

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

RODOLFO KRÜGER DA CÂMARA RIBAS

**IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS
BALISTOSPOROGÊNICAS ISOLADAS DE
FIGUEIRAS, PAINEIRAS E BROMÉLIAS NO RIO
GRANDE DO SUL.**

PORTO ALEGRE

2006/1

BIO
BIO
355

Rodolfo Krüger da Câmara Ribas

**Identificação de leveduras balistosporogênicas isoladas
de Figueiras, Paineiras e Bromélias no Rio Grande do
Sul.**

Monografia submetida ao Curso de
Ciências Biológicas como um dos
requisitos para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora:
Profa. Dra. Patrícia Valente da Silva

Porto Alegre, 29 de Junho de 2006

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Profa.Dra. Patrícia Valente, pela orientação, paciência, dedicação e amizade durante este ano em que me envolvi pela primeira vez com a microbiologia, no laboratório de Micologia;

Deixo também meu muito obrigado à Msc. Melissa Landell, que atuou como co-orientadora, e companheira. Deixo aqui registrada a profunda admiração que adquiri por estas duas pessoas;

À colega Juliana Mautone, pela cessão de amostras de coletas, e a colaboração amigável que se estabeleceu por ambas as partes;

Ao colega e amigo Msc. Alexandre Fuentefria, que se demonstrou sempre bem-disposto e prestativo, com quem sei que poderei sempre contar;

Aos demais colegas deste laboratório, que formam um ambiente de convívio, antes de tudo, fraternal;

À Profa Dra. Maria Lúcia, sempre presente;

À minha família, pelo suporte e apoio, pela compreensão e paciência, pelo amor incondicional e pelo carinho, nem sempre correspondido, em momentos de pressão;

Aos amigos, que foram compreensivos nos momentos em que “sumi” sem dar notícia;

A minha avó, que me deu forças e incentivo até os últimos segundos;

À Lílian, que foi a fonte inspiradora para que tudo se concretizasse;

A Deus, que iluminou meu caminho até aqui.

A Wilson Krüger, *in memoriam*
(1926-2005)

RESUMO

Foram isoladas 33 cepas de leveduras a partir de folhas de paineiras, figueiras e bromélias, oriundas do Parque Estadual de Itapuã/RS, e de paineira localizada na cidade de Porto Alegre/RS. Das leveduras isoladas, 13 foram produtoras de amilase, 6 de caseinase e outras seis de esterase. Apenas uma cepa apresentou produção de gelatinase. O perfil bioquímico das 3 cepas foi testado quanto à assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio, bem como o crescimento sob estresse osmótico e térmico. Foi também realizada a identificação destas 33 cepas de leveduras.

ABSTRACT

Thirty three yeast strains were isolated from mature leaves of Floss Silk Trees, *Ficus* and Bromeliads, collected at Parque Estadual de Itapuã/RS, and from a Floss Silk Tree, located at Porto Alegre city – RS. Of the isolated yeasts, 13 were amylase producers, six were caseinase producers, and other six produced esterase. Only one strain was capable of gelatinase production. The biochemical profile of the 33 strains was tested for carbon and nitrogen assimilation, as well as growth under osmotic and thermic stress. The identification of these 33 yeast strains was also performed

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leveduras

Leveduras são organismos pertencentes ao reino Fungi, tipicamente eucarióticas, heterotróficas e aclorofiladas. Possuem parede celular e, diferentemente de fungos filamentosos, apresentam talo predominantemente unicelular. Sua reprodução assexuada realiza-se por brotamento (fig. 1A) ou por fissão celular (fig. 1B), e a reprodução sexuada é realizada por meio de esporos (fig.1C) e de conjugação (fig 1D); como não organizam-se em hifas, não produzem corpos de frutificação (Kurtzman e Fell, 1998).

Leveduras têm ampla distribuição na natureza, e por isso podem ser isoladas de diversos substratos, desde os ricos em açúcares simples, como frutos e grãos, até substratos pobres, como água, solo ou ar (Last & Price, 1969). Casos clínicos também são relatados, especialmente em pacientes imunodeprimidos ou imunocomprometidos (Klein e al, 1984; Chuck & Sande, 1989)

De maneira geral, o espectro assimilativo de fontes de carbono de leveduras basidiomicéticas é mais amplo do que o de ascomicéticas, e a produção de pigmentos (fig. 2) e cápsula polissacarídicas podem ser fatores de resistência a raios UV e dessecação. Por esses motivos, a superfície foliar de plantas (filoplano), abriga uma variedade maior de leveduras basidiomicéticas, embora leveduras ascomicéticas também sejam encontradas.

Figura 1 – Reprodução de leveduras

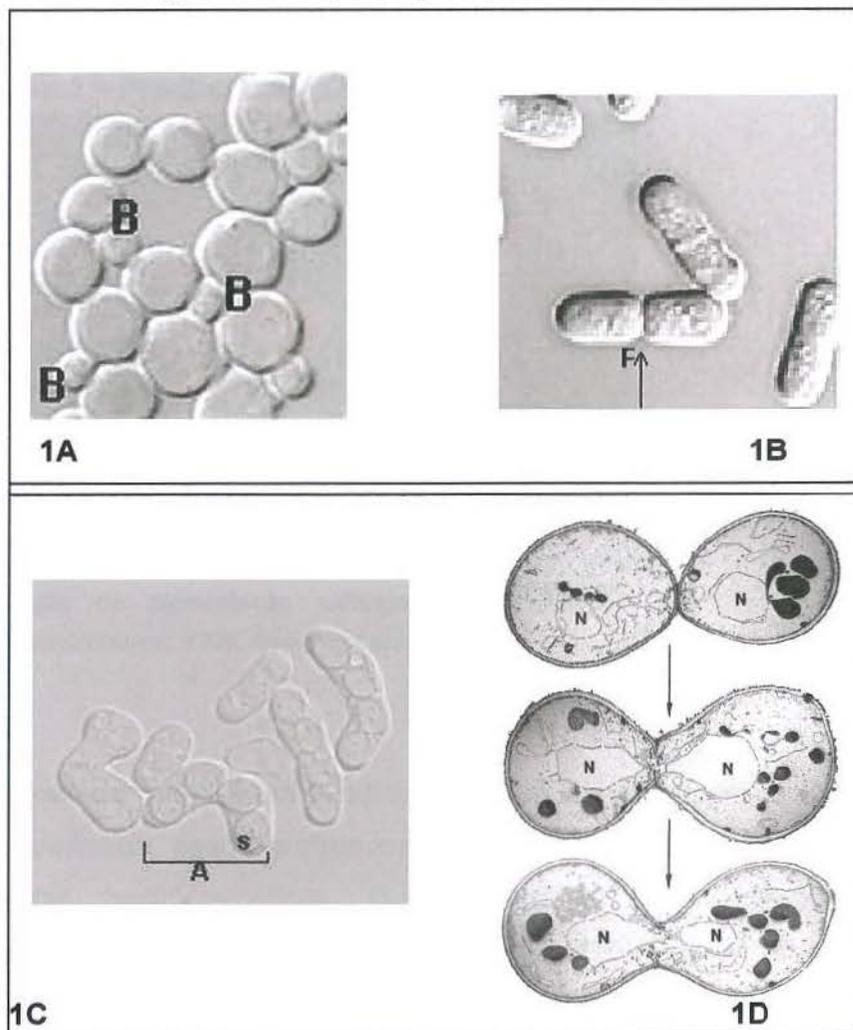


Fig. 1A – Microscopia de contraste de fase de células de *Saccharomyces cerevisiae* em brotamento; B: broto; aum.: 1000x (Campbell et al, 2006) ; Fig. 1B – Microscopia de contraste de fase de células de *Schizosaccharomyces pombe* em fissão celular; f- local da fissão celular; aum.: 1000x (Rincón & Pérez, 2005) . Fig. 1C – Microscopia de contraste de fase de esporos em ascos de *Schizosaccharomyces pombe*; S-esporo, A-asco; aum.: 1000x (Rincón & Pérez, 2005). Fig. 1D: Sequência de eletromicrografias de transmissão, mostrando conjugação em *Saccharomyces cerevisiae*; N: núcleo; aum.: 75000x.: (Mark Rose, 2006).

Figura 2 – Produção de pigmentação por leveduras

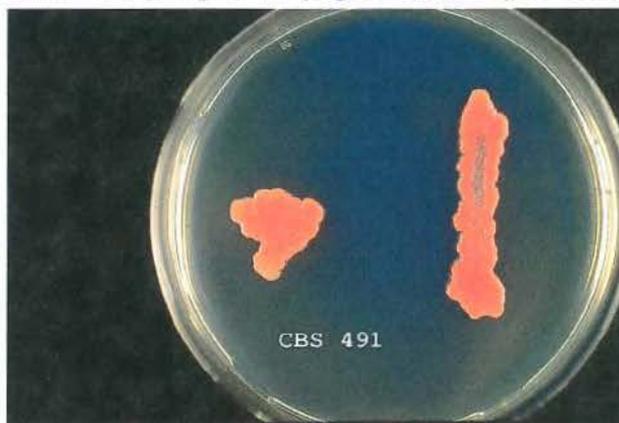


Fig. 2: Colônias de *Sporidiobolus parroseus*, mostrando produção de pigmentação alaranjada (Centrallbureau voor Schimmelcultures, 2006, disponível online).

O filoplano (superfície foliar) é um substrato rico em açúcares complexos e abriga uma biota diversificada, desde artrópodos até microorganismos, dos quais destacam-se leveduras basidiomicéticas. Destas, grande parte apresenta pigmentação e produção de cápsula mucóide (Last e Price, 1969), possivelmente porque pigmentos carotenóides confeririam proteção a raios UV, enquanto a cápsula ofereceria resistência a desidratação, que é um sério risco neste habitat.

1.2 Leveduras balistosporogênicas

Dentre as leveduras basidiomicéticas presentes no filoplano, destacam-se as produtoras de balistosporos ou balistosporogênicas. Balistosporos são estruturas de dispersão produzidas pela célula em momentos de estresse, explosivamente lançadas à distância, por acúmulo de água sob o esterigma. Esta estrutura é produzida apenas por basidiomicetos, incluídos os fungos filamentosos

desta divisão. Há, no entanto, relatos detalhados de ascósporos liberados à força em fungos ascomicéticos como *Ascobolus imersus* (Fischer *et. al.*, 2004).

Grande parte das leveduras isoladas de filoplano já se mostraram produtoras de balistosporos, indicando uma boa adaptação destes grupos a esse substrato. Sua vasta distribuição pode ser devida a estes esporos, que formam colônias satélites, podendo ser carregados pelo vento e dispersadas.

A variedade de leveduras balistosporogênicas não é estudada no Brasil, mas já se mostrou ser grande em ambientes tropicais asiáticos, onde diversas novas espécies já foram descritas (Nakase *et al.*, 2005; Feng-Yan Bai *et al.*, 2001, Nakase *et al.*, 2000).

Balistosporos (fig. 3) são basidiósporos que, produzidos na ponta de esterigmas, são ativamente descarregados no ambiente. O processo inicia-se com a formação de uma gota sobre um núcleo higroscópico (gota hilar, ou "gota de Buller), onde condensa-se água do ambiente. Esta gota progressivamente expande-se até fusionar-se com um filme de líquido que se forma na superfície adjacente do esporo, impelindo este para longe do talo (Carlie e Watkinson, 1994).

Figura 3 – Balistosporo

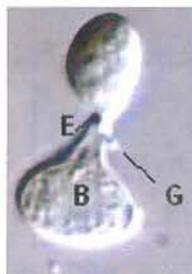


Fig. 3: Microscopia de contraste de fase mostrando balistosporo (B) de *Sporobolomyces salmonicolor*, preso pelo esterigma (E) à célula. G: gota hilar (Foto: Doctor Fungus Corp[®], 2000.)

Recentemente foi descrito que a formação da gotícula inicia-se quando uma quantidade femtomolar (10^{-9} M) de manitol e hexoses acumula-se neste núcleo higroscópico. O processo de descarga foi denominado "catapulta de tensão

superficial", devido ao processo em que a rápida coalescência entre a gota de fluido e o filme líquido do esporo que gera um deslocamento do centro de gravidade do esporo, acelerando-o em aproximadamente 24.500 m/s^2 (Money, 1998) .

Estes esporos podem ser formados acima de uma camada de muco em que as células vegetativas ficam imersas para a fixação ao filoplano, como em *Sporobolomyces roseus*, permitindo a sua dispersão (Cooke e Rayner, 1984).

1.3 Identificação convencional de leveduras

A formação de balistosporos é uma característica considerada informativa na identificação convencional de leveduras, apesar da sua distribuição polifilética (Fell *et al.*, 2000; Nakase, 2000). A identificação convencional de leveduras é uma prática difundida e amplamente aceita, mas muitos grupos próximos filogeneticamente o são também fisiologicamente, e por esses motivos sua diferenciação torna-se por vezes muito difícil.

