
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**LEVEDURAS ISOLADAS DE NINHOS DE *ACROMYRMEX BALZANI* (HYMENOPTERA:
FORMICIDADE) DE ÁREAS DE CERRADO DO ESTADO DO TOCANTINS**

WEILAN GOMES DA PAIXÃO MELO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências biológicas (Área de Microbiologia Aplicada).

Rio Claro - 2014

LEVEDURAS ISOLADAS DE NINHOS DE *ACROMYRMEX BALZANI*
(HYMENOPTERA: FORMICIDADE) DE ÁREAS DE CERRADO DO ESTADO DO
TOCANTINS

WEILAN GOMES DA PAIXÃO MELO

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências
biológicas (Área de Microbiologia
Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca
Coorientadora: Prof. Dra. Paula Benevides de Moraes

Rio Claro
2014

595.796 Melo Weilan Gomes da Paixão
M528L Leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex balzani*
(Hymenoptera: Formicidae) de áreas de cerrado do Estado
do Tocantins / Weilan Gomes da Paixão Melo. - Rio Claro,
2014
161 f. : il., figs., gráfs., tabs. + 3 fots. + 3 Tabelas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Fernando Carlos Pagnocca
Coorientador: Paula Benevides de Moraes

1. Formigas. 2. Formigas cortadeiras. 3. Diversidade. 4.
Polissacarídeos vegetais. 5. Enzimas. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

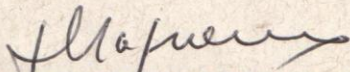
TÍTULO: LEVEDURAS ISOLADAS DE NINHOS DE ACROMYRMEX BALZANI (HYMENOPTERA: FORMICIDADE) DE ÁREAS DE CERRADO DO ESTADO DO TOCANTINS

AUTORA: WEILAN GOMES DA PAIXÃO MELO

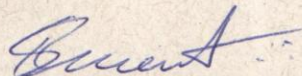
ORIENTADOR: Prof. Dr. FERNANDO CARLOS PAGNOCCA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. PAULA BENEVIDES DE MORAIS

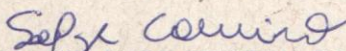
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



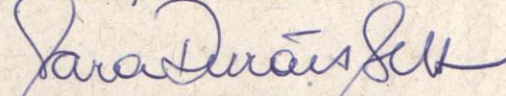
Prof. Dr. FERNANDO CARLOS PAGNOCCA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro



Prof. Dr. RAPHAEL SANZIO PIMENTA
Universidade Federal do Tocantins - UFT



Profa. Dra. SOLANGE CRISTINA CARREIRO
Universidade Federal do Tocantins - UFT



Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro



Prof. Dr. ODAIR CORRÊA BUENO
CEIS - Centro de Estudos de Insetos Sociais - IB Rio Claro

Data da realização: 25 de fevereiro de 2014.

*À minha mãe Marineide, meu querido
Thiago Gazoni, minhas irmãs Wilma e
Wélita e minha sobrinha Maria
Gabriela, pelo amor, confiança e
incentivo.*

Dedico

Para ser um membro imaculado de um rebanho de ovelhas, deve-se, antes de tudo, primeiro ser uma ovelha.

ALBERT EINSTEIN

Agradecimentos

À Deus por me iluminar em todos os dias da minha vida;

Ao meu orientador Dr. Fernando Carlos Pagnocca, pela orientação, oportunidade, apoio e ensinamentos durante todos esses anos;

À minha coorientadora Dra. Paula Benevides de Moraes por sempre confiar e acreditar em mim;

À meu querido amigo e companheiro Thiago Gazoni por todas as horas incansáveis de atenção, carinho e amor que sempre dedicou a mim;

À minha mãe e minhas irmãs que, mesmo de longe, me deram força e determinação para que eu não desistisse em nenhum momento;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área Microbiologia Aplicada) da UNESP (Rio Claro), agradeço pela oportunidade concedida. Também agradeço aos amigos da Pós-graduação pela companhia durante as aulas e, também, nas organizações do Simpósio de Microbiologia Aplicada;

Agradeço a todos os professores do programa de Microbiologia Aplicada, pelos conhecimentos passados;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo;

Agradeço a banca em nome da Dra. Solