI 150	<i>Coussapoa microcarpa</i>

TABELA 1: Continuação - Listagem das culturas isoladas, identificação presuntiva, substrato de origem e amostra correspondentes.

<i>Linhagens</i>	<i>Amostra</i>	<i>Isolado</i>	<i>Substrato</i>
"	Am 10 12/01/06	FI 153	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 02 08/03/06	FI 157	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 02 08/03/06	FI 158	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 03 08/03/06	FI 162	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 09 08/03/06	FI 183	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 09 08/03/06	FI 189	<i>Coussapoa microcarpa</i>
<i>R. glutinis</i> / <i>R. aurantiaca</i> - similar	Am 01 08/03/06	FI 155	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 07 08/03/06	FI 176	<i>Coussapoa microcarpa</i>
<i>R. minuta</i>	Am 02 21/04/05	FI 06	<i>Coussapoa microcarpa</i>
<i>Sporobolomyces roseus</i> ?	Am 07 22/09/05	FI 128	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 01 12/01/06	FI 140	<i>Ficus cestripholia</i>
Isolado não identificado 01	Am 06 21/04/05	FI 12	<i>Ficus luschnathiana</i>
Isolado não identificado 02	Am 05 21/04/05	FI 13	<i>Ficus cestripholia</i>
Isolado não identificado 03	Am 10 21/04/05	FI 43	<i>Ficus cestripholia</i>
Isolado não identificado 04	Am 08 29/07/05	FI 68	<i>Ficus cestripholia</i>
Isolado não identificado 05	Am 04 29/07/05	FI 73	<i>Ficus cestripholia</i>
Isolado não identificado 06	Am 04 29/07/05	FI 74	<i>Ficus cestripholia</i>
Isolado não identificado 07	Am 05 29/07/05	FI 78	<i>Coussapoa microcarpa</i>
Isolado não identificado 08	Am 05 29/07/05	FI 80	<i>Coussapoa microcarpa</i>
Isolado não identificado 09	Am 06 29/07/05	FI 82	<i>Coussapoa microcarpa</i>
Isolado não identificado 10	Am 03 29/07/05	FI 96	<i>Ficus cestripholia</i>
Isolado não identificado 11	Am 03 22/09/05	FI 108	<i>Ficus cestripholia</i>
Isolado não identificado 12	Am 09 22/09/05	FI 130	<i>Ficus cestripholia</i>

FUNGOS SEMELHANTES A LEVEDURAS

<i>Aureobasidium</i> sp	Am 09 29/07/05	FI 92	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 07 29/07/05	FI 102	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 06 22/09/05	FI 111	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 09 22/09/05	FI 115	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 10 22/09/05	FI 116	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 04 22/09/05	FI 125	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 03 22/09/05	FI 134	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 01 17/11/05	FI 135	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 02 17/11/05	FI 136	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 04 17/11/05	FI 138	<i>Ficus cestripholia</i>

TABELA 1: Continuação - Listagem das culturas isoladas, identificação presuntiva, substrato de origem e amostra correspondentes.

<i>Linhagens</i>	<i>Amostra</i>	<i>Isolado</i>	<i>Substrato</i>
"	Am 10 17/11/05	FI 139	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 05 12/01/06	FI 145	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 01 08/03/06	FI 154	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 02 08/03/06	FI 156	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 03 08/03/06	FI 160	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 02 08/03/06	FI 165	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 04 08/03/06	FI 166	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 05 08/03/06	FI 169	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 05 08/03/06	FI 172	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 06 08/03/06	FI 175	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 07 08/03/06	FI 177	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 10 08/03/06	FI 178	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 08 08/03/06	FI 179	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 09 08/03/06	FI 185	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"Yeast-like" 01	Am 01 21/04/05	FI 01	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 03 21/04/05	FI 10	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 01 29/07/05	FI 55	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 02 29/07/05	FI 58	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 08 17/11/05	FI 137	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"Yeast-like" 02	Am 02 29/07/05	FI 59	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 06 29/07/05	FI 85	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 08 29/07/05	FI 90	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 05 22/09/05	FI 110	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 07 22/09/05	FI 129	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 04 12/01/06	FI 142	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 07 12/01/06	FI 147	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 08 12/01/06	FI 149	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 09 08/03/06	FI 182	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"Yeast-like" 03	Am 02 29/07/05	FI 62	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 04 29/07/05	FI 75	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 05 22/09/05	FI 127	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 10 12/01/06	FI 151	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 06 08/03/06	FI 174	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"Yeast-like" 04	Am 02 29/07/05	FI 100	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"Yeast-like" 05	Am 02 21/04/05	FI 07	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 06 22/09/05	FI 112	<i>Ficus cestripholia</i>

TABELA 1: Continuação - Listagem das culturas isoladas, identificação presuntiva, substrato de origem e amostra correspondentes.

<i>Linhagens</i>	<i>Amostra</i>	<i>Isolado</i>	<i>Substrato</i>
"Yeast-like" 06	Am 09 29/07/05	FI 105	<i>Coussapoa microcarpa</i>
"	Am 03 22/09/05	FI 107	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 10 22/09/05	FI 131	<i>Ficus cestripholia</i>
"	Am 06 08/03/06	FI 152	<i>Coussapoa microcarpa</i>

O isolado FI 36 foi identificado como *Candida ernobii* - similar, pois não fermentou glicose, foi positivo para assimilação de meso-eritritol e negativo para manitol, diferindo da cepa tipo nesses testes. Segundo Meyer *et al.* (1998), o gênero *Candida* é bastante heterogêneo, possuindo uma definição muito abrangente, e praticamente qualquer levedura ascomicética que não possua reprodução sexuada e que não preencha os critérios para ser classificada em outros gêneros é definida como *Candida*. Por esses motivos, os isolados FI 144, FI 146 e FI 148 foram identificados como *Candida* sp 01, 02 e 03, respectivamente.

Os isolados identificados como *Debaryomyces hansenii* (FI 76) e *Kluyveromyces lactis* (FI 95) diferiram da descrição das cepas tipo das respectivas espécies no teste para indução da produção de ascósporos, uma vez que deveriam ser positivos. Em um trabalho realizado por Ruinen (1963), a maioria das leveduras isoladas de filoplano não foi capaz de esporular e nem de fermentar. Isto está de acordo com o nosso trabalho, onde apenas três isolados (FI 11, FI 24 e FI 95) com afinidade ascomicética fermentaram a glicose.

O isolado identificado como *Pichia pini* - similar (FI 123) recebeu esta denominação por ser muito semelhante à cepa tipo, porém diferiu no teste

de assimilação de salicina, pois o resultado foi negativo, quando deveria ser positivo.

As culturas FI 50, FI 91, FI 113, FI 87, FI 88 e FI 170 não foram satisfatoriamente identificadas utilizando a chave de Barnett *et al.* (2000) e não apresentaram um perfil bioquímico/fisiológico semelhante a qualquer espécie já descrita. Com isso, algumas cepas foram encaminhadas para realização de testes moleculares. Após seqüenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA, todas as cepas foram classificadas no gênero *Bullera* (Fig. 1 e 2). Os isolados FI 50, FI 91 e FI 113 foram identificados como uma nova espécie e denominados de *Bullera* sp nov. 01. A cepa FI 87 foi classificada como uma segunda nova espécie, então denominada de *Bullera* sp nov. 02. E o isolado FI 170 foi identificado como *Bullera kunmingensis* por ter apresentado a seqüência da região D1/D2 do 26S rDNA idêntica à da cepa tipo desta espécie, acessada no GenBank. Não foi realizada análise molecular com o isolado FI 88, mas como os testes morfológicos, bioquímicos/fisiológicos são idênticos aos da cepa FI 87, este também foi denominado de *Bullera* sp nov. 02.

A maioria das leveduras isoladas de filoplano por Ruinen (1963) pertencem ao gênero *Cryptococcus*, seguido por *Rhodotorula*. No presente trabalho, dos 104 basidiomicetos identificados, 65 pertencem ao gênero *Rhodotorula* e 31 a *Cryptococcus*, ou seja, existe uma grande abundância, cerca de 90%, de leveduras destes dois gêneros associadas ao filoplano de figueiras, o que está de acordo com a literatura (Hislop & Cox, 1969; McBride & Hayes, 1977; Fokkema *et al.*, 1979; McCormack *et al.*, 1994). Segundo Fonseca & Inácio (2006), a tendência mostrada em vários estudos empregados

para o isolamento de leveduras é que as populações são comumente dominadas por poucas, mas abundantes espécies. Entre as espécies dominantes estão *C. laurentii*, *C. albidus* (menos abundante e não tão difundido como *C. laurentii*), *R. glutinis*, *R. minuta*, *R. mucilaginosa* e *Sporobolomyces roseus*, que parecem ser prevalentes independente do tipo de planta ou região geográfica da coleta.

As cepas FI 16, FI 103 e FI 180 foram identificadas como *Cryptococcus* sp 01, 02, e 03, respectivamente. Essa denominação foi feita porque não foi concluída nenhuma identificação de espécie plausível utilizando os métodos tradicionais de identificação de leveduras. A afinidade basidiomicética dos isolados foi comprovada pelos testes de produção de urease e reação ao DBB positivos. Semelhante ao que ocorre com leveduras ascomicéticas, que são identificadas como *Candida* sp por causa da heterogeneidade do gênero, no grupo de leveduras com afinidade basidiomicética, os isolados não classificados em outros gêneros são identificados como *Cryptococcus*.

O isolado FI 51 não apresentou um perfil bioquímico/fisiológico semelhante às espécies descritas por Barnett *et al.* (2000), devido a isso, a cepa foi encaminhada para seqüenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA. De acordo com a análise molecular, a levedura foi identificada como *Cryptococcus flavescens*.

Os isolados FI 37, FI 81, FI 84, FI 94 e FI 106 foram identificados como *Cryptococcus humicola* - similar, pois diferindo da descrição padrão desta espécie, FI 37, FI 81, FI 84 e FI 94 não assimilaram etilamina; FI 106 foi

positivo para assimilação de inulina; FI 94 foi negativo para assimilação de D-arabinose. Além disso, FI 94 e FI 84 não assimilaram D-ribose, mas como *C. humicola* tem crescimento lento nesta fonte de carbono, isto poderia explicar o resultado negativo.

De acordo com Middelhoven (1997) em estudo realizado nas ilhas Canárias, dentre as leveduras com afinidade basidiomicética isoladas de diversas plantas, as espécies mais comuns do gênero *Cryptococcus* foram *C. albidus* e *C. laurentii*. No presente trabalho, nenhum isolado de *C. albidus* foi obtido, mas *C. laurentii* foi a espécie predominante do gênero, com 20 isolados. As cepas FI 15, FI 17, FI 45, FI 53, FI 63, FI 64, FI 71, FI 89, FI 133, FI 143, FI 164, FI 184 e FI 188 foram negativas no teste de assimilação de citrato, diferindo da cepa tipo de *C. laurentii*. Isto pode ter ocorrido porque o meio de cultura utilizado não teve o pH corrigido, o que pode ter alterado o resultado final do teste. Os isolados FI 15, FI 28, FI 45, FI 89, FI 101 e FI 164 apresentaram resultado negativo para a assimilação de salicina, enquanto a cepa tipo assimila este nutriente. Como *C. laurentii* cresce de maneira lenta nesta fonte de carbono, os testes provavelmente são falso-negativos. As FI 28, FI 67, FI 69 e FI 97 foram identificadas como *C. laurentii* - similar devido às seguintes diferenças em relação à cepa tipo: FI 28 foi negativo para assimilação de salicina e citrato; FI 67 e FI 69 não assimilaram citrato e foram positivos na assimilação de lactose e FI 97 apresentou resultado negativo para os testes de assimilação de salicina e trealose. *C. laurentii* é considerado um complexo de espécies fenotipicamente semelhantes e tem sido reportado associado ao filoplano em diversas regiões do planeta, esta distribuição reflete

a habilidade de diferentes isolados crescerem em uma ampla variedade de temperatura.

O isolado identificado como *Cryptococcus macerans* - similar (FI 27) recebeu esta denominação por ser muito semelhante à cepa tipo, porém diferiu no teste de assimilação de maltose. Este teste teve resultado negativo, quando deveria ser positivo.

Alguns isolados não foram identificados mesmo depois da repetição de alguns testes, mas através das características apresentadas (urease e DBB positivos; lactose e eritritol negativos) foram agrupados no gênero *Rhodotorula*. Quinze cepas foram denominadas *Rhodotorula* sp 01 por apresentarem a cor da colônia creme ou creme rosada. Como a cepa FI 19 apresentou resultados semelhantes nos testes bioquímicos/ fisiológicos, mas coloração laranja, foi classificada como *Rhodotorula* sp 02. O mesmo ocorreu com o isolado FI 119, mas como este apresentou coloração vermelha foi chamado de *Rhodotorula* sp 03.

A cepa FI 118 não foi capaz de assimilar glucitol, mas mesmo assim foi identificada como *Rhodotorula aurantiaca*, pois a cepa tipo apresenta assimilação lenta de glucitol, o que pode ter influenciado no resultado falso-negativo.