Leveduras, historicamente, são identificadas e tratadas bioquimicamente de maneira semelhante a bactérias. Características da colônia, crescimento em fontes específicas de carbono e de nitrogênio e outros testes bioquímicos integram o rol de aproximadamente cem testes empregados na taxonomia convencional das leveduras. (Barnett *et al.*, 1990)

Dentre estas provas, uma crucial é a de Urease/DBB (Diazonium Blue B), em que meio com uréia e corante vermelho (fucsina) é inoculado. Ao transformar a uréia em amônia, o pH do meio, então rosa, acidifica, tornando este incolor. Este teste diferencia leveduras de afinidades basidiomicética, que utilizam uréia como fonte de nitrogênio, e ascomicética, que podem ou não utilizá-la. Após, ao corante Diazonium Blue B é adicionado a este meio, e leveduras ascomicéticas que sejam positivos à urease não reagirão ao DBB (Barnett *et al.*, 1990).

Assim, sendo exclusivamente basidiomicéticas, espera-se que leveduras balistosporogênicas dêem resultado positivo aos testes de DBB e urease.

2. OBJETIVOS

Dada a falta de conhecimento a respeito de leveduras balistosporogênicas, assim como o grande número de espécies novas encontrado em ambientes tropicais asiáticos associadas ao filoplano de diversas plantas, este trabalho pretende:

- 1- Realizar isolamento, a partir de folhas coletadas, de leveduras balistosporogênicas , com técnica específica para este fim;
- 2- Realizar testes de produção enzimática, com objetivo de análise de potencial biotecnológico das leveduras obtidas
- 3- Identificar a que espécies pertencem as cepas isoladas

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e processamento das amostras

As coletas de folhas realizaram-se em Porto Alegre no campus central da UFRGS, e no parque de Itapuã – Viamão-RS, entre abril e junho de 2005. Folhas de Figueira (*Ficus* sp.), de Paineira (*Chorisia speciosa*) e de diversas bromélias foram assepticamente coletadas em sacos plásticos individuais estéreis e levadas para processamento em laboratório.

As folhas foram lavadas com água destilada estéril, dentro das embalagens plásticas, a fim de retirar sujeira e artefatos que pudessem existir (artrópodos, teias de aranha, areia, etc) e secas em capela de fluxo laminar. Conforme seu tamanho, algumas foram cortadas para não exceder as dimensões da placa de Petri.

3.2 Isolamento e purificação de culturas de leveduras balistosporogênicas

Com uso de fita adesiva tipo dupla-face, foram afixadas duas folhas, ou dois fragmentos de folhas, sob tampas de placas de Petri, com faces inferior e superior voltadas à placa com meio de cultura, sem contato com este (fig. 4). A incubação foi realizada em Ágar YM (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, ágar 2%) com Cloranfenicol 0,04% [pH4,0] por até duas semanas, à temperatura de 25 +/- 3 °C.

Figura 4 – Afixação de folhas em placa de Petri

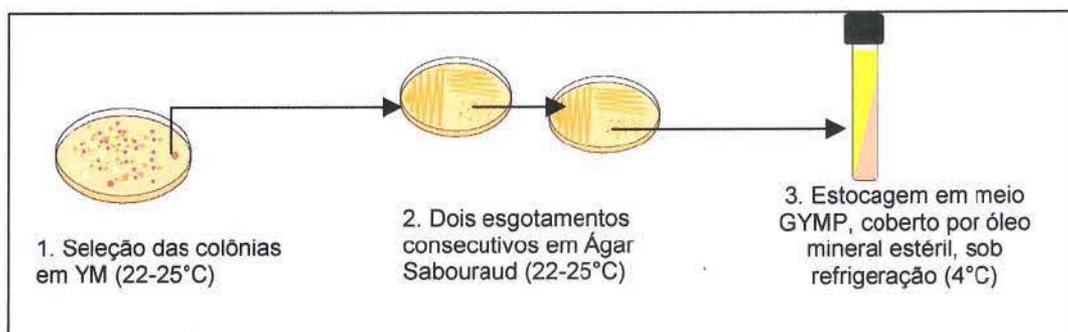


Fig. 4: Folhas afixadas à tampa de placa de Petri sobre meio de cultura (Vista superior)

Colônias isoladas abaixo das folhas foram selecionadas conforme diferenças morfológicas, purificadas por dois esgotamentos consecutivos (fig. 5) em Ágar GYP (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, ágar 2%) e incubadas a 25 +/-3°C.

A fim de evitar crescimento precoce de fungos filamentosos e perda de leveduras, algumas colônias isoladas foram retiradas antes do período de duas semanas.

Figura 5 - Purificação de isolados (Fuentefria, 2005; modificado)



3.3 Manutenção das culturas

Depois de purificadas, as culturas foram incubadas em tubos de ensaio com ágar GYMP inclinado (glicose 2%, extrato de malte 2%, extrato de levedura 0,5%, fosfato de sódio monobásico 2%, ágar 2%) a 25+/-3°C por uma semana, ou mais até observar-se crescimento suficiente e, após, cobriram-se as culturas com óleo mineral estéril. Os tubos foram mantidos sob refrigeração (temperatura média de 4°C)

3.4 Identificação convencional de leveduras

As leveduras foram caracterizadas com base em características macro e micromorfológicas, e em testes fisiológicos padrão para a identificação convencional de leveduras. A identificação foi realizada de acordo com o programa online BioloMICS (Robert, V. & Szoke, S. 2003), e com o programa YEASTCOMPARE © (C. Ciriello & M.A. Lachance, Copyright 1999-2001), que comparam os caracteres obtidos com dados de espécies conhecidas, depositados no banco de dados do programa, e segundo Barnett *et al* (1990)

3.4.1 Características morfológicas

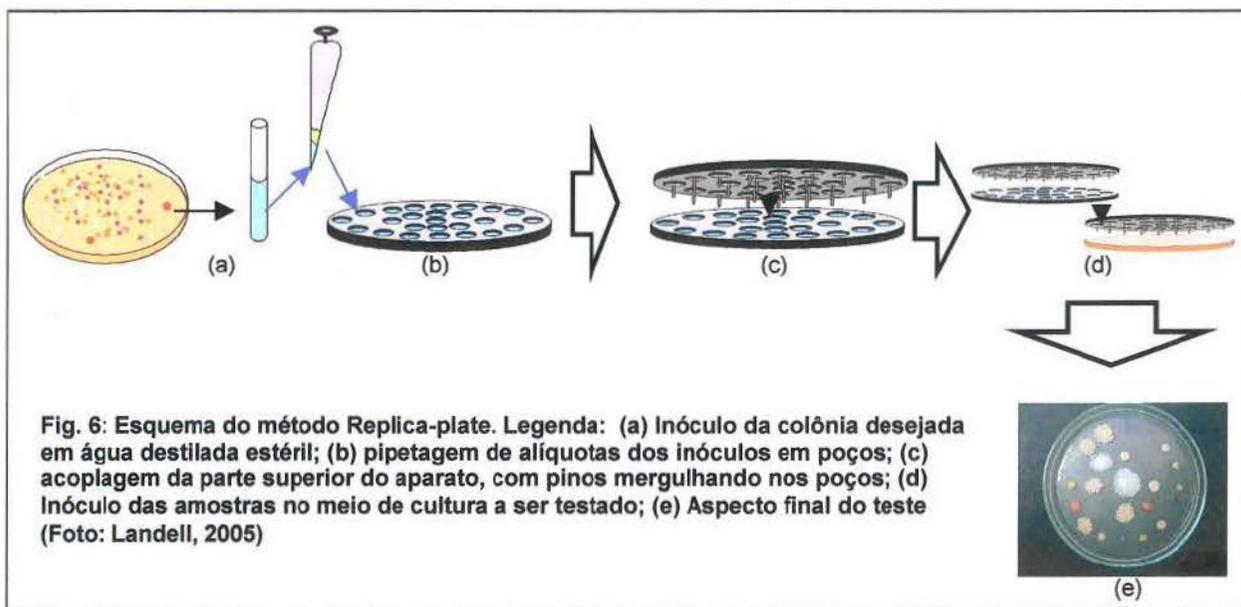
Foram observadas características morfológicas macroscópicas (cor, brilho, forma, margem, superfície, elevação e consistência coloniais), segundo Yarrow (1998), e também características microscópicas (forma da célula, presença e formato de balistosporos, tipos de brotamento e/ou presença de fissão).

3.4.2 Testes bioquímicos

3.4.2.1 Assimilação de fontes de Carbono

Após esgotamento nutricional em água destilada estéril, por 24h a 25+/- 3°C, foi realizada incubação em placas com Yeast Nitrogen Base (YNB) - DIFCO 0,67%, ágar 2% e as fontes de carbono a serem testadas (glicose, inulina, sacarose, melibiose, galactose, lactose, trealose, maltose, amido, celobiose, salicina, sorbose, ramnose, xilose, L-arabinose, D-arabinose, ribose, glicerol, meso-eritritol, ribitol, manitol, inositol, lactato, citrato e tween 20, todos a 0,5%, e rafinose a 1%). Controle negativo era realizado em placa sem adição de fonte de carbono e controle positivo realizado no meio com glicose. Os inóculos foram realizados com o método "Replica plate" (fig. 6)

Figura 6: Método "Replica-plate"



3.4.2.2 Assimilação de fontes de Nitrogênio

Após esgotamento nutricional em água destilada estéril, por 24h a 25+/- 3°C, foi realizada incubação em placas com Yeast Carbon Base (YCB) -DIFCO 1,17%, ágar 2% e as fontes de nitrogênio a serem testadas (nitrato de sódio 0,078%, etilamina 0,064%, L-lisina 0,056%, creatina 0,078%, creatinina 0,078%). O controle negativo era realizado em placa sem adição de fonte de nitrogênio. O controle positivo utilizado era o mesmo da assimilação de fontes de carbono. Os inóculos foram realizados também com o método "Replica plate".

3.4.2.3 Formação de compostos amilóides

Para a verificação da produção de compostos amilóides pelas leveduras, foi adicionado corante Lugol sobre as placas de YNB + Glicose do teste de assimilação de fontes de carbono (ver subitem 2.4.2.1). A leitura era feita por meio da verificação de mudança da coloração da colônia para roxo, sempre que houvesse formação de compostos amilóides.

3.4.2.4 Crescimento sob estresse osmótico

Para a verificação do crescimento das leveduras sob estresse osmótico, as culturas foram testadas em Ágar GYP adicionadas de NaCl 10% e NaCl 16% e, também de Glicose 50%. Ambas foram incubadas por 21 dias, e seu crescimento avaliado a cada sete dias.

3.4.2.5 Crescimento sob estresse térmico

Tubos de ensaio com Caldo GYP inoculados com as leveduras a serem testadas foram incubados a 30°C e 37°C, com agitação, e a turbidez turvação do meio foi avaliada segundo o cartão de Wickerham, diariamente durante três dias.

3.4.3 Testes enzimáticos

3.4.3.1 Produção de amilase

Placas contendo ágar amido (ágar 2%, amido solúvel 0,5%, YNB-DIFCO 0,67%) foram incubadas por sete dias a 25+/-3°C, e a revelação feita com adição de Lugol sobre o meio de cultura. Halos transparentes a amarelados revelavam-se em torno de colônias produtoras (fig. 7), enquanto o restante do meio permanecia corado de azul-escuro.

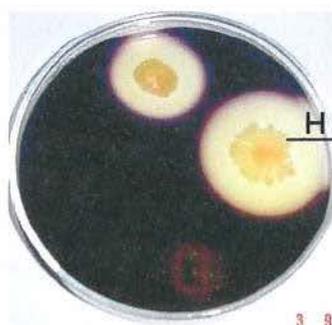


Foto: Landell, M.

Fig. 7: Aspecto da placa de Ágar-amido com inóculos. O Halo transparente (H) indica produção da enzima. (Foto fornecida por Melissa Landell)

3.4.3.2 Produção de caseinase

Placas contendo YNB 0,67%, ágar 2%, glicose 0,5% e caseína 0,5%, ajustadas para pH 7,0 com KOH, foram incubadas por sete dias a 25+/-3°C, e após, sua revelação se deu através da adição de HCl 1N por uma hora. O ácido desnatura a proteína (caseína), que torna-se opaca. Halos transparentes (fig. 8) em torno das colônias indicavam produção da enzima.

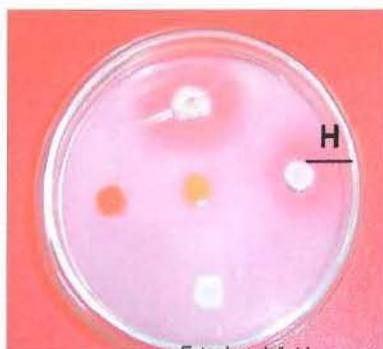


Foto: Landell, M.