Dezenove isolados foram identificados como *Rhodotorula glutinis* e treze como *Rhodotorula glutinis?*, por diferirem da cepa tipo e não terem os testes repetidos. As cepas FI 14, FI 18, FI 104, FI 159, FI 168, FI 186 e FI 190 diferiram na assimilação de trealose, pois foram negativas. Além disso, a cepa FI 18, igualmente à FI 70 foi positiva para a assimilação de melibiose, quando

deveria ser negativa. As cepas FI 32 e FI 47 diferiram da cepa tipo por assimilarem lactose, já as cepas FI 124 e FI 126 por assimilarem salicina. A cepa FI 26 foi positiva na assimilação de melibiose, e junto com a cepa FI 167 diferiu da descrição da cepa tipo de *R. glutinis*, que apresenta resultado negativo para este teste. Alguns autores reconhecem as dificuldades na identificação de leveduras apenas com base em características fenotípicas, pois certas espécies são bastante heterogêneas (Flannigan & Campbell, 1977; Azeredo *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos nos testes bioquímicos/fisiológicos com as cepas FI 04, FI 25, FI 117, FI 121, FI 150, FI 153, FI 157, FI 158, FI 162, FI 183, FI 189, e FI 191 não permitem diferenciar entre as espécies *R. aurantiaca* e *R. glutinis*, pois estas são fenotipicamente muito similares. Sendo assim, os isolados foram identificados como *Rhodotorula glutinis/Rhodotorula aurantiaca*. As cepas FI 155 e FI 176 foram classificadas como *R. glutinis/R. aurantiaca* - similar, pois assimilaram melibiose, e assim diferiram de ambas espécies.

O isolado FI 06, identificado como *Rhodotorula minuta*, diferiu da cepa tipo, pois foi negativo no teste de assimilação de ribitol, mas como *R. minuta* assimila ribitol de maneira lenta, este resultado é um provável falso-negativo.

Leveduras dos gêneros *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus* e *Bullera*, entre outros, são especialmente adaptados ao ambiente de filoplano devido à produção de balistosporos. Estes esporos são fortemente ejetados assegurando eficiência na dispersão, por isso estas leveduras são comuns em folhas (Nakase, 2000; Sampaio, 2004). No presente trabalho, o isolado FI 140

apresentou esta capacidade, esse resultado foi observado através da alta produção que a cepa apresentou, permitindo que fosse observada sua imagem especular, devido à ação da gravidade sobre os balistosporos, nas tampas das placas de Petri quando incubadas. Mas, como FI 140 diferiu da cepa tipo por assimilar melibiose foi identificado como *Sporobolomyces roseus* ?. O isolado FI 128, não produziu balistosporos e foi positivo para melibiose e lactose, diferindo da cepa tipo. Como estes testes não foram repetidos foi identificado como *Sporobolomyces roseus*?

Segundo Fonseca & Inácio (2006) alguns estudos foram realizados para avaliar as mudanças na composição de comunidades de leveduras de filoplano conforme as estações do ano. Estes relatam a predominância de leveduras pigmentadas dos gêneros *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* durante o verão. Foram considerados exclusivamente fatores ambientais, como: temperatura, umidade, duração do dia e intensidade da luz solar. Estas leveduras mostraram-se melhores adaptadas ao verão. Ao contrário, espécies do gênero *Cryptococcus* foram dominantes durante os meses mais úmidos e frios (primavera, final do outono e inverno). No presente trabalho, *Sporidiobolus pararoseus* (FI 140) foi isolado durante o verão e *Sporobolomyces roseus*? (FI 128) foi isolado na primavera, o que está de acordo com Fonseca & Inácio (2006), porém, as espécies do gênero *Rhodotorula* foram isoladas durante todas as estações do ano, e com maior abundância nos meses mais frios.

As cepas FI 12, FI 13, FI 43, FI 68, FI 73, FI 74, FI 78, FI 80, FI 82, FI 96, FI 108 e FI 130 não puderam ser identificadas através da metodologia convencional e por isso foram denominadas como “isolado não identificado”.

No futuro serão utilizadas técnicas moleculares para a realização da identificação destes isolados.

Fungos semelhantes a leveduras são microrganismos muito complexos, a identificação deles é feita com base, principalmente, na morfologia e somente um especialista pode concluir uma identificação até o nível de espécie. Com isso, apesar de vários testes morfológicos e bioquímicos /fisiológicos terem sido realizados no presente trabalho, os fungos semelhantes a leveduras foram apenas classificados em diferentes grupos ou até o nível de gênero. Os fungos semelhantes a leveduras do gênero *Aureobasidium* apresentam colônias de diferentes colorações que ao longo da conservação em laboratório tornam-se pretas. Vinte e quatro isolados foram obtidos com estas características e por isso foram classificados como *Aureobasidium* sp. Segundo Last & Price (1969) *Aureobasidium pulullans* raramente é encontrado associado ao filoplano durante o inverno e primavera, mas no verão sua população aumenta bastante. No presente trabalho, 7 cepas de *Aureobasidium* sp foram isoladas entre os meses de julho e setembro; 4 em novembro e 13 entre os meses de janeiro e março. Isto reforça que cepas de *Aureobasidium* sp são mais adaptadas a ambientes com temperaturas mais elevadas e que algumas destas cepas podem ser da espécie *Aureobasidium pulullans*. Este é o fungo semelhante a levedura mais encontrado no filoplano de diferentes plantas (Breeze & Dix, 1981; de Jager *et al.*, 2001; Andrews *et al.*, 2002; Prasongsuk *et al.*, 2005).

Não foi possível distinguir as remanescentes linhagens de fungos semelhantes a leveduras até o nível de gênero. Portanto, estes isolados apenas foram agrupados segundo características macromorfológicas e classificados em seis grupos: “yeast-like” 01 (colônias de cor branca); “yeast-like” 02 (colônias de cor creme e consistência seca); “yeast-like” 03 (colônias de cor creme e consistência membranosa); “yeast-like” 04 (colônias de cor creme e consistência esfarelada); “yeast-like” 5“ (colônias de cor marrom) e “yeast-like” 6 (colônias de cor creme rosado e consistência cremosa).

Comparando as leveduras isoladas de figueiras com as isoladas de bromélias no Parque de Itapuã por Landell *et al.* (2006) pode-se observar várias diferenças quanto a população presente em cada filoplano. Dentre os isolados de bromélia, com afinidade basidiomicética, foram identificadas leveduras dos gêneros *Bullera*, *Bulleromyces*, *Cryptococcus*, *Fellomyces*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* e *Sporobolomyces*. As leveduras isoladas de figueiras não possuem representantes dos gêneros *Bulleromyces* e *Fellomyces*. Além disso, a diversidade dentro de cada gênero é maior em bromélias. No grupo dos ascomicetos foram identificadas leveduras, isoladas de bromélias, dos gêneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Dipodascus*, *Metschnikowia* e *Zygosacharomyces*. Estes três últimos gêneros não foram isolados de figueiras. Por outro lado, cepas de *Kluyveromyces lactis* e *Pichia pini* - similar isoladas de figueiras, não foram isoladas de bromélias. Estas diferenças na identificação das leveduras confrontam outros trabalhos. Segundo di Menna (1959), a população do filoplano varia conforme a estação do ano, mas não com o local ou planta. Associações de

determinadas espécies de leveduras com plantas específicas parecem ser raras (Andrews, 1991). Entretanto, *Farysizyma itapuensis* foi isolada do filoplano de diferentes bromélias e em vários locais do Parque de Itapuã (Inácio *et al.*, 2008), mas ela não foi isolada do filoplano de figueiras. Em outro trabalho, foi encontrado um número significativo de uma nova espécie de *Cryptococcus* com colônias laranja isolado de folhas de arbusto de *Cistus albidus*, mas não foi obtido nenhum isolado em outras quatro espécies da planta no mesmo local por dois anos consecutivos (Inácio *et al.*, 2002; Inácio, 2003). Com isso, torna-se claro que outros trabalhos são necessários para o real conhecimento a respeito das leveduras presentes no filoplano de diversas plantas.

4.2.1 Testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos

Os resultados dos testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos necessários para a identificação dos isolados podem ser vistos nas tabelas 3 e 4 (Apêndices).

4.3 Taxonomia molecular de leveduras

4.3.1 Sequenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA

A seqüência consenso dos isolados FI 50, FI 91 e FI 113 pode ser vista na Figura 1. Esses isolados pertencem a uma nova espécie de levedura (*Bullera* sp nov.1), próxima filogeneticamente à *Bullera arundinariae*.

O isolado FI 87 também é uma nova espécie do gênero *Bullera*, porém com 19 nucleotídeos de diferença em relação às *Bullera* sp nov. 1, por isso aqui denominado de *Bullera* sp nov. 2. A seqüência da cepa FI 87 pode ser observada na Figura 2.

5'AAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGCGAACCG
GGAAGAGCTCAAATTTAAAATCTGGCGTCCTTTGGGCGTCCGAGTTGTAAT
CTATAGAGGCGTTTTCTGTGCTGGACCGTGTCCAAGTTCCTTGGAACAGG
ATATCAAAGAGGGTGACAATCCCGTATTTGACACGACGACCAGTGCTCTGT
GATACGCTCTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGT
GGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAG
TACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGTAT
GTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGATTGAAGTCAGTCGTGTCTTGAGGGGTT
CACTTGTTTTCTAGCAAGGTATTCCCCTCTTGATGGGTCAACATCAGTTAG
ATTCGGTGGATAAGAGCGGGAAGAACGTAGCTCCCTCGGGAGTGTTATAG
CTTTCTGTTGCATACACTGGACTTGACTGAGGAACGCAGCTCGCCGTAAG
GCTTGGTCTTGACCAAATACGAGCTTAGGATGTTGGCATAATGGC 3'

Figura 1: Seqüência consenso da região D1/D2 do 26S rDNA dos isolados FI 50, FI 91 e FI 113 (*Bullera* sp nov. 1).

```

Query 42  CGGGAAGAGCTCAAATTTAAAATCTGGCGTCCTTTGGGCGTCCGAGTTGTAATCTATAGA 101
          |||
Sbjct 1   CGGGAAGAGCTCAAATTTAAAATCTGGCGTTCCTTTGAGCGTCCGAGTTGTAATCTATAGA 60

Query 102 GCGGTTTTCTGTGCTGGACCGTGTCCAAGTTCCTTGAACAGGATATCAAAGAGGGTGAC 161
          |||
Sbjct 61  GCGGTTTTCTGTGCTGGACCGTGTCCAAGTTCCTTGAACAGGATATCAAAGAGGGTGAC 120

Query 162  AATCCCGTATTTGACACGACGACCAGTGCTCTGTGATACGCTCTCGACGAGTCGAGTTGT 221
          |||
Sbjct 121 AATCCCGTATTTGACACGACTACCAGTGCTCTGTGATACGCTCTCGACGAGTCGAGTTGT 180

Query 222  TTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGA 281
          |||
Sbjct 181  TTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGA 240

Query 282  CCGATAGCGAACCAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAAC 341
          |||
Sbjct 241  CCGATAGCGAACCAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAAC 300

Query 342  AGTATGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAACGATTGAAGTCAGTCGTCTTGAGGGGTTCACT 401
          |||
Sbjct 301  AGTATGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAACGATTGAAGTCAGTCATGTCTCGAGGGGTTCACT 360

Query 402  TGTTTTCTAGCAAGGTATTCCCCTCTTGATGGGTCAACATCAGTTAGATTCCGGTGGATAA 461
          |||
Sbjct 361  TGTCT-CTGGCAAGGTATTCCCCTCTTGATGGGTCAACATCAGTTAGATTCCGGTGGATAA 419

Query 462  GAGC-GGGAAGAACGTAGCTCCCTCGGGAGTGTATAGCTTTCTGTTGCATACACTGGAC 520
          |||
Sbjct 420  GAGCAGGGA-GAATGTAGCTCCCCGGGAGTGTATAGCTTTCTGTTGCATACACTGGAC 478

Query 521  TTGACTGAGGAACGCAGCTCGCCGTAAGGCTTGGTCTT-GACCAAATACG 569
          |||
Sbjct 479  TTGACTGAGGACCGCAGCTCGCCGTAAGGCTTGG-CTTTGGCCAAATACG 527

```

Figura 2: Alinhamento da região D1/D2 da sequência consenso das leveduras F113, F150 e F191 e *Bullera arundinariae* TISTR 5798 (AF547661.1).

5'TACGGCGAGCGAACGGGAAGAGCTCAAATTTAAAATCTGGCGT
TCTTTGAGCCGTCCGAGTTGTAATCTATAGAGGCGTTTTCTGTGCTGGACC
GTGTCCAAGTTCCTTGGAACAGGATATCAAAGAGGGTGACAATCCCGTATT
TGACACGACAACCAGTGCTTTGTGATACGCTCTCGACGAGTCGAGTTGTTT
GGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTGGC
GAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTT
GAAAAGAGAGTGAAACAGTATGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGATTGAAG
TCAGTCGTGTCTTGAGGGGTTCACTCGTCTTCTGGCGGGGTATTCCCTTCT
TGATGGGTCAACATCAGTTAAATCCGGTGGATAAGAGCAGTAAGAATGTAG
CTCCCCCGGGAGTGTTATAGCTAACTGTTGCATACACTGGGCTTGACTGA
GGACCGCAGCTCGCCGTAAG3'

Figura 3: Seqüência da região D1/D2 do 26S rDNA da cepa FI 87 (*Bullera* sp nov. 2).

```

Query 15  CGGGAAGAGCTCAAATTTAAAATCTGGCGTTCCTTTGAGCCGTCCGAGTTGTAATCTATAG 74
          |||
Sbjct 1   CGGGAAGAGCTCAAATTTAAAATCTGGCGTTCCTTTGAG-CGTCCGAGTTGTAATCTATAG 59

Query 75  AGGCGTTTTCTGTGCTGGACCGTGTCCAAGTTCCTTGAACAGGATATCAAAGAGGGTGA 134
          |||
Sbjct 60  AGGCGTTTTCTGTGCTGGACCGTGTCCAAGTTCCTTGAACAGGATATCAAAGAGGGTGA 119

Query 135 CAATCCCGTATTTGACACGACAACCAGTGCCTTTGTGATACGCTCTCGACGAGTCGAGTTG 194
          |||
Sbjct 120 CAATCCCGTATTTGACACGACTACCAGTGCCTCTGTGATACGCTCTCGACGAGTCGAGTTG 179

Query 195  TTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAAT-CCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAG 253
          |||
Sbjct 180  TTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAG 239

Query 254  ACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAA 313
          |||
Sbjct 240  ACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAA 299

Query 314  CAGTATGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGATTGAAGTCAGTCGTCTTGAGGGGTTTAC 373
          |||
Sbjct 300  CAGTATGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGATTGAAGTCAGTCATGTCTCGAGGGGTTTAC 359

Query 374  TCGTCTTCTGGCGGGGTATTCCTTCTTTGATGGGTCAACATCAGTTAAATCCGGTGGATA 433
          |||
Sbjct 360  TTGTCT-CTGGCAAGGTATTCCTTCTTTGATGGGTCAACATCAGTTAGATTCCGGTGGATA 418

Query 434  AGAGCAGTAAGAATGTAGCTCCCCGGGAGTGTATAGCTAACTGTTGCATACACTGGGC 493
          |||
Sbjct 419  AGAGCAGGGAGAATGTAGCTCCCCGGGAGTGTATAGCTTTCGTGTTGCATACACTGGAC 478

Query 494  TTGACTGAGGACCGCAGCTCGCCGTAAG 521
          |||
Sbjct 479  TTGACTGAGGACCGCAGCTCGCCGTAAG 506

```

Figura 4: Alinhamento entre as seqüências da região D1/D2 das leveduras FI87 e *Bullera arundinariae* TISTR 5798 (AF547661.1).

```

Query 29  ACGGCGAGCGAACCGGGAAGAGCTCAAATTTAAAATCTGGCGTCCTTTGGGC-GTCCGAG 87
          |||
Sbjct  2  ACGGCGAGCGAAC-GGGAAGAGCTCAAATTTAAAATCTGGCGTTCCTTTGAGCCGTCGAG 60

Query 88  TTGTAATCTATAGAGGCGTTTTCTGTGCTGGACCGTGTCCAAGTTCCTTGGAACAGGATA 147
          |||
Sbjct 61  TTGTAATCTATAGAGGCGTTTTCTGTGCTGGACCGTGTCCAAGTTCCTTGGAACAGGATA 120

Query 148 TCAAAGAGGGTGACAATCCCCTATTTGACACGACGACCAGTGTCTGTGATACGCTCTCG 207
          |||
Sbjct 121 TCAAAGAGGGTGACAATCCCCTATTTGACACGACAACCAGTGTCTTGTGATACGCTCTCG 180

Query 208  ACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAA 267
          |||
Sbjct 181  ACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAAT-CCATCTAAAGCTAA 239

Query 268  ATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGA 327
          |||
Sbjct 240  ATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGA 299

Query 328  AAAGAGAGTGAAACAGTATGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGATTGAAGTCAGTCGTGTC 387
          |||
Sbjct 300  AAAGAGAGTGAAACAGTATGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGATTGAAGTCAGTCGTGTC 359

Query 388  TTGAGGGGTTCACTTGTCTTTCTAGCAAGGTATTCCCTCTTGATGGGTCAACATCAGTTA 447
          |||
Sbjct 360  TTGAGGGGTTCACTCGTCTTCTGGCGGGGTATTCCCTTCTTGATGGGTCAACATCAGTTA 419

Query 448  GATTCGGTGGATAAGAGCGGGAAGAACGTAGCTCCCTCGGGAGTGTATAGCTTTCTGTT 507
          |||
Sbjct 420  AATCCGGTGGATAAGAGCAGTAAGAATGTAGCTCCCCGGGAGTGTATAGCTAACTGTT 479

Query 508  GCATACACTGGACTTGACTGAGGAACGCAGCTCGCCGTAAG 548
          |||
Sbjct 480  GCATACACTGGGCTTGACTGAGGACCGCAGCTCGCCGTAAG 520

```

Figura 5: Alinhamento entre as seqüências da região D1/D2 consenso entre as leveduras FI113, FI50 e FI91 e a levedura FI87.

4.4 Freqüência das espécies isoladas segundo as plantas amostradas.

As leveduras e fungos semelhantes a leveduras foram isoladas de três espécies de figueiras nativas do RS no Parque de Itapuã. A freqüência das espécies isoladas segundo as plantas amostradas pode ser vista na Tabela 2. A figueira com maior número de amostragens realizadas foi *Ficus cestripholia*, com 38 amostras. Destas, foram obtidos 92 isolados de leveduras e fungos semelhantes a leveduras, sendo um isolado de sicônio. Foram processadas 21 amostras de folhas de *Coussapoa microcarpa*, resultando em 66 isolados. De quatro amostras de *Ficus luschnathiana* foram isolados 17 cepas de leveduras e nenhum fungo semelhante a levedura. Isto pode ser explicado devido à amostragem desta planta ter sido realizada somente na primeira coleta, em 21/04/05, mês com temperaturas elevadas, período onde fungos semelhantes a leveduras não são abundantes em diversas plantas. Os gêneros de leveduras predominantes isolados do filoplano de figueira, *Rhodotorula* e *Cryptococcus*, foram isolados das três espécies de figueiras coletadas, demonstrando não serem específicos a nenhuma espécie. Assim como a espécie nova: *Bullera* sp nov. 01, isolada tanto de *C. microcarpa*, quanto de *Ficus cestripholia*. Já *Bullera* sp nov. 02 foi isolada somente a partir de folhas de *F. cestripholia*, mas como a amostragem foi pequena, não pode ser afirmado que esta levedura seja específica para esta planta.

TABELA 2: Freqüência das espécies de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados segundo as plantas amostradas.

Espécie	<i>Coussapoa microcarpa</i> (N =21)	<i>Ficus cestripholia</i> (N =38)*	<i>Ficus luschnathiana</i> (N =4)
ASCOMICETOS			
<i>Candida albicans</i>		1	1
<i>Candida ernobii</i> – similar			1
<i>Candida</i> sp. 01		1	
<i>Candida</i> sp. 02		1	
<i>Candida</i> sp. 03	1		
<i>Debaryomyces hansenii</i>		1	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	1		
<i>Pichia pini</i> – similar		1	
BASIDIOMICETOS			
<i>Bullera</i> sp nov.01	1	2	
<i>Bullera</i> sp nov.02		2	
<i>Bullera kunmingensis</i>		1	
<i>Cryptococcus</i> sp 01			1
<i>Cryptococcus</i> sp 02	1		
<i>Cryptococcus</i> sp 03	1		
<i>C. flavescens</i>		1	
<i>C. humicola</i> - similar	4	1	
<i>C. hungaricus</i>	1		
<i>C. laurentii</i>	7	8	1
<i>C. laurentii</i> – similar		3	1
<i>C. macerans</i> – similar		1	
<i>Rhodotorula</i> sp 01	4	8**	3
<i>Rhodotorula</i> sp 02			1
<i>Rhodotorula</i> sp 03		1	
<i>R. aurantiaca</i>		1	
<i>R. glutinis</i>	9	17	6
<i>R.glutinis</i> / <i>R. aurantiaca</i>	6	5	1
<i>R.glutinis</i> / <i>R. aurantiaca</i> - similar	2		
<i>R. minuta</i>	1		
<i>Sporobolomyces roseus</i> ?		2	

TABELA 2 - Continuação: Frequência das espécies de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados segundo as plantas amostradas.

<i>Espécie</i>	<i>Coussapoa microcarpa</i> (N =21)	<i>Ficus cestripholia</i> (N =38)*	<i>Ficus luschnathiana</i> (N =4) 1
Isolado não identificado 01			1
Isolado não identificado 02		1	
Isolado não identificado 03		1	
Isolado não identificado 04		1	
Isolado não identificado 05		1	
Isolado não identificado 06		1	
Isolado não identificado 07	1		
Isolado não identificado 08	1		
Isolado não identificado 09	1		
Isolado não identificado 10		1	
Isolado não identificado 11		1	
Isolado não identificado 12		1	
FUNGOS SEMELHANTES			
A LEVEDURAS			
<i>Aureobasidium</i> sp	9	15	
"Yeast-like" 01	3	2	
"Yeast-like" 02	5	4	
"Yeast-like" 03	3	2	
"Yeast-like" 04	1		
"Yeast-like" 05	1	1	
"Yeast-like" 06	2	2	
Total de isolados	66	92	17

N = número de amostras coletadas

* = 3 amostras de sicônios

** = 1 isolado de sicônio

4.5 Potencial Biotecnológico

4.5.1 Avaliação semiquantitativa do perfil enzimático

Foram testadas 175 cepas de leveduras isoladas de figueiras quanto à produção das enzimas celobiase, amilase, caseinase, gelatinase e esterase. O perfil enzimático das leveduras e fungos semelhantes a leveduras está apresentado na Tabela 3 e na Figura 3. As cepas de figueiras obtiveram um grande número de resultados positivos (+) ou de alta produção (++).

Das 126 cepas testadas para produção de celobiase, 74,8% produziram a enzima. Os basidiomicetos apresentaram-se como melhores produtores (77,7%), sendo que 74,1% apresentaram boa (+) ou alta produção (++) . Os ascomicetos apresentaram 55,5% de isolados positivos, com 44,4% bons produtores (+) ou com alta produção (++) . Aproximadamente 72% dos fungos semelhantes a leveduras tiveram resultado positivo, com 65,5% apresentando boa (+) ou alta produção (++) . Cerca de 80% dos isolados de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis* obtidos por Fuentefria & Valente (2005) foram produtores de celobiase. Os isolados de filoplano de bromélias do Parque de Itapuã apresentaram 58% de isolados positivos na produção da enzima (Landell *et al.*, 2005). Aparentemente a produção de celobiase é comum em isolados de filoplano, o que é esperado, pois a celobiose é um componente da parede celular de plantas (Lynd *et al.*, 2002).

Dos 175 isolados testados para a produção de amilase, 29,1% foram capazes de produzir a enzima. Nenhuma levedura com afinidade ascomicética apresentou resultado positivo. Entre os basidiomicetos 22,4% foram positivos, sendo 8,6% bons (+) ou fortes produtores (++) .

TABELA 3: Perfil enzimático de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de figueiras no Parque de Itapuã, Brasil.

Isolados	Nº- isolado	Celobiase	Amilase	Caseinase	Gelatinase	Esterase
Ascomycetos						
<i>Candida albicans</i>	FI 11	-	-	+	-	+
"	FI 24	-	-	w	-	+
<i>Candida ernobii</i> – similar	FI 36	-	-	+	-	+
<i>Candida</i> sp 01	FI 144	++	-	w	-	++
<i>Candida</i> sp 02	FI 146	+	-	+	-	++
<i>Candida</i> sp 03	FI 148	++	-	++	-	+
<i>Debaryomyces hansenii</i>	FI 76	-	-	+	-	++
<i>Kluyveromyces lactis</i>	FI 95	w	-	-	-	+
<i>Pichia pini</i> – similar	FI 123	+	-	-	-	-
Basidiomicetos						
<i>Bullera</i> sp nov.01	FI 50	++	+	-	-	-
<i>Bullera</i> sp nov.01	FI 91	+	w	-	-	-
<i>Bullera</i> sp nov.01	FI 113	NR	w	-	-	-
<i>Bullera</i> sp nov.02	FI 87	++	+	-	-	-
<i>Bullera</i> sp nov.02	FI 88	++	+	-	-	-
<i>Bullera kunmingensis</i>	FI 170	NR	-	-	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp 01	FI 16	+	-	-	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp 02	FI 103	++	-	-	-	w
<i>Cryptococcus</i> sp 03	FI 180	NR	-	-	-	w
<i>Cryptococcus flavescens</i>	FI 51	++	-	+	-	++
<i>Cryptococcus humicola</i> - similar	FI 37	+	-	-	-	+
"	FI 81	++	-	-	-	w
"	FI 84	+	-	-	-	w
"	FI 94	+	w	-	-	-
"	FI 106	+	-	-	-	w
<i>Cryptococcus hungaricus</i>	FI 181	++	-	-	-	+
<i>Cryptococcus laurentii</i>	FI 15	++	-	-	-	+
"	FI 17	++	-	++	-	++
"	FI 45	+	w	-	-	-
"	FI 53	++	-	-	-	++
"	FI 56	++	-	-	-	+
"	FI 57	++	-	-	-	++

TABELA 3: Continuação - Perfil enzimático de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de figueiras no Parque de Itapuã, Brasil.