Fig. 8: Aspecto da placa de Ágar-caseína, com halos (H) transparentes indicando ação enzimática. (Foto fornecida por Melissa Landell)

3.4.3.3 Produção de esterase

Para a produção de esterase, inoculou-se as leveduras no meio com tween 20 0,5% do teste de assimilação de fontes de carbono (ver sub-item 2.4.2.1). Após sete dias de incubação verificou-se o crescimento sobre a superfície do meio de cultura, sendo esse crescimento considerado como positivo para a produção de esterase.

3.4.3.4 Produção de gelatinase

Para a verificação da enzima gelatinase, tubos de ensaio com meio malte gelatina (extrato de malte 10% e gelatina 12%) foram incubados por 21 dias a $25\pm 3^{\circ}\text{C}$, e após este período, refrigerados a 4°C por duas horas para verificação de hidrólise do meio pela levedura. A não-solidificação da gelatina (fig. 9) sob refrigeração indica produção da enzima.

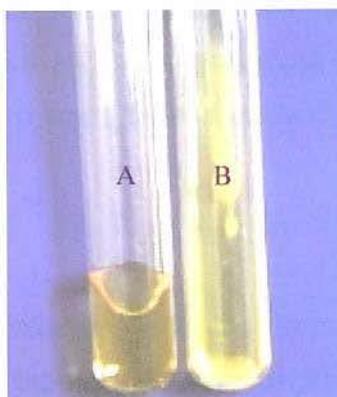


Fig. 9: Aspecto dos tubos com Malte gelatina após refrigeração. A: Meio solidificado, negativo; B: Meio liquefeito, positivo. (Roberts, 2005)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Amostragem

Entre março e agosto de 2005 foram realizadas três coletas, totalizando vinte amostragens de folhas, entre paineira, bromélias e figueiras. Foram isoladas 33 cepas, sendo quatro fungos semelhantes a leveduras e 29 leveduras verdadeiras. Destas, sete foram capazes de formar pseudomicélio, e seis produziram micélio verdadeiro. Assumiu-se que todas pertenceriam à divisão Basidiomycota, uma vez que a técnica de isolamento utilizada é específica para leveduras produtoras de balistosporos, e estas são exclusivamente basidiomicéticas. Assim, nas chaves dicotômicas, assumiu-se como sendo positivas para testes de Urease e DBB, e negativas para fermentação de glicose, já que essa característica não é comum nessas leveduras.

4.2 Testes fisiológicos

Foram testadas a assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio, cujos resultados encontram-se na tabela de identificação (tabela 2). Também foram testados crescimentos a 37°C, em glicose 50% e em NaCl 10%, mas nenhuma das cepas testadas foi capaz de crescimento em tais condições de estresse.

Além disso, é interessante observar que muitas das leveduras apresentaram crescimento em controles negativos, inclusive produzindo pseudomicélio e balistosporos em grande quantidade; isto pode ser explicado pela reserva de energia sob forma de glicogênio que fungos possuem, e pela pouca exigência metabólica de fungos basidiomicéticos, que são adaptados a viver em ambientes pobres em nutrientes. Embora a técnica preveja o esgotamento nutricional destas leveduras, o tempo de esgotamento foi notavelmente insuficiente em muitas delas.

Por outro lado, em muitas das culturas não foram visualizados balistosporos. Este fato é relatado, explicado pela possível perda da capacidade de produção de balistosporos em meios de cultura nutricionalmente ricos (Nakase, 1989). Por serem adaptados a meios pobres em nutrientes, estes organismos não necessitariam investir energia em dispersão, mas sim, em multiplicação celular. A observação de ascósporos, em levedura ascomicéticas, se dá em ágar acetato, sem fontes de carbono ou nitrogênio, forçando o fungo a produzir esporos sexuados, que aumenta a variabilidade da prole e as chances de sobrevivência em um meio hostil. O mesmo ocorre com balistosporos, que são visualizados após crescimento em ágar-fubá – meio utilizado classicamente para observar tubos germinativos em caracterização morfológica de *Candida albicans*. Esta técnica para confirmação da produção de balistosporos não foi utilizada.

Outra explicação para a não observação de balistosporos em muitos dos isolados é a possibilidade de leveduras não-balistosporogênicas presentes no filoplano estarem sendo carreadas junto aos balistosporos das balistosporogênicas. Com isso, apareceriam colônias de leveduras não produtoras de balistosporos, apesar da utilização da técnica de isolamento seletiva para as balistosporogênicas.

4.3 Perfil de produção enzimática

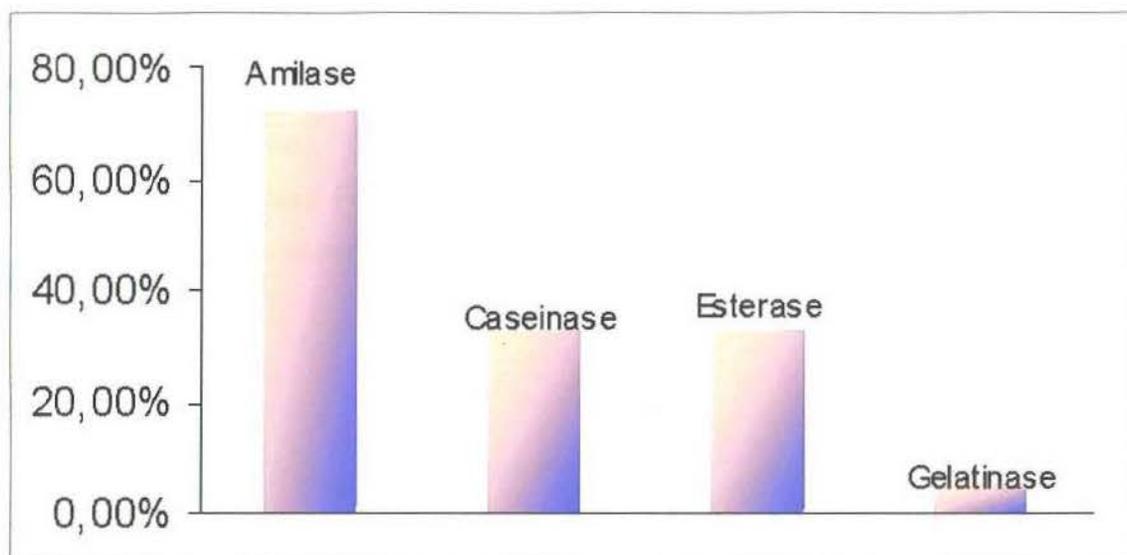
A avaliação de potencial biotecnológico foi realizada em 18 das 35 leveduras, sendo que 13 produziram amilase, seis produziram caseinase, e outras seis produziram esterase. Os resultados encontram-se na tabela 2, e são mostrados também no gráfico 1.