"	FI 63	++	-	+	-	++
"	FI 64	+	-	-	-	+
"	FI 71	++	-	++	-	++
"	FI 89	+	-	-	-	+
"	FI 101	+	-	-	-	W
"	FI 133	++	-	W	-	++
"	FI 143	++	-	++	-	++
"	FI 164	NR	-	++	-	+
"	FI 184	NR	-	+	-	+
"	FI 188	++	-	++	-	+
<i>Cryptococcus laurentii</i> – similar	FI 28	+	W	+	-	-
"	FI 67	+	+	-	-	+
"	FI 69	+	-	-	-	++
"	FI 97	++	-	-	-	+
<i>Cryptococcus macerans</i> – similar	FI 27	+	-	++	++	++
<i>Rhodotorula</i> sp 01	FI 03	NR	-	+	-	+
"	FI 08	-	-	+	-	+
"	FI 09	-	-	+	-	+
"	FI 21	-	-	+	-	++
"	FI 23	-	++	++	-	W
"	FI 34	-	-	W	-	+
"	FI 41	NR	-	-	-	++
"	FI 44	W	-	-	-	+
"	FI 46	+	W	+	-	+
"	FI 49	-	-	-	-	+
"	FI 54	-	-	+	-	+
"	FI 61	+	-	-	-	++
"	FI 83	-	-	-	-	+
"	FI 98	+	-	-	-	-
"	FI 99	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp 02	FI 19	+	-	++	-	+
<i>Rhodotorula</i> sp 03	FI 119	+	-	-	-	-
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	FI 118	W	-	-	-	+
<i>Rhodotorula glutinis</i>	FI 02	+	-	-	-	-
"	FI 05	+	W	-	-	++
"	FI 14	+	W	-	-	++
"	FI 18	NR	-	-	-	-
"	FI 20	+	W	-	-	++
"	FI 26	-	-	-	-	-
"	FI 29	W	-	-	-	+
"	FI 30	-	-	-	-	+

TABELA 3: Continuação - Perfil enzimático de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de figueiras no Parque de Itapuã, Brasil.

"	FI 32	+	-	-	-	-
"	FI 47	+	-	-	-	-
"	FI 60	+	-	-	-	+
"	FI 65	+	w	-	-	++
"	FI 66	-	-	-	-	++
"	FI 70	-	w	-	-	++
"	FI 77	++	-	-	-	++
"	FI 79	NR	-	-	-	w
"	FI 86	-	-	-	-	+
"	FI 93	-	-	-	-	+
"	FI 104	NR	-	-	-	++
"	FI 109	NR	-	-	-	+
"	FI 114	NR	-	-	-	w
"	FI 120	NR	-	-	-	w
"	FI 124	NR	w	++	-	-
"	FI 126	++	-	-	-	-
"	FI 159	NR	-	+	-	+
"	FI 163	NR	++	++	++	+
"	FI 167	+	-	-	-	+
"	FI 168	-	-	+	-	+
"	FI 173	NR	-	-	-	++
"	FI 186	NR	-	+	-	w
"	FI 187	NR	-	-	-	-
"	FI 190	-	-	++	-	w
<i>R.glutinis / R. aurantiaca</i>	FI 191	NR	-	++	-	+
"	FI 04	-	-	+	-	+
"	FI 25	+	w	-	-	w
"	FI 117	+	w	-	-	-
"	FI 121	+	-	+	+	-
"	FI 150	NR	-	-	-	++
"	FI 153	-	-	+	-	+
"	FI 157	NR	w	+	-	+
"	FI 158	+	-	-	-	w
"	FI 162	+	-	-	-	+
"	FI 183	+	-	-	-	+
"	FI 189	-	-	-	-	-
<i>R.glutinis / R. aurantiaca - similar</i>	FI 155	+	-	-	-	+
"	FI 176	+	-	-	-	+
<i>R. minuta</i>	FI 06	+	-	-	-	+
<i>Sporobolomyces roseus ?</i>	FI 128	++	-	-	-	++
<i>Sporobolomyces roseus ?</i>	FI 140	NR	-	++	++	+

TABELA 3: Continuação - Perfil enzimático de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de figueiras no Parque de Itapuã, Brasil.

Isolado não identificado	FI 12	+	-	-	-	+
"	FI 13	+	-	-	-	+
"	FI 43	++	-	+	-	++
"	FI 68	NR	-	-	-	-
"	FI 73	++	+	w	-	-
"	FI 74	++	w	-	-	++
"	FI 78	+	+	-	-	-
"	FI 80	+	+	-	-	-
"	FI 82	++	+	-	-	-
"	FI 96	NR	-	-	-	NR
"	FI 108	NR	-	++	-	++
"	FI 130	NR	-	-	-	+
Fungos semelhantes a leveduras						
<i>Aureobasidium</i> sp	FI 92	++	+	w	-	+
"	FI 102	++	+	w	-	+
"	FI 111	NR	-	-	-	+
"	FI 115	NR	w	++	++	+
"	FI 116	++	w	++	-	++
"	FI 125	+	+	++	+	++
"	FI 134	-	+	++	-	++
"	FI 135	-	w	w	-	++
"	FI 136	+	+	w	-	+
"	FI 138	NR	w	++	++	NR
"	FI 139	++	w	++	++	+
"	FI 145	++	-	-	-	++
"	FI 154	NR	-	-	-	NR
"	FI 156	NR	w	++	+	+
"	FI 160	NR	w	++	-	+
"	FI 165	NR	w	+	-	+
"	FI 166	NR	-	w	-	+
"	FI 169	NR	-	-	-	++
"	FI 172	NR	w	+	-	NR
"	FI 175	NR	-	-	-	NR
"	FI 177	NR	++	-	-	+
"	FI 178	NR	-	++	-	w
"	FI 179	NR	++	-	-	+
"	FI 185	NR	w	-	-	w
"Yeast-like" 01	FI 01	+	+	++	-	-
"	FI 10	++	+	++	-	+
"	FI 55	++	w	++	+	++

TABELA 3: Continuação - Perfil enzimático de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de figueiras no Parque de Itapuã, Brasil.

	"	FI 58	++	-	++	-	++
	"	FI 137	-	-	++	-	++
"Yeast-like" 02		FI 59	++	-	++	++	++
	"	FI 85	+	-	++	-	+
	"	FI 90	++	w	++	-	+
	"	FI 110	NR	-	w	-	+
	"	FI 129	NR	-	-	-	NR
	"	FI 142	NR	-	++	++	++
	"	FI 147	+	-	++	++	++
	"	FI 149	w	-	++	-	w
	"	FI 182	NR	-	+	-	++
"Yeast-like" 03		FI 62	+	-	-	-	++
	"	FI 75	-	-	++	-	+
	"	FI 127	-	-	+	-	w
	"	FI 151	-	-	+	-	++
	"	FI 174	NR	w	++	+	NR
"Yeast-like" 04		FI 100	w	-	++	-	+
"Yeast-like" 05		FI 07	-	-	+	-	+
	"	FI 112	++	w	+	-	+
"Yeast-like" 06		FI 105	NR	-	-	-	+
	"	FI 107	++	w	++	++	++
	"	FI 131	-	w	++	++	++
	"	FI 152	+	-	++	+	++

(++) alta produção; (+) resultado positivo; (W) fraca produção; (-) resultado negativo; (NR) teste não realizado.

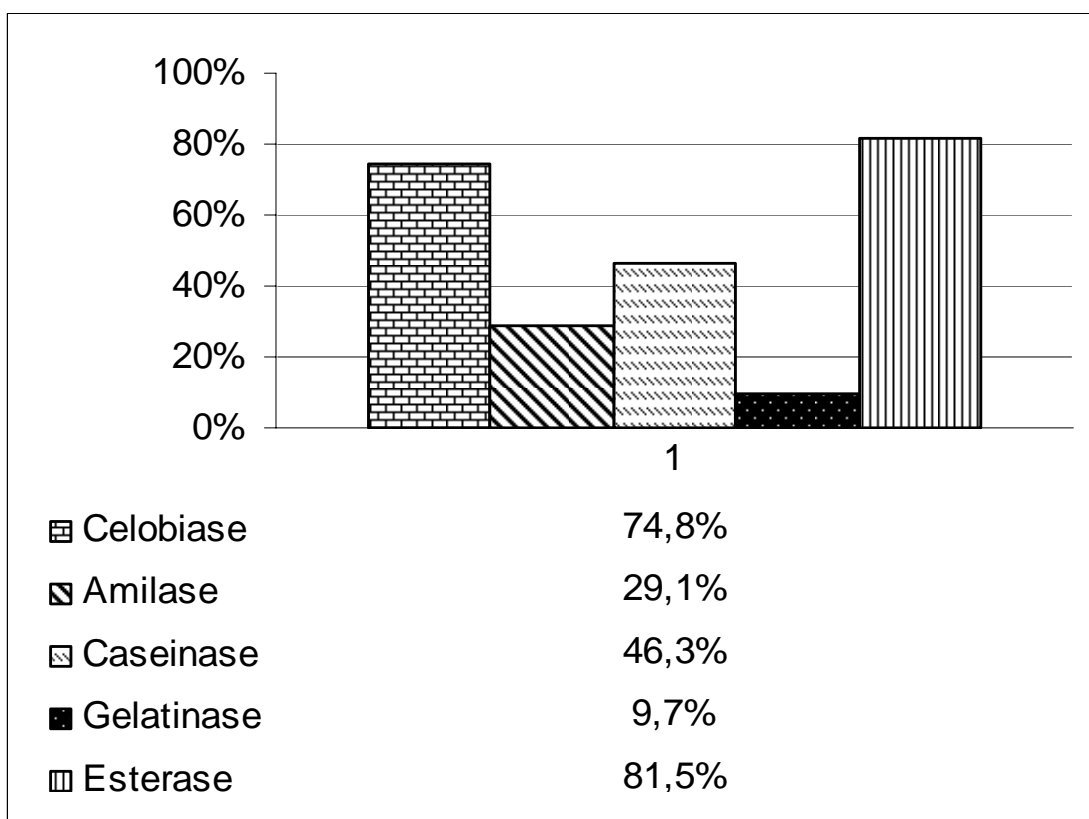


Figura 6: Percentagem absoluta do perfil enzimático avaliado nos isolados de figueiras.

Os fungos semelhantes a leveduras foram os maiores produtores de amilase (50%), com 18% de bons ou ótimos produtores. Fuentesfria & Valente (2005), analisando leveduras de filoplano, obtiveram apenas 22% de produtores de amilase. A baixa percentagem de leveduras isoladas do filoplano produtoras de amilases está de acordo com o relatado na literatura (Middelhoven & Hoog, 1997). Em ensaios de triagem realizados com isolados de floresta tropical brasileira, foram raros os resultados de ascomicetos e basidiomicetos produtores de amilase em meio sólido (Buzzini & Martini, 2002). Entretanto, Landell *et al.* (2005) obtiveram cerca de 40% dos isolados positivos. Outros autores encontraram alto percentual de leveduras capazes de degradar amido isoladas de diferentes substratos, como o vinho (Strauss *et al.*, 2001). Isso provavelmente reflete a diversidade dos habitats de onde as leveduras avaliadas foram isoladas.

Para o teste de proteases, foi utilizada a hidrólise da gelatina e da caseína. Os isolados foram melhores produtores de caseinase (46,3%) do que de gelatinase (9,7%). Os resultados estão de acordo com Landell *et al.* (2005) que obtiveram cerca de 49% de isolados produtores de caseinase e 14% de gelatinase. No presente trabalho, 77% das leveduras ascomicéticas foram capazes de hidrolisar a caseína, sendo 55,5% fortes produtoras, enquanto nenhum isolado foi capaz de hidrolisar a gelatina. Em relação aos basidiomicetos, apenas 3,4% produziram gelatinase, em contrapartida, 36,2% produziram caseinase, sendo 31,8% fortes produtores. A produção de caseinase por basidiomicetos foi semelhante ao encontrado por Buzzini & Martini (2002), que relataram a atividade caseinolítica em um terço das

leveduras ambientais testadas. Abranches *et al.* (1997) estudando a comunidade de leveduras associadas a diferentes habitats tropicais, observaram que as leveduras basidiomicéticas foram mais freqüentemente proteolíticas do que as ascomicéticas e que a produção de proteases extracelulares pode ser importante para as leveduras terem acesso a mais fontes de nitrogênio, obtendo um equilíbrio nutricional com as fontes de carbono disponíveis. Trindade *et al.* (2002) avaliaram a produção de enzimas por leveduras isoladas de polpa de frutas tropicais. A produção de gelatinase foi menor que a de caseinase em todas as frutas analisadas, o que está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho. Em contrapartida, Rosa *et al.* (2002) em um estudo com comunidades de leveduras associadas a frutas tropicais, encontraram uma ampla produção de proteases. No presente trabalho, quase 80% dos fungos semelhantes a leveduras foram produtores de caseinase, sendo 66% altamente produtores (++), enquanto apenas 26% degradaram fortemente a gelatina.

Foram testados 138 isolados de figueiras para verificar a atividade de esterase, sendo 81,5% produtores da enzima. Fuentesfria & Valente (2005) em estudo com leveduras isoladas de *Hibiscus* do Parque Farroupilha (RS), obtiveram 43% dos isolados produtores de esterase, enquanto 63% dos isolados de filoplano de bromélia do Parque de Itapuã produziram a enzima (Landell *et al.*, 2005). No presente trabalho, as leveduras ascomicéticas apresentaram 88,8% dos isolados com forte produção de esterase. Entre os basidiomicetos 74% dos isolados foram produtores. A maioria dos fungos semelhantes a levedura (97,7%) produziu esterase, sendo 88,6% com ótima

produção. As leveduras isoladas de figueiras obtiveram um ótimo resultado, com várias cepas com boa produção enzimática. Esta elevada atividade enzimática demonstra que essas leveduras possuem um grande potencial para produção de esterase. Esses números confrontam os resultados de Buzzini & Martini (2000) que obtiveram atividade de esterase apenas nos grupos dos basidiomicetos e fungos semelhantes a leveduras, não tendo nenhum ascomiceto positivo em isolados da Mata Atlântica Brasileira. Isso pode estar refletindo diferenças nos nutrientes disponíveis para a utilização por microrganismos na superfície foliar das diversas plantas. A superfície das folhas de plantas é modificada quanto à composição química, durante as fases de desenvolvimento da planta (Katja *et al.*, 2006; Jétter & Schaffer, 2001). Isto irá influenciar na microflora das folhas e, conseqüentemente, na produção de enzimas extracelulares pelas leveduras presentes.

A comparação entre a atividade amilolítica no presente trabalho e em Landell *et al.* (2005), realizado com leveduras isoladas de folhas bromélias no Parque de Itapuã, produziu resultados interessantes. Enquanto a produção de amilase em isolados com afinidade ascomicética de bromélias foi de 21,1%, em isolados de figueiras não houve produção de amilase por leveduras ascomicéticas. Como o local de amostragem (Parque de Itapuã) e metodologia de produção enzimática utilizada foram os mesmos, isso pode estar refletindo diferenças nos nutrientes disponíveis para a utilização por microrganismos na superfície foliar das duas plantas. Os mesmos resultados foram encontrados quanto à produção de gelatinase, pois 15,8% dos isolados com afinidade

ascomicética de bromélias foram capazes de produzir a enzima, enquanto nenhum isolado ascomicético de folhas de figueira produziu gelatinase.

As cepas FI 55, FI 107, FI 125 e FI 139 foram capazes de produzir todas as enzimas testadas. Isto é de extrema importância, porque microrganismos bons produtores de várias enzimas de interesse são mais valiosos que restritos produtores de uma enzima em particular, pois apresentam uma versatilidade de aplicações industriais, além de serem economicamente mais rentáveis. (Panke & Wubbolts, 2002; Van Beilen & Li, 2002).

As leveduras ambientais testadas demonstram ter potencial para contribuir efetivamente para a inovação biotecnológica. As cepas com melhor produção serão encaminhadas para estudos de viabilidade e de otimização da produção enzimática. Estudos verificando a produção de outros grupos funcionais enzimáticos devem ser feitos para ampliar o conhecimento sobre o real potencial tecnológico destas leveduras.

4.5.2 Avaliação de atividade “killer”

As 175 leveduras e fungos semelhantes a leveduras foram avaliados quanto a sua capacidade de secretar micocinas através de testes de inibição *in vitro* de duas cepas de leveduras patogênicas ao homem. Das 175 linhagens, 8 apresentaram atividade “killer”, sendo 7 leveduras verdadeiras: 5 ascomicetos (FI 11, FI 144 e FI 148 do gênero *Candida*; *Debaryomyces hansenii* FI76 e *Kluyveromyces lactis* FI 95); 2 basidiomicetos (*Rhodotorula glutinis* FI 159 e FI 168) e um fungo semelhante a levedura (FI 147). Estas apresentaram atividade “killer” contra *Cryptococcus neoformans*, mas nenhuma contra *Candida albicans*.

Relatos de atividade “killer” contra cepas de *Cryptococcus neoformans* foram realizados por Boekhout & Scorzetti (1997), Criseo *et al.*, 1999. Segundo Fuentefria *et al.* (2006) duas leveduras com fenótipo “killer”, *Kodamaea ohmeri* (HB55 e HB88), isoladas de folhas de *Hibiscus rosa-sinensis*, foram capazes de inibir fungos patogênicos humanos. Estas leveduras inibiram todos os isolados de *Cryptococcus neoformans* (vars. *neoformans* e *grubii*) e *Cryptococcus gattii* testados, incluindo isolados clínicos e ambientais. Em outro trabalho, Fuentefria *et al.* (2007) testaram 20 cepas de leveduras com atividade “killer”, sendo que 5 foram capazes de inibir pelo menos 99% dos *Cryptococcus* (*C. neoformans* e *C. gattii*) testados. Esses trabalhos demonstram o potencial das leveduras “killer” como fonte promissora de novos agentes antifúngicos para o controle de microrganismos, justificando a procura por estas leveduras em novos ambientes.

5. CONCLUSÕES

Os isolados de leveduras obtidos de figueiras coletadas no Parque de Itapuã foram identificados fenotipicamente pela metodologia convencional. As linhagens denominadas como *Bullera* sp, *Candida* sp, *Cryptococcus* sp e *Rhodotorula* sp apenas puderam ser identificadas ao nível de gênero com a metodologia utilizada. Quatro isolados do gênero *Bullera* foram seqüenciados e tratam-se de duas novas espécies. Assim sendo, o filoplano de figueiras demonstra ser um bom substrato para o isolamento de leveduras, inclusive de novas espécies.

Alguns isolados de leveduras e fungos semelhantes a leveduras foram capazes de produzir diferentes enzimas. As cepas *Cryptococcus macerans* – similar (FI 27), “Yeast-like” 02 (FI 59), “Yeast-like” 02 (FI 147) e “Yeast-like” 06 (FI 152) foram boas produtoras das enzimas celobiase, caseinase, gelatinase e esterase. Já os isolados “Yeast-like” 06 (FI 131) e *Rhodotorula glutinis* (FI 163) obtiveram boa produção das enzimas amilase, caseinase, gelatinase e esterase. “Yeast-like” 01 (FI 55), “Yeast-like” 06 (FI

107), *Aureobasidium* sp 06 (FI 125) e *Aureobasidium* sp 11 (FI 139) foram capazes de produzir todas as enzimas testadas. Os isolados selecionados como melhores produtores serão encaminhados para futuros estudos de otimização de produção enzimática.

Aproximadamente 4,5% dos isolados de leveduras e fungos semelhantes a leveduras apresentaram atividade “killer”. Apesar do baixo número de isolados com essa capacidade, este resultado torna-se importante, pois as cepas inibiram a levedura *Cryptococcus neoformans*, um importante patógeno humano.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, J. *et al.* The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 328-336, 1997.
- ABRANCHES J. *et al.* Yeast diversity and killer activity dispersed in fecal pellets from marsupials and rodents in a Brazilian tropical habitat mosaic. **FEMS Microbiology Ecology**. Amsterdam, v. 26, p. 27-33, 1998.
- ABRANCHES, J. *et al.* The yeast community and mycocin producers of guava fruit in Rio de Janeiro, Brazil. **Mycologia**, Philadelphia, v. 92, p. 16-22, 2000.
- ALMEIDA, D.S. **Recuperação ambiental da Mata Atlântica**. Ilhéus: UESC, 2000. 130p.
- ANDREWS, J.H. Future research directions in phyllosphere ecology. In: ANDREWS, J. H., HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991. p. 467–479.
- ANDREWS, J.H.; HARRIS R.F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v. 38, p. 145-180, 2000.
- ANDREWS, J.H. *et al.*, Population biology of *Aureobasidium pullulans* on apple leaf surfaces. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, N. 6, p. 500-513, 2002.
- ARAÚJO, F.V. *et al.* A preliminary note on yeast communities of bromeliad tank waters of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, p. 118-121, 1998.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4. ed. Redwood: Benjamin/Cummings Science Publishing, 1997. 643p.
- AZEREDO, L.A.I. *et al.* Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. **International Microbiology**, Barcelona, v. 1, p. 205–208, 1998.
- BAB'EVA, I.P.; CHERNOV I.Y. Geographic aspects of yeast ecology. **Physiology and General Biology Reviews**, London, v. 9, p.1-54, 1995.
- BARNETT J.A. *et al.* **Yeasts, characteristics and identification**. 4rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 811 p.

BOEKHOUT, T.; SCORZETTI, G. Differential killer toxin sensitivity patterns of varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, Oxfordshire, v. 35, p. 147-149, 1997.

BRAGA, A.A., *et al.* Screening of yeasts from Brazilian Amazon rain forest for extracellular proteinases production. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 21, p. 353-359, 1998.

BREEZE, E.M.; DIX, N.J. Seasonal analysis of the fungal community on *Acer platanoides* leaves. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 77, p. 321-328, 1981.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Biodiversity of killer activity in yeasts isolated from the Brazilian rain forest. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, p. 607-611, 2000.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, p. 1020-1025, 2002.

CARAUTA J.P.P. **Ficus (Moraceae) no Brasil**: conservação e taxonomia. Rio de Janeiro: Albertoa, v. 2, 1989.

CARAUTA J.P.P.; DIAZ B.E. **Figueiras no Brasil**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2002. 212 p.

CRISEO, G. *et al.* Killer activity at different pHs against *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype A by environmental yeast isolates. **Mycoses**, Berlin, v. 42, p. 601-608, 1999.

DE HOOG, G.S.; YURLOVA, N.A. Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 65, p. 41-54, 1994.

DE JAGER, E.S. *et al.* Microbial ecology of the mango phylloplane. **Microbial Ecology**, New York, v. 42, p. 201-207, 2001.

DI MENNA, M.E. Yeasts from the leaves of pasture plants. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 2, p. 394-405, 1959.

DO CARMO-SOUZA, L. Distribution of yeasts in nature. In: ROSE, A. H., HARRISON, J. S. (Eds.). **The yeasts**. London: London Academic Press, 1969. p. 79-105.

FIALA, V. *et al.* Occurrence of soluble carbohydrates on the phylloplane of maize (*Zea mays* L.): variations in relation to leaf heterogeneity and position on the plant. **New Phytologist**, London, v. 115, p. 609-615, 1990.

FIGUEIREDO, A.R. *et al.* Fungos e vespas sobrevivem juntos. **Ciência hoje**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 166, p. 61-62, 1995.

FLANNIGAN, B.; CAMPBELL, I. Preharvest mould and yeast floras on the flag leaf, bracts and caryopsis of wheat. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 69, p. 485-494, 1977.

FOKKEMA, N.J. *et al.* Manipulation of yeasts on field-grown wheat leaves and their antagonistic effect on *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 72, p. 19-29, 1979.

FONSECA, A.; INÁCIO, J. Phylloplane Yeasts. In: ROSA, C., PÉTER, G. (Eds.) **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Berlin: Springer-Verlag, 2006. p. 263- 301.

FUENTEFRIA, A.M. *et al.* Inhibition of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates by two Brazilian killer yeasts. **Journal of Basic Microbiology**. Berlin, v. 46, n. 2, p. 87-93, 2006.

FUENTEFRIA, A.M. *et al.* Typing and patterns of cellular morphological alterations in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates exposed to a panel of killer yeasts. **Medical Mycology**, [s.l.], v. 45, p.1-10, 2007.

FUENTEFRIA, A.M.; VALENTE, P. Screening of enzyme-producing yeast and yeast-like fungi from the phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis* in Brazil. **Revista Tecno-Lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 9, n. 1, p. 9-24, 2005.

FUNGSIN, B. *et al.* *Bensingtonia thailandica* sp. nov., a novel basidiomycetous yeast species isolated from plant leaves in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 51, p. 1209-1213, 2001.

FUNGSIN, B. *et al.* *Kockovaella barringtoniae* sp. nov., a new basidiomycetous yeast species isolated from a plant leaf collected in a tropical rain forest in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 52, p. 281-284, 2002.

FUNGSIN, B. *et al.* *Bullera koratensis* sp. nov. and *Bullera lagerstroemiae* sp. nov., two new ballistoconidium-forming yeast species in the Trichosporonales clade isolated from plant leaves in Thailand. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 52, p. 73-81, 2006.

GOLUBEV, W.; NAKASE, T. Mycocinogeny in the genus *Bullera*: taxonomic specificity of sensitivity to the mycocin produced by *Bullera sinensis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 146, p. 59-64, 1997.

GOMES, L.H. *et al.* Presence of yeast *Candida tropicalis* in figs infected by the fruit fly *Zaprionus indianus* (Dip.: Drosophilidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 5-7, 2003.

GUNDLLAPALLI, S.B. *et al.* Different genetic backgrounds influence the secretory expression of the LKA1-encoded *Lipomyces kononenkoae* α -amylases in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 24, p. 651-656, 2002.

HAGLER, A.N. *et al.* Yeasts and coliform bacteria of water accumulated in bromeliads of mangrove and sand dune ecosystems of southeast Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 39, p. 973-977. 1993.

HAWKSWORTH, D.L. *et al.* **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. 8rd ed. London: CAB International, 1995. 616p.

HERZBERG, M.B. Ecology of yeast in plant-bumblebee mutualism in Central Europe. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 50, p. 87-100, 2004.

HISLOP, E.C.; COX, T.W. Effects of captan on the non-parasitic microflora of apple leaves. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 52, p. 223-235, 1969.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IBGE. **Cadastro de Áreas Especiais**. Rio de Janeiro, 1990.