Tabela 1 – perfil de produção enzimática

	1	2	3	9	11	12	16	22	23	26	27	28	30	35	36	38	41	42
Amilase	w	+	+	-	+	-	+	w	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Caseinase	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	w	-	+	w	w	-	+
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esterase	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Legenda: "-": Sem produção; "+": Produção positiva. "w": Crescimento fraco.

Gráfico 1 – Perfil de produção enzimático das cepas testadas



4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS

As 33 cepas foram identificadas com uso do software online BioloMICS, (em [http://www.cbs.knaw.nl/yeast/\(kfgrxf55qyfrbr55h03ngu3p\)/BioloMICSID.aspx](http://www.cbs.knaw.nl/yeast/(kfgrxf55qyfrbr55h03ngu3p)/BioloMICSID.aspx)), com auxílio do programa YEASTCOMPARE (Ciriello, C. & Lachance, M. A. Copyright 1999-2001). A lista se encontra na tabela 1.

As incongruências com a literatura, e a falta de parâmetros com relação a controles negativos, devem-se à incipiência com que se trabalha com estes organismos, sendo que, por ser um campo ainda inexplorado no Brasil, possivelmente haja espécies novas dentre os isolados, não descritas na literatura. Por isso, este é um trabalho que necessita ampliação e aprofundamento.

5. CONCLUSÕES:

- 1- Foram isoladas 33 cepas de leveduras e fungos semelhantes a leveduras a partir de amostras de folhas de paineiras, figueiras e bromélias, utilizando a metodologia para isolamento de leveduras balistosporogênicas.
- 2- Foram realizados testes de produção enzimática com 18 das leveduras isoladas, sendo que a produção de amilase foi a atividade enzimática mais comum, presente em mais de 70% dos isolados
- 3- Os gêneros mais comuns encontrados foram *Rhodotorula* (7 ocorrências), *Sporobolomyces* (5 ocorrências) e *Sporidiobolus* (4 ocorrências). Foram encontradas algumas leveduras ascomicéticas, que não eram esperadas com a metodologia de isolamento utilizada.

Tabela 2 - Lista de espécies identificadas e perfis bioquímicos correspondentes

Testes/Cepas testadas	<i>Udeniomyces pyricola</i>		<i>Rhodotorula glutinis</i> v. <i>glutinis</i>		<i>Kockovaeilla calophylli</i>		<i>Rhodotorula aurantiaca</i>		<i>Rhodotorula aurantiaca</i>		<i>Kockovaeilla calophylli</i>		<i>Kondoa malvinella</i>		<i>Fibulbasidium inconspicuum</i>		<i>Sporobolomyces nylandii</i>		<i>Sporidiobolus johnsonii</i>		<i>Sporobolomyces blumae</i>		
	BA01 (UFRGS - Paineira/Sup)		BA02 (UFRGS - Paineira/sup)		BA03 (UFRGS - Paineira/sup)		BA09 (Itapua - Bromélia/sup)		BA11 (Itapua - Figueira/sup)		BA12 (Itapua - Figueira/Inf):		BA16 (Itapua - Figueira/sup):		BA22: (Itapua - Figueira/sup)		BA23 (Itapua - Figueira/sup)		BA26 (Itapua - Figueira/sup):		BA27 (Itapua - Figueira/sup):		BA28 (Itapua - Figueira/sup):
Amido Solúvel	+	+	-	+	+	+	W	-	W	-	+	+	+	w,d,+	+	+	-	+	-	W	-	+	+
Celobiose	+	-	+	+	w	-	w	-	w	-	d	W	w	+	+	+	+	+	-	-	-	+	W
Citrato	+	-	w,d,+	-	-	+	-	d	-	d	-	-	w	+	-	+	+	+	-	-	-	+	W
D-Arabinose	d	-	+	+	w	+	w	-	d	-	-	-	w	-	+	+	+	+	W	w	-	+	W
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	w,d,-	W	w,d,-	W	+	-	-	w,d,-	+	+	-	W	w	-	-	-
Glicerol	d	+	+	+	-	-	W	+	-	+	-	-	-	+	+	d	+	+	+	w	-	-	W
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	-	-	-	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	W	-	-	-	-
Inulina	-	W	-	W	+	+	W	-	W	-	-	+	-	-	-	+	+	+	W	-	W	-	W
L-Arabinose	+	+	-	W	w	+	w	-	-	-	-	w	+	+	+	+	+	+	W	w	W	+	W
Lactato	-	-	-	+	-	-	-	d	W	d	-	-	d	W	d	d	+	d	W	w	-	-	-
Lactose	+	-	-	+	w	W	w	-	-	-	-	w	-	-	W	d	-	+	W	-	-	-	W
Maltose	+	+	+	+	w	+	w	-	d	-	d	w	+	-	-	+	+	+	W	w	-	+	W
Manitol	+	+	+	+	-	-	W	+	W	+	W	-	-	+	+	+	+	+	W	+	W	w	W
Melibiose	+	-	-	-	w	-	w	-	W	-	-	w	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Meso-eritritol	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-	d	+	+	W	-	W	-	W
NAG	-	-	-	-	-	+	W	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-
Rafinose	+	+	d	+	w	-	w	+	-	-	-	w	-	d	+	+	+	+	-	W	+	+	+
Ramnose	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	W	-	-	+	-	-	W	-	-	w	-
Ribitol	+	+	w,d,+	+	w	+	w	-	d	-	d	W	w	-	d	+	+	+	W	-	W	-	-
Ribose	w,d,-	+	+	+	w	+	w	+	-	-	-	W	w	-	-	+	+	d	W	w	-	-	+
Sacarose	+	-	+	-	-	-	W	+	-	+	-	-	-	w,d,+	-	+	+	+	W	w	-	-	W
Salicina	+	W	w	+	w	+	w	-	d	W	-	W	w	+	-	+	+	+	W	-	W	w	W
Sorbitol	+	+	+	+	-	+	W	d	W	d	+	W	W	w,d,+	+	+	+	+	W	-	W	-	W
Trealose	+	W	+	+	-	+	-	-	W	-	-	W	W	+	+	+	+	+	W	-	-	+	W
Tween 20x	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	W	W	+	+	+	+	+	W	W	-	-	W
Xilose	+	+	d	+	w	+	w	-	+	+	+	w	+	-	-	+	+	+	W	-	+	-	W