INÁCIO, J.; FONSECA, A. Reinstatement of *Rhodotorula colostri* (Castelli) Lodder and *Rhodotorula crocea* Shifrine & Phaff, former synonyms of *Rhodotorula aurantiaca* (Saito) Lodder. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 4, p. 557-561, 2004.

INÁCIO, J. *et al.* Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a mediterranean-type ecosystem in Portugal. **Microbial Ecology**, New York, v. 44, p. 344-353, 2002.

INÁCIO, J. *et al.* Phylloplane yeasts from Portugal: seven novel anamorphic species in the Tremellales lineage of the Hymenomycetes (Basidiomycota) producing orange-coloured colonies. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 5, p.1167-1183, 2005.

INÁCIO, J. *et al.* *Farysizyma* gen. nov., an anamorphic genus in the Ustilaginales to accommodate three novel epiphytic basidiomycetous yeast

species from America, Europe and Asia. **FEMS Yeast Research**, accepted. 2008.

JETTER, R.; SCHÄFFER, S. Chemical Composition of the *Prunus laurocerasus* Leaf Surface. Dynamic Changes of the Epicuticular Wax Film during Leaf Development. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 126, p. 1725?–1737, 2001.

KADEMI, A. *et al.* thermostable esterase activity from newly isolated moderate thermophilic bacterial strains. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 24, p. 332-338, 1999.

KATJA, B. *et al.* Ontogenetic variation in chemical and physical characteristics of adaxial apple leaf surfaces. **Phytochemistry**, [s.l], v. 67, p. 161–170, 2006.

KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomic study**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984. 1082 p.

KURTZMAN, C.P. New anamorphic yeast species: *Candida infanticola* sp. nov., *Candida polysorbophila* sp. nov., *Candida transvaalensis* sp. nov. and *Trigonopsis californica* sp. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 92, p. 221-231(11), 2007.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J. **The Yeasts, a taxonomic study**. 4rd ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1998. p. 1088.

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

LACHANCE, M.A.; STARMER, W.T. Ecology and yeasts. In: KURTZMAN, C.P., FELL, J. W. (Eds.). **The yeasts: a taxonomic study**. 4rd ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 21-30. 1998.

LANDELL, M.F. *et al.* Perfil enzimático de leveduras e fungos semelhantes a leveduras associados a bromélias da Praia da Pedreira, Parque de Itapuã – RS. **Revista Tecno-Lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 9, n. 2, p. 55-67, 2005.

LANDELL, M.F. *et al.* Biodiversity of yeasts associated to bromeliads in Itapuã Park, Viamão/RS. **Biociências**, Porto Alegre, v. 14, p. 144-149, 2006.

LAST, F.T.; PRICE, D. Yeast associated with living plants and their environs. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Eds) **The yeasts**. Academic Press London and New York, 1969. p. 184-218.

LINDOW, S.E.; BRANDL, M.T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1875-1883, 2003.

LYND, L.R. *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, p. 506-577, 2002.

McBRIDE, R.P.; HAYES, A.J. Phylloplane of European larch. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 69, p. 39-46, 1977.

McCORMACK, P. *et al.* Production of antibacterial compounds by phylloplane inhabiting yeasts and yeast like fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 927-931, 1994.

MERCIER, J.; LINDOW, S.E. Role of surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 66, p. 369-374, 2000.

MEYER, S.A. *et al.* *Candida Berkhout*. In: KURTZMAN, C. P., FELL, J. W. (Eds) **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1998. p. 454-573.

MIDDELHOVES, W.J. Identity and biodegradative abilities of yeast isolated from plants growing in an arid climate. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 72, p. 81-89, 1997.

MIDDELHOVEN, W.J.; DE HOOG, G.S. *Hormonema schizolunatum*, a new species of dothideaceous black yeasts from phyllosphere. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 71, p. 297-305, 1997.

MOLINARI, F. *et al.* Isolation of a novel carboxylesterase from *Bacillus coagulans* with high enantioselectivity toward racemic esters of 1,2-O-isopropylidenediglycerol. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 19, p. 551-556, 1996.

MORAIS, P.B. *et al.* Yeast associated with *Drosophila* in tropical forests of Rio de Janeiro, Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 1150-1155, 1992.

MORAIS P.B. *et al.* Yeasts vectored by *Drosophila quadrum* (*calloptera* group) in tropical rain forests. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, p. 87-91, 1996.

NAKASE, T. Expanding world of ballistosporous yeasts: distribution in the phyllosphere, systematics and phylogeny. **Journal of General Applied Microbiology**, Tokyo, v. 46, p. 189-216, 2000.

NEUFELD, P.M. **Manual de micologia médica: técnicas básicas de diagnóstico.** Rio de Janeiro: Programa Nacional de Controle de Qualidade, 1999. 240p.

PANKE, S.; WUBBOLTS, M.G. Enzyme technology and bioprocess engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, p. 111-116, 2002.

PETER, G. *et al.* *Ogataea allantospora* sp. nov., an ascomycetous yeast species from phylloplane. **Antonie van Leeuwenboek**, Amsterdam, v. 92, p. 443-448, 2007.

PFALLER, M.A. *et al.* Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, p. 1437-1441, 1988.

PIMENTA, R.S. **Levantamento de leveduras em dois fragmentos de Mata Atlântica no estado de Minas Gerais.** 2001. 70f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

PRADA, G.M.M.; PAGNOCCA, F.C. Ascomycetous yeasts associated with naturally occurring fruits in a tropical rain forest. **Folia Microbiologica**, [s.l.], v. 42, p. 39-46, 1997.

PRAKITCHAIWATTANA, C.J. *et al.* Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 4, p. 865–877, 2004.

PRASONGSUK, S. Thailand habitats as sources of pullulan-producing strains of *Aureobasidium pullulans*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 21, n 4, p. 393-398, 2005.

RAMOS J.P. *et al.* Heteroduplex mobility assay of the D1/D2 region of the 26S rDNA for differentiation of *Saccharomyces* species. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, p. 206?-210, 2001.

RAO, M.B. *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, p. 597-635, 1998.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Agricultura e Abastecimento. **Plano de Manejo Parque Estadual de Itapuã.** Porto Alegre. Departamento de Recursos Naturais Renováveis. 1997. 158p.

ROSA, C.A. Yeast associated with fresh and frozen pulps of Brazilian Tropical Fruits. **Systematic and Applied Microbiology**, Berlin, v. 25, p. 294-300, 2002.

RUINEN, J. The phyllosphere II: yeasts from the phyllosphere of tropical foliage. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, p. 425-438, 1963.

SAMPAIO, J.P. Diversity, phylogeny and classification of basidiomycetous yeasts. In: AGERER, R., BLANZ, P., PIEPENBRING, M. (Eds.). **Frontiers in Basidiomycete Mycology**, IHW-Verlag, Eching, Germany, v. p. 49–80, 2004.

SANTOS, M.G.G.R. *et al.* **Yeast in Biotechnology**. In: PROGRESS in Microbial Ecology. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997. p. 571-576.

SCHMITT, M.J.; BREINIG, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 26, p. 257-276, 2002.

SCORZETTI, G. *et al.* Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 2, p. 495-517, 2002.

SÉGUY N. *et al.* Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* to *Pneumocystis*: Perspectives in the control of pneumocystosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 22, p. 145-149, 1998.

SHIGEMORI, H. *et al.* Three new metabolites from the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Natural Products**, Columbus, OH, v. 61(5), p. 696-698, 1998.

SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: Senac, São Paulo, 2003. 213p.

SOBREL, M. *et al.* **Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul**. São Carlos: Rima - Novo Ambiente. 350 p. 2006.

STEELE, D.B.; STOWERS, M.K. Techniques for selection of industrially important microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 45, p. 89-106, 1991.

STRAUSS, M.L.A. *et al.* Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p.182-190, 2001.

SUBASH, C.B.G. *et al.* Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oilrich environments. **Mycoscience**, [s.l.] v. 46, p. 119-126, 2005.

SULLIVAN, D.J. *et al.* Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 4 (4-5), p. 369-76, 2004.

TRINDADE, R.C. *et al.* Yeast associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. **Systematic and Applied Microbiology**, Alemanha, v. 25, p. 294-300, 2002.

VAN BEILEN, J.B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, p. 338-344, 2002.

VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 329-350, 1993.

WALKER *et al.* Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. **FEEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 127, p. 213-222, 1995.

WANG, Q.M.; BAI, F.Y. Four new yeast species of genus *Sporobolomyces* from plant leaves. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 4, p. 579-586, 2004.

WANG, Q.M. *et al.* *Bullera cylindrica* sp. nov., *Bullera hubeiensis* sp. nov. and *Bullera nakasei* sp. nov., ballistoconidium-forming yeast species from plant leaves. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 1877-1882, 2004.

WANG, Q.M. *et al.* *Bensingtonia pseudonaganoensis* sp. nov., a novel ballistoconidium-forming yeast species isolated from plant leaves. **Antonie van Leeuwenboek**, Amsterdam, v.89. p. 261-266(6), 2006.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C. P., FELL, J. W. (Org.). **The Yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science B. V., 1998. p. 77-100.

7. APÊNDICES

TABELA 1: Listagem de meios de cultura utilizados.

MEIO	COMPOSIÇÃO
Ágar YEPG	2% glicose; 1% de peptona; 0,5% de extrato de levedura; 2% Ágar
Caldo YEPG	2% glicose; 1% de peptona; 0,5% de extrato de levedura
Ágar GYMP	2% glicose; 2% de extrato de malte; 0,5% de extrato de levedura; 0,2% de fosfato de sódio monobásico; 2% Ágar
Ágar YM	0,3% extrato de levedura; 0,3% extrato de malte; 0,5% peptona; 1% glicose; 2% Ágar
Corn Meal Ágar (Ágar Fubá)	1,7% Corn Meal Agar; 0,5% Agar; 0,04% cloranfenicol; ajustar pH para 4,0
Meio básico para fermentação de açúcares (MBF)	0,75% peptona; 0,45% extrato de levedura; 2% (glicose / lactose / galactose / maltose)
Meio para a assimilação de fontes de carbono	0,67% Yeast Nitrogen Base (YNB); 2% Ágar; 0,5% fonte de carbono (1% rafinose)
Meio para a assimilação de fontes de nitrogênio	1,17% de Yeast Carbon Base (YCB); 2% Ágar; fonte nitrogenada nas diferentes concentrações: 0,078% para nitrato, creatina e creatinina; 0,064% etilamina e 0,056% lisina
Ágar Acetato (meio para a observação de ascósporos)	0,4% acetato de sódio anidro; 2% Ágar
Ágar YCB-Uréia	1,17% YCB; 2% Ágar; 1% uréia filtrada; fuccina ácida
Teste de resistência a NaCl 10 e 16%	2% glicose; 1% de peptona; 0,5% extrato de levedura; 10 ou 16% de NaCl
Teste de resistência a 50% de glicose	2% glicose; 1% de peptona; 0,5% extrato de levedura; 50% de glicose

TABELA 1: Continuação - Listagem de meios de cultura utilizados.

MEIO	COMPOSIÇÃO
Produção de celobiase e esterase	0,67% YNB, 2% Ágar e 0,5% celobiose ou Tween 20 0,5%
Ágar Amido (teste para produção de amilase)	0,67% YNB; 0,2% amido; 2% Ágar
Ágar Caseína (teste para produção de caseinase)	0,67% YNB; 0,5% glicose; 0,5% caseína; 2% Ágar; ajustar pH para 7,0 com KOH
Meio malte-gelatina (teste para produção de gelatinase)	10% extrato de malte e 12% gelatina

TABELA 2: Listagem dos equipamentos utilizados no laboratório.

Equipamento	Marca	Modelo
Câmara de fluxo laminar	VECO	VLFS-12
Autoclave vertical	PHOENIX	AV30
Geladeira	CONSUL	PRATICE 230
Freezer vertical	ELETROLUX	F210
Estufas incubadoras	BIOPAR	TI06
Destilador de água	BIOPAR	PILSEN
Banho-maria	NOVA TÉCNICA	GEFRAN 500
Microscópio	OLYMPUS	CX40
Balança analítica	MARTE	AL200C
Estufa de secagem	BIOMATIC	Sem identificação
Forno de Pasteur	BIOMATIC	Sem identificação
Filtro de esterilização	SARTORIUS	0.45µm

TABELA 3: Resultados dos testes morfológicos e bioquímicos/fisiológicos das culturas isoladas de figueiras.

Isolados	Nº-	Cor da colônia	Crescimento a 37°C	Crescimento a 40°C	Crescimento a 42°C	Assimilação de Nitrato	Assimilação de Nitrito	Assimilação de L-lisina	Assimilação de etilamina	Assimilação de Creatina	Assimilação de Creatinina	Produção de Urease	Diazonium Blue B (DBB)	Crescimento em NaCl 10%	Crescimento em NaCl 16%	Crescimento em Glicose 50%	Produção de compostos amilóides
Ascomicetos																	
<i>Candida albicans</i>	descr*	B	v	v	v	-	-	v	v	-	-	-	-	v	-	v	-
"	FI 11	B	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
"	FI 24	B	-	-	-	-	?	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Candida ernobii</i>	descr	B	-	-	-	v	v	v	+	-	-	-	-	v	-	v	-
<i>Candida ernobii</i> – similar	FI 36	B	-	-	-	+	?	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Candida</i> sp 01	FI 144	B	+	+	+	+	?	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida</i> sp 02	FI 146	B	+	+	+	+	?	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida</i> sp 03	FI 148	B	+	+	+	+	?	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Debaryomyces hanseni</i>	descr	B	v	v	-	-	v	v	v	v	v	-	-	+	v	v	-
"	FI 76	B	+	-	-	-	?	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-

TABELA 3: Continuação - Resultados dos testes morfológicos e bioquímicos/fisiológicos das culturas isoladas de figueiras.

<i>Kluyveromyces lactis</i>	descr	B	v	v	-	-	v	v	v	v	v	-	-	+	-	v	-
"	FI 95	B	-	-	-	-	?	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Pichia pini</i>	descr	v	v	v	v	-	-	v	v	-	v	-	-	v	-	v	-
<i>Pichia pini</i> – similar	FI 123	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Basidiomicetos																	
<i>Bullera</i> sp nov. 01	FI 50	C	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Bullera</i> sp nov. 01	FI 91	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Bullera</i> sp nov. 01	FI 113	C	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bullera</i> sp nov. 02	FI 87	C	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bullera</i> sp nov. 02	FI 88	C	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bullera kunmingensis</i>	descr	C	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	v	+
"	FI 170	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Cryptococcus</i> sp 01	FI 16	L	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Cryptococcus</i> sp 02	FI 103	L	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
<i>Cryptococcus</i> sp 03	FI 180	L	-	-	-	-	?	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Cryptococcus flavescens</i>	descr	C	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
"	FI 51	C	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

TABELA 3: Continuação - Resultados dos testes morfológicos e bioquímicos/fisiológicos das culturas isoladas de figueiras.

<i>Cryptococcus humicola</i> - similar	descr	C	v	-	-	-	v	v	+	v	v	+	+	v	-	-	v
"	FI 37	C	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
"	FI 81	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
"	FI 84	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
"	FI 94	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
"	FI 106	C	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Cryptococcus hungaricus</i>	descr	R	-	-	-	-	v	v	v	-	v	+	+	-	-	v	+
"	FI 181	R	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Cryptococcus laurentii</i>	descr	v	v	-	-	-	v	v	v	v	v	+	+	v	-	v	v
"	FI 15	C	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
"	FI 17	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
"	FI 45	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 53	C	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
"	FI 56	C	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
"	FI 57	C	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
"	FI 63	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
"	FI 64	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+

TABELA 3: Continuação - Resultados dos testes morfológicos e bioquímicos/fisiológicos das culturas isoladas de figueiras.

"	FI 71	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
"	FI 89	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
"	FI 101	C	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
"	FI 133	C	-	-	-	-	?	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
"	FI 143	R	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
"	FI 164	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
"	FI 184	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
"	FI 188	C	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Cryptococcus laurentii</i> – similar	FI 28	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 67	C	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 69	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
"	FI 97	C	+	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Cryptococcus macerans</i>	descr	R	-	-	-	+	+	v	-	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Cryptococcus macerans</i> – similar	FI 27	CR	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Rhodotorula</i> sp 01	FI 03	CR	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 08	CR	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-

TABELA 3: Continuação - Resultados dos testes morfológicos e bioquímicos/fisiológicos das culturas isoladas de figueiras.

"	FI 09	CR	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
"	FI 21	C	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 23	C	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 34	C	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 41	C	-	-	-	+	?	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
"	FI 44	C	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
"	FI 46	CR	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
"	FI 49	C	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 54	C	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 61	C	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 83	CR	+	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 98	C	+	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
"	FI 99	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp 02	FI 19	L	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp 03	FI 119	R	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	descr	v	-	-	-	v	v	v	v	-	-	+	+	v	-	v	-
"	FI 118	R	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

TABELA 3: Continuação - Resultados dos testes morfológicos e bioquímicos/fisiológicos das culturas isoladas de figueiras.

<i>Rhodotorula glutinis</i>	descr	v	v	-	-	v	+	v	v	-	-	+	+	v	v	v	-
"	FI 02	R	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 05	R	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 20	R	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 26	R	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 29	R	+	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 30	R	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 60	R	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 65	R	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 66	R	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 77	R	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 79	R	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 86	R	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 93	R	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 109	R	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 114	R	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 120	CR	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

TABELA 3: Continuação - Resultados dos testes morfológicos e bioquímicos/fisiológicos das culturas isoladas de figueiras.

"	FI 163	R	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 173	R	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 187	R	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Rhodotorula glutinis?</i>	FI 14	R	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 18	R	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 32	R	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 47	R	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 70	R	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 104	R	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 124	R	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 126	R	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 159	CR	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 167	R	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
"	FI 168	CR	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 186	CR	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 190	CR	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>R.glutinis / R. aurantiaca</i>	FI 191	CR	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-

TABELA 3: Continuação - Resultados dos testes morfológicos e bioquímicos/fisiológicos das culturas isoladas de figueiras.

"	FI 04	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
"	FI 25	L	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 117	R	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 121	R	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 150	L	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 153	R	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 157	R	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 158	R	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 162	R	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 183	R	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 189	R	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>R.glutinis / R. aurantiaca</i> - similar	FI 155	R	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 176	R	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Rhodotorula minuta</i>	descr	R	v	-	-	-	-	v	v	-	-	+	+	v	-	v	-
"	FI 06	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Sporobolomyces roseus</i>	descr	v	-	-	-	v	v	v	v	-	-	+	+	v	-	v	-
<i>Sporobolomyces roseus</i> ?	FI 128	R	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

TABELA 3: Continuação - Resultados dos testes morfológicos e bioquímicos/fisiológicos das culturas isoladas de figueiras.

"	FI 140	R	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Isolado não identificado 01	FI 12	B	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Isolado não identificado 02	FI 13	B	+	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Isolado não identificado 03	FI 43	CR	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Isolado não identificado 04	FI 68	CR	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Isolado não identificado 05	FI 73	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Isolado não identificado 06	FI 74	C	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Isolado não identificado 07	FI 78	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Isolado não identificado 08	FI 80	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Isolado não identificado 09	FI 82	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Isolado não identificado 10	FI 96	CR	+	-	-	+	?	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Isolado não identificado 11	FI 108	CR	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Isolado não identificado 12	FI 130	CR	+	-	-	+	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Fungos semelhantes a leveduras																	
<i>Aureobasidium</i> sp	FI 92	CR	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
"	FI 102	CR	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-

TABELA 3: Continuação - Resultados dos testes morfológicos e bioquímicos/fisiológicos das culturas isoladas de figueiras.

"	FI 111	C	+	-	-	+	?	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
"	FI 115	M	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
"	FI 116	CR	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	-	-	-	-	?
"	FI 125	CR	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	-	-	-	-	?
"	FI 134	C	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
"	FI 135	C	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
"	FI 136	C	-	-	-	-	?	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
"	FI 138	CR	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
"	FI 139	CR	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
"	FI 145	CR	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
"	FI 154	CR	-	-	-	?	?	?	?	?	?	+	-	?	?	?	?
"	FI 156	C	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
"	FI 160	C	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
"	FI 165	C	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
"	FI 166	CR	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
"	FI 169	C	-	-	-	+	?	+	?	?	?	+	-	+	-	-	-
"	FI 172	C	?	?	?	?	?	?	?	?	?	+	+	?	?	?	?

TABELA 3: Continuação - Resultados dos testes morfológicos e bioquímicos/fisiológicos das culturas isoladas de figueiras.

"	FI 175	M	-	-	-	?	?	?	?	?	?	+	+	?	?	?	?
"	FI 177	CR	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
"	FI 178	M	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
"	FI 179	M	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 185	M	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
"Yeast-like" 01	FI 01	B	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 10	B	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 55	B	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 58	B	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	?	?	-	-
"	FI 137	B	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
"Yeast-like" 02	FI 59	C	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	?	?	-	-
"	FI 85	C	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 90	C	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 110	C	-	-	-	?	?	?	?	?	?	-	+	?	?	?	?
"	FI 129	C	-	-	-	?	?	?	?	?	?	+	+	?	?	?	?
"	FI 142	C	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 147	C	+	-	-	+	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-

TABELA 3: Continuação - Resultados dos testes morfológicos e bioquímicos/fisiológicos das culturas isoladas de figueiras.

"	FI 149	C	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 182	C	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"Yeast-like" 03	FI 62	C	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 75	C	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 127	C	-	-	-	+	?	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
"	FI 151	C	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
"	FI 174	C	-	-	-	?	?	?	?	?	?	+	+	?	?	?	?
"Yeast-like" 04	FI 100	C	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
"Yeast-like" 05	FI 07	M	-	-	-	+	?	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
"	FI 112	M	-	-	-	+	?	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
"Yeast-like" 06	FI 105	CR	-	-	-	+	?	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
"	FI 107	CR	-	-	-	+	?	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
"	FI 131	CR	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
"	FI 152	CR	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?

+, assimilação do carboidrato; w, fraca assimilação; D, positivo lento; ?, resultado desconhecido; v, variável; - assimilação negativa; B, colônia de cor branca; C, colônia de cor creme; CR, colônia de cor creme - rosada; L, colônia de cor laranja; R, colônia de cor rosa a vermelha; M, colônia de cor marrom; * descrição da espécie.

TABELA 4: Perfil bioquímico dos isolados de figueiras.

Isolados	Nº-	Fermentação D-glicose	Fermentação D-galactose	Fermentação maltose	D-glicose	D-galactose	D-ribose	D-xilose	L-arabinose	D-arabinose	L-ramnose	Sacarose	Maltose	Trealose	inulina	Amido	Glicerol	Meso-eritritol	Ribitol	D-glucitol	D-manitol	Celobiose	Salicina	Melibiose	Lactose	Rafinose	M-inositol	Lactato	Citrato	N-acetilglicosamina	Tween 20	
Ascomicetos																																
<i>Candida albicans</i>	descr	+	v	v	+	+	v	v	v	v	-	v	+	v	-	v	v	-	v	v	v	v	v	v	-	-	-	-	v	v	?	?
"	FI 11	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
"	FI 24	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Candida ernobii</i>	descr	+	-	-	+	-	v	v	v	v	v	v	v	v	-	v	+	-	v	v	+	v	v	-	-	-	-	-	v	?	?	
<i>Candida ernobii</i> – similar	FI 36	-	?	?	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Candida</i> sp 01	FI 144	-	?	?	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>Candida</i> sp 02	FI 146	-	?	?	+	+	+	+	+	+	-	?	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida</i> sp 03	FI 148	-	?	?	+	+	-	+	+	+	+	?	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>Debaryomyces hansenii</i>	descr	v	-	v	+	+	v	+	v	v	v	+	+	+	v	v	+	v	+	+	+	v	v	v	v	+	-	v	v	?	?	

TABELA 4: Continuação - Perfil bioquímico dos isolados de figueiras.

"	FI 76	-	?	?	+	+	-	+	+	-	-	?	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+						
<i>Kluyveromyces lactis</i>	descr	v	v	v	+	v	-	v	v	-	-	+	v	v	v	-	+	-	v	v	v	v	v	-	v	v	v	+	v	?	?						
"	FI 95	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	?	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+						
<i>Pichia pini</i>	descr	v	-	-	+	v	+	v	v	v	v	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	v	v	v	?	?						
<i>Pichia pini</i> – similar	FI 123	-	?	?	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-						
Basidiomicetos																																					
<i>Bullera</i> sp nov. 01	FI 50	-	?	?	+	v	+	+	+	+	+	?	+	v	v	v	+	+	v	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-						
<i>Bullera</i> sp nov. 01	FI 91	-	?	?	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-						
<i>Bullera</i> sp nov. 01	FI 113	-	?	?	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	-	-	+	+	+	+	+	?	-	-	+	+	+	-	-	-	-						
<i>Bullera</i> sp nov. 02	FI 87	-	?	?	+	+	+	+	+	+	-	?	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-						
<i>Bullera</i> sp nov. 02	FI 88	-	?	?	+	+	+	+	+	+	-	?	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-						
<i>Bullera kunmingensis</i>	descr	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+	?	?		
"	FI 170	-	?	?	+	+	-	+	+	+	+	?	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
<i>Cryptococcus</i> sp 01	FI 16	-	?	?	+	-	-	-	+	-	+	?	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-					
<i>Cryptococcus</i> sp 02	FI 103	-	?	?	+	+	+	+	+	+	+	?	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-		
<i>Cryptococcus</i> sp 03	FI 180	-	?	?	+	+	+	-	+	-	+	?	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-			
<i>Cryptococcus flavescens</i>	descr	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+	?	?

TABELA 4: Continuação - Perfil bioquímico dos isolados de figueiras.