Tabela 2 - Lista de espécies identificadas e perfis bioquímicos correspondentes

Testes/Cepas testadas	<i>Tremella foliacea</i>		<i>Aciculoconidium aculeatum</i>		<i>Leucosporidium scottii</i>		<i>Bensingtonia intermedia</i>		<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i>		<i>Sporobolomyces roseus</i>		<i>Sporidiobolus pararoseus</i>		<i>Dioszegia hungarica</i>		<i>Fibulobasidium inconspicuum</i>	
	BA30 (Itapuã - Figueira/sup):	BA35 (Itapuã - Broméial/sup):	BA36 (Itapuã - Paineira/sup):	BA38 (Itapuã - Paineira/sup):	Rhodotorula glutinis var. glutinis	BA41 (Itapuã - Paineira/sup):	BA42 (Itapuã - Paineira/sup):	BA44 (Itapuã - Figueira/sup):	BA47 (Itapuã - Figueira/sup):	BA48 (Itapuã - Figueira/sup):	BA49 (Itapuã - Figueira/cima):							
Amido Solúvel	-	W	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+
Celobiose	-	W	d	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	W	+	W	+	W	+	+	w,d,+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Arabinose	+	+	-	-	d	W	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	w,d,-	W	-	-	d	W	d	-	-	+	d	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	w,d,-	+	+	-	+	-	+	W	+	+	+	+	+	d	W	d	+	d
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	d	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	+
L-Arabinose	d	-	-	-	w,d,-	-	d	-	-	-	-	-	+	W	+	+	+	W
Lactato	w,d,+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	d
Lactose	-	W	-	-	-	W	-	-	-	W	-	-	+	-	+	-	-	d
Maltose	-	-	+	W	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	W	+	-	+
Manitol	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	d	-	+	+	W	+	+	+
Melibiose	-	W	-	W	-	+	-	-	-	+	-	-	+	d	+	d	+	+
Meso-eritritol	d	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	W	d	W
NAG	-	W	-	W	-	W	-	-	-	+	+	+	+	-	W	W	W	+
Rafinose	-	W	-	-	+	W	-	-	d	-	+	-	w,d,-	-	+	+	+	W
Ramnose	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	d	+	d	+	+
Ribitol	+	W	d	-	d	-	+	-	w,d,+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
Ribose	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	w,d,+	+	+	W	d	+	d	W
Sacarose	-	W	+	-	+	W	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	-	+	-	-	+	-	+	-	w	-	w	+	w	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	-	W	+	-	+	-	+	+	+	W	d	W	+	+	+	+
Trealose	+	W	+	+	+	W	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+
Tween 20x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Xilose	+	W	-	-	+	W	+	-	d	-	-	+	-	+	+	+	+	+

Legenda: "+": Crescimento apreciável; "-": Crescimento não observado; "W": Crescimento fraco; "d": Crescimento lento; "sup": isolamento oriundo da face superior da folha; "inf": isolamento oriundo da face inferior da folha

Tabela 2 - Lista de espécies identificadas e perfis bioquímicos correspondentes

Testes/Cepas testadas	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>		<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>		<i>Fibulobasidium inconspicuum</i>		<i>Sporidiobolus pararoseus</i>		<i>Pseudozyma fusiformata</i>		<i>Bullera kunmingensis</i>		<i>Rhodotorula minuta</i>		<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i>		<i>Sporobolomyces syzygii</i>		<i>Dioszegia hungarica</i>		<i>Rhodotorula minuta</i>		
	BA50 (Itapuã - Figueira/sup):	BA51 (Itapuã - Figueira/sup):	BA52 (Itapuã - Figueira/sup):	BA55 (Itapuã - Figueira/sup):	BA56 (Itapuã - Figueira/sup):	BA57 (Itapuã - Figueira/inf):	BA58 (Itapuã - Figueira/sup):	BA59 (Itapuã - Figueira/sup):	BA60 (Itapuã - Figueira/sup):	BA61 (Itapuã - Figueira/sup):	BA63 (Itapuã - Figueira/sup):												
Amido Solúvel	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	-	W	+	W	+	W	-	-	w,d,+	W	W	W	W	W	w,d,+	-	-	-	-	+	+	+	+
D-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	w,d,-	W	W	W	W	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	-	+	+	+	+	+	-,+	+	W	W	W	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	-	+	+	+	d	+	-	W	w,d,-	+	-,+	+	+	+	+	W	w	W	W	d	-	+	W
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	W	-	+	d	+	-	+	-,+	+	-	W	W	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	+	-	W	-	+	-	W	w,d,-	W	-	+	-	-	+	W	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	W	d	-	+	W	+	W	-,+	W	+	W	W	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactato	-	+	d	+	d	+	-	+	w,d,-	+	+	d	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	W	-	+	d	+	-	+	-,+	W	-	W	d	W	-	-	+	W	W	-	+	d	W
Maltose	+	+	-	-	+	W	+	+	w,d,+	-	-	W	-	-	+	W	w	-	+	+	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-,+	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	+
Melibiose	-	+	-	W	-	+	-	-	+	+	-,+	W	+	+	-	+	+	+	d	-	-	-	W
Meso-eritritol	-	W	-	W	d	+	-	W	+	W	-	+	-	-	-	W	-	+	+	+	+	+	W
NAG		W		W		+		W		+		W				-		+		W			W
Rafinose	w,d,-	+	-	+	+	+	w,d,-	+	+	W	-	+	-	+	d	W	w	+	+	+	+	+	W
Ramnose	-	+	-	+	+	+	+	+	w,d,+	+	-	+	-	W	-	W	-	W	d	+	-	-	W
Ríbitol	d	+	+	W	+	W	d	+	w,d,+	W	-	W	+	+	w,d,+	-	-	W	-	-	+	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	-,+	+	-,+	+	d	+	+	-	-	W	d	W	d	W	W
Sacarose	+	+	d	+	+	+	+	+	+	W	-	W	+	-	+	-	+	W	+	+	+	+	-
Salicina	w	+	-	+	+	+	w	+	w,d,+	+	-	W	w	W	w	+	w	W	+	W	w	W	W
Sorbitol	d	+	d	+	+	+	d	+	w,d,+	W	-,+	+	d	+	+	W	w	+	-	+	d	W	W
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W
Tween 20x		W		+		+		+		+		-				W	-			W			-
Xilose	+	+	d	+	+	W	+	W	-,+	+	+	+	+	W	d	W	+	-	+	W	+	-	-

Legenda: "+": Crescimento apreciável; "-": Crescimento não observado; "W": Crescimento fraco; "d": Crescimento lento; "sup": isolamento oriundo do face superior da folha; "inf": isolamento oriundo do face inferior da folha.