"	FI 51	-	?	?	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+				
<i>Cryptococcus humicola</i> - similar	descr	-	-	-	+	v	D	+	v	+	+	+	+	+	-	v	v	v	v	v	+	+	v	v	v	v	+	v	v	?	?		
"	FI 37	-	?	?	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+		
"	FI 81	-	?	?	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	
"	FI 84	-	?	?	+	+	-	+	+	+	+	?	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	
"	FI 94	-	?	?	+	+	-	+	+	-	+	?	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-		
"	FI 106	-	?	?	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-		
<i>Cryptococcus hungaricus</i>	descr	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	v	v	v	v	v	+	+	+	v	v	v	+	v	v	+	?	?	
"	FI 181	-	?	?	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+		
<i>Cryptococcus laurentii</i>	descr	-	-	-	+	+	+	+	v	v	+	+	+	+	v	v	v	v	v	+	+	+	+	D	+	v	+	v	D	?	?		
"	FI 15	-	?	?	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-		
"	FI 17	-	?	?	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
"	FI 45	-	?	?	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	
"	FI 53	-	?	?	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
"	FI 56	-	?	?	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
"	FI 57	-	?	?	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
"	FI 63	-	?	?	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+

TABELA 4: Continuação - Perfil bioquímico dos isolados de figueiras.

<i>Rhodotorula glutinis</i>	descr	-	-	-	+	v	v	v	v	v	v	D	v	+	v	v	D	-	v	v	v	v	v	-	-	v	-	v	v	?	?
"	FI 02	-	?	?	+	+	-	+	+	+	-	?	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
"	FI 05	-	?	?	+	+	-	+	+	-	-	?	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
"	FI 20	-	?	?	+	+	+	+	+	+	-	?	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
"	FI 26	-	?	?	+	-	-	-	-	-	-	?	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
"	FI 29	-	?	?	+	-	-	+	+	-	-	?	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
"	FI 30	-	?	?	+	-	-	+	-	+	-	?	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
"	FI 60	-	?	?	+	+	-	+	+	+	-	?	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
"	FI 65	-	?	?	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
"	FI 66	-	?	?	+	+	-	+	+	+	-	?	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
"	FI 77	-	?	?	+	+	-	+	-	+	-	?	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
"	FI 79	-	?	?	+	-	-	+	+	-	+	?	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-	-
"	FI 86	-	?	?	+	-	+	+	+	+	-	?	-	+	+	-	+	-	+	+	+	?	+	-	-	+	-	+	+	+	+
"	FI 93	-	?	?	+	+	-	+	+	+	-	?	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
"	FI 109	-	?	?	+	+	-	+	+	+	-	?	-	+	-	-	+	-	-	+	+	?	-	-	-	+	-	-	-	-	+
"	FI 114	-	?	?	+	+	-	+	-	+	-	?	-	+	-	-	+	-	-	+	+	?	-	-	-	+	-	-	-	-	-
"	FI 120	-	?	?	+	-	-	-	-	-	-	?	-	+	-	-	-	-	+	+	+	?	-	-	-	+	-	-	-	-	-

TABELA 4: Continuação - Perfil bioquímico dos isolados de figueiras.

"	FI 163	-	?	?	+	+	-	+	+	+	-	?	-	+	+	+	+	-	-	+	+	?	-	-	+	-	-	+	-	+	+		
"	FI 173	-	?	?	+	+	+	+	+	+	-	?	+	+	+	+	+	-	+	+	+	?	+	-	-	+	-	+	+	-	+		
"	FI 187	-	?	?	+	+	-	-	-	-	-	?	-	+	-	-	+	-	-	+	+	?	-	-	-	+	-	-	-	-	-		
<i>Rhodotorula glutinis?</i>	FI 14	-	?	?	+	-	-	+	+	-	-	?	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+		
"	FI 18	-	?	?	+	+	-	+	+	+	+	?	+	-	+	+	+	-	+	+	+	?	+	+	-	+	-	+	+	+	-		
"	FI 32	-	?	?	+	-	-	+	+	+	-	?	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-		
"	FI 47	-	?	?	+	+	-	+	+	+	-	?	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-		
"	FI 70	-	?	?	+	-	-	+	+	+	-	?	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	
"	FI 104	-	?	?	+	-	-	-	-	+	-	?	-	-	-	+	+	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
"	FI 124	-	?	?	+	-	-	+	+	+	+	?	+	+	+	+	+	-	+	+	+	?	+	-	-	+	-	+	+	+	-		
"	FI 126	-	?	?	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
"	FI 159	-	?	?	+	-	-	+	+	-	-	?	+	-	+	-	+	+	-	-	+	?	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	
"	FI 167	-	?	?	+	+	-	+	+	+	-	?	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	
"	FI 168	-	?	?	+	-	-	-	+	-	-	?	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	
"	FI 186	-	?	?	+	-	-	-	-	-	-	?	-	-	+	-	+	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
"	FI 190	-	?	?	+	-	-	+	+	-	-	?	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	

TABELA 4: Continuação - Perfil bioquímico dos isolados de figueiras.

<i>R.glutinis / R. aurantiaca</i>	FI 04	-	?	?	+	+	-	+	+	-	-	?	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
"	FI 25	-	?	?	+	+	-	+	+	-	-	?	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
"	FI 117	-	?	?	+	-	-	-	-	+	-	?	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
"	FI 121	-	?	?	+	+	-	+	+	+	-	?	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
"	FI 150	-	?	?	+	+	-	+	-	-	-	?	+	+	+	-	+	-	+	+	+	?	-	-	-	+	-	-	-	-	+
"	FI 153	-	?	?	+	-	-	-	-	-	-	?	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
"	FI 157	-	?	?	+	+	-	-	-	+	-	?	-	+	-	-	+	-	+	+	+	?	-	-	-	+	-	-	-	-	+
"	FI 158	-	?	?	+	+	-	+	+	+	-	?	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
"	FI 162	-	?	?	+	+	-	+	+	+	-	?	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
"	FI 183	-	?	?	+	+	-	+	+	+	-	?	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
"	FI 189	-	?	?	+	+	-	+	+	-	-	?	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
"	FI 191	-	?	?	+	+	+	+	+	+	-	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	-	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>R.glutinis / R. aurantiaca - similar</i>	FI 155	-	?	?	+	+	-	+	-	+	-	?	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
"	FI 176	-	?	?	+	+	-	+	-	+	-	?	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>Rhodotorula minuta</i>	descr	-	-	-	+	v	v	+	v	v	-	v	-	v	-	-	+	-	D	v	v	v	v	-	v	v	-	v	v	?	?
"	FI 06	-	?	?	+	+	-	+	+	-	-	?	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Sporobolomyces roseus</i>	descr	-	-	-	+	v	v	v	v	v	v	+	v	v	-	v	v	-	v	v	v	v	v	-	-	+	-	v	v	?	?

8. VITA

8.1 DADOS PESSOAIS

Nome: Juliana Nunes Mautone

Nascimento: 02/11/1977, Porto Alegre/RS – Brasil

Filiação: Elvira Helena Nunes Mautone e Raul Tomaz Mautone

Email: jumautone@gmail.com

8.2 FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2006-2008 - Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, Brasil.

2003-2005- Curso Técnico em Biotecnologia.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, Brasil.

1997-2002 - Graduação em Ciências Biológicas.

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, RS, Brasil.

1992-1994- Ensino Médio (2º grau).

Escola Estadual de 1º e 2º Graus Padre Rambo, RS, Brasil.

1983-1991 Ensino Fundamental (1º grau).

Escola Estadual de 1º e 2º Graus Padre Rambo, RS, Brasil.

8.3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA

8.3.1 Resumos em anais de eventos

MAUTONE, Juliana Nunes; CORREA, Gabriela Godoy; LONDERO Ludmile Guadagnin; LANDELL, Melissa Fontes SILVA; Patricia Valente da. Seleção de leveduras isoladas de leite bovino e queijo artesanal para aplicação em maturação de queijos. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, 2007, Recife.

MAUTONE, Juliana Nunes; LANDELL, Melissa Fontes; BRITO, Roberta; SILVA, Patricia Valente da. Comparação entre grupos funcionais de leveduras isoladas de filoplano de figueiras e bromélias do Parque de Itapuã, RS. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, 2007, Recife.

MAUTONE, Juliana Nunes; LONDERO Ludmile Guadagnin; SILVA, Patricia Valente da. Inibição de leveduras patogênicas humanas por leveduras “killer” isoladas de folhas de figueiras do Parque de Itapuã, RS. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, 2007, Recife.

MERCADO, Luisa; Bussamara, Roberta; **MAUTONE, Juliana Nunes**; CRESTANI, J. ; SILVA, Patricia Valente da; VAINSTEIN, M. Seleção de microrganismos produtores de lipase para aplicação no tratamento de efluentes. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, 2007, Recife. Congresso Brasileiro de Micologia, 2007, Recife.

MAUTONE, Juliana Nunes; CORREA, Gabriela Godoy; SILVA, Patricia Valente da. Perfil enzimático de leveduras e fungos semelhantes a leveduras associadas a figueiras do Parque de Itapuã, Viamão, RS, Brasil. In: X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 2006, Goiânia. Anais do X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 2006.

MAUTONE, Juliana Nunes; LANDELL, Melissa Fontes; SILVA, Patrícia Valente da. Identificação de leveduras e fungos leveduriformes associados a figueiras do Parque de Itapuã, RS, Brasil. In: X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 2006, Goiânia. Anais do X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 2006.

RIBAS, R. K. C.; **MAUTONE, Juliana Nunes**; LANDELL, Melissa Fontes; SILVA, Patricia Valente da. Identificação e análise do potencial biotecnológico de leveduras balistosporogênicas associadas à vegetação de Mata Atlântica no Rio Grande do Sul. In: XVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2005, Porto Alegre. Anais do XVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2005.

LANDELL, Melissa Fontes; **MAUTONE, Juliana Nunes**; RIBAS, Rodolfo; FRANCO, Márcia; SEBOLT, Marcelo; SILVA, Patrícia Valente da. Potencial biotecnológico de leveduras isoladas da superfície foliar de bromélias do Parque de Itapuã , Viamão/RS. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia Santos-SP. 2005.

LANDELL, Melissa Fontes; **MAUTONE, Juliana Nunes**; FRANCO, Márcia; RIBAS, Rodolfo; SEBOLT, Marcelo; SILVA, Patrícia Valente da. Diversidade de leveduras associadas a bromélias do Parque de Itapuã, Viamão/RS. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia Santos-SP. 2005.

MAUTONE, Juliana Nunes; RIBAS, Rodolfo; LANDELL, Melissa Fontes; SILVA, Patricia Valente da. Perfil fisiológico e enzimático de leveduras associadas à vegetação de Mata Atlântica no Rio Grande do Sul. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia Santos-SP. 2005.

MAUTONE, Juliana Nunes; LANDELL, Melissa Fontes; SILVA, Patricia Valente da. Isolamento de leveduras de filoplano de bromélias do Parque de Itapuã-RS com atividade antagonista contra o fungo fitopatogênico *Bipolaris sorokiniana*. In: 5ª MOSTRA DE TRABALHOS DE INICIAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DA ESCOLA TÉCNICA DA UFRGS, 2004, Porto Alegre. 2004.

LANDELL, Melissa Fontes; **MAUTONE, Juliana Nunes**; FUENTEFRIA, Alexandre Meneghello; SILVA, Patricia Valente. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas de filoplano de bromélias na Praia da Pedreira, Parque de Itapuã - RS. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, Ouro Preto. 2004.

8.3.2 Apresentações de trabalho em eventos

CORREA, Gabriela Godoy; **MAUTONE, Juliana Nunes**; Ludmile Guadagnin Londero; SILVA, Patricia Valente da. Biodiversidade de leveduras associadas a figueiras do Parque de Itapuã, RS, Brasil, 2007.

Ludmile Guadagnin Londero; **MAUTONE, Juliana Nunes**; CORREA, Gabriela Godoy; SILVA, Patricia Valente da. Avaliação do perfil enzimático de leveduras isoladas de folhas de figueiras do Parque de Itapuã, Viamão, RS, 2007.

8.3.3 Participação em eventos

5º Congresso Brasileiro de Micologia. Seleção de leveduras isoladas de leite bovino e queijo artesanal para aplicação em maturação de queijos, 2007.

X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental. Perfil enzimático de leveduras e fungos semelhantes a leveduras associadas a figueiras do Parque de Itapuã, Viamão, RS, Brasil, 2006.

XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Potencial biotecnológico de leveduras isoladas da superfície foliar de bromélias do Parque de Itapuã, Viamão/RS. 2005.

8.3.4 Artigos completos publicados em periódicos

LANDELL, Melissa Fontes; **MAUTONE, Juliana Nunes**; SILVA, Patricia Valente da. Biodiversity of yeasts associated to bromeliads in Itapuã Park, Viamão/RS. *Biociências* (Porto Alegre), v. 14, p. 144-149, 2006.

LANDELL, Melissa Fontes; **MAUTONE, Juliana Nunes**; VALENTE, Patricia. Perfil enzimático de leveduras e fungos semelhantes a leveduras associados a bromélias da Praia da Pedreira, Parque de Itapuã-RS. *Tecnológica*, Santa Cruz do Sul/RS, , 2005.

8.3.5 Artigo submetido

Mautone, Juliana; Landell, Melissa; Fuentefria, Alexandre; Valente, Patricia. Phylloplane yeasts as source of industrially interesting enzymes. Journal Applied Microbiology, 2008.

8.3.6 Participação em bancas examinadoras

Trabalho de conclusão de Curso de graduação

SILVA, Patricia Valente da; Silveira, Rosa Mara Borges da; **MAUTONE, Juliana Nunes**. Participação em banca de Luise Guedes Philomena. Influência da presença de leveduras killer na composição de espécies de leveduras associadas a besouros coletados no Panamá e nos Estados Unidos, 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.