Tabela 2 - Lista de espécies identificadas e perfis bioquímicos correspondentes

Testes/Cepas testadas	Testes/Cepas testadas
Udeniomyces pyricola BA01 (UFRGS - Paineira/Sup)	Leucosporidium scottii BA36 (Itapuã - Paineira/sup):
Rhodotorula glutinis v. glutinis BA02 (UFRGS - Paineira/sup)	Bensingtonia intermedia BA38 (Itapuã - Paineira/sup):
Kockovaeilla calophylli BA03 (UFRGS - Paineira/sup)	Rhodotorula glutinis var. glutinis BA41 (Itapuã - Paineira/sup):
Kockovaeilla calophylli BA09 (Itapuã - Bromélia/sup)	Sporobolomyces roseus BA42 (Itapuã - Paineira/sup):
Rhodotorula Aurantiaca BA11 (Itapuã - Figueira/sup)	Sporidiobolus pararoseus BA44 (Itapuã - Figueira/sup):
Rhodotorula aurantiaca BA12 (Itapuã - Figueira/inf):	Dioszegia hungarica BA47 (Itapuã - Figueira/sup):
Kockovaeilla calophylli BA16 (Itapuã - Figueira/sup):	Dioszegia hungarica BA48 (Itapuã - Figueira/sup):
Kondoa malvinella BA22: (Itapuã - Figueira/sup)	Fibulobasidium inconspicuum BA49 (Itapuã - Figueira/cima):
Fibulobasidium inconspicuum BA23 (Itapuã - Figueira/sup)	Sporidiobolus pararoseus BA50 (Itapuã - Figueira/sup):
Sporobolomyces nylandii BA26 (Itapuã - Figueira/sup):	Sporidiobolus salmonicolor BA51 (Itapuã - Figueira/sup):
Sporidiobolus johnsonii BA27 (Itapuã - Figueira/sup):	Fibulobasidium inconspicuum BA52 (Itapuã - Figueira/sup):
Sporobolomyces blumae BA28 (Itapuã - Figueira/sup):	Sporidiobolus pararoseus BA55 (Itapuã - Figueira/sup):
Tremella foliacea BA30 (Itapuã - Figueira/sup):	Pseudozyma fusiformata BA56 (Itapuã - Figueira/sup):
Aciculoconidium aculeatum BA35 (Itapuã - Bromélia/sup):	Bullera kunmingensis BA57 (Itapuã - Figueira/inf):
Creatina	Creatina
Creatinina	Creatinina
Etilamina	Etilamina
Lisina	Lisina
Nitrato	Nitrato
NaCl 10%	NaCl 10%
37°C	37°C
Glicose 50%	Glicose 50%

Bibliografia

- Barnett, J. A., Payne, R. W., Yarrow, A. **Yeasts: characteristics and identification**. Cambridge University Press, Cambridge. 1990. 811p.
- Ciriello, C. & Lachance, M. A. Copyright 1999-2001. **Yeast Compare** – Department of Plant Sciences, University of West Ontario.
- Campbell *et al.* Yeast Nuclear Envelope Subdomains With Distinct Abilities to Resist Membranes Expansion. *Molecular Biology of the Cell*, vol 17, p. 1768-1778. 2006.
- Carlie, M. J. & Watkinson, S. C. **The Fungi**. Academic Press. London, 1996. 498p.
- Centraalbureau voor Schimmelcultures – figura disponível disponível em <http://www.cbs.knaw.nl/yeast/Files/1/491-col+.JPG>
- Chuck, SL & Sande, MA. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. **The New England Journal of Medicine**, vol. 321, p.794-799. 1989.
- Cooke, R. C. & Rayner, A.D.M. **Ecology of Saprotrophic Fungi**. Longman. London, 1984. 429p.
- Fell, J. W. *Et al.*, Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, vol 50, p.1351-1371. 2000.

Feng-Yan, B. *et al.* *Sporobolomyces Yunnanensis* sp. nov., a Q-10(H₂)-containing yeast species with a close phylogenetic relationship to *Erythrobasidium hasegawianum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 5, p.231-235. 2001.

Fischer, M. *et al.* New information on the mechanism of forcible ascospore discharge from *Ascobolus immersus* **Fungal Genetics and Biology**, vol 41, p.698-707. 2004.

Klein, RS *et al.* Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. **The New England Journal of Medicine**, vol. 311, p.354-358. 1984.

Kurtzman, CP., Fell, J. W. **The Yeasts, A Taxonomic Study**. Ed. Elsevier, 4^a edição, 1998, 1005p.

Last, F. T., Price, D. Yeasts associated with living plants and their environs. In: **The yeasts, vol. 1 – Biology of the yeasts**. A. H. Rose & J. S. Harrissin (ed.). Academic Press. London, 1969, p. 183-218

Money, N. P. More g's than the space shuttle: ballistospore discharge. **Mycologia**, vol. 90, p.547-558. 1998.

Nakase, T. Classification of Ballistosporous Yeasts. **Seventh International Symposium on yeasts**. 1989

Nakase, T. Expanding world of ballistosporous yeasts: Distribution in the phyllosphere, systematics and phylogeny. **The Journal of General and Applied Microbiology**, vol. 46, p. 189-216. 2000.

Nakase, T. *et al.* *Sporobolomyces diospyroris* sp. nov., *Sporobolomyces lophatheri* sp. nov. and *Sporobolomyces pyrrosiae* sp. nov., three new species of ballistoconidium-forming yeasts in the *Agaricostilbum* lineage isolated from plants in Taiwan. **The Journal of General and Applied Microbiology**, vol. 51, p 277-286. 2005.

Rincón, A *et al.* Fission Yeast Rho5p GTPase is a Functional Parologue of Rho1p That Plays a Role in Survival of Spores and Stationary-Phase Cells. *Eukaryotic Cell*, Vol. 5, p. 435-446. 2006

Robert, V. & Szoke, S. 2003. BioloMICS: Biological Manager for Identification, Classification and Statistics. Versão 6.2. **BioAware**, Hannut, Bélgica

Robert, V. *et al.* 2005. CBS Yeasts database. **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, Utrecht, Holanda

Roberts, K. J., Prince George's Community College. Figura disponível em <http://academic.pg.cc.md.us/~kroberts/lecture/web/exoenzymes/exoenzymes.htm>

Rose M., Princeton University. Figura disponível em <http://www.molbio.princeton.edu/images/faculty/figures/rose1s.jpg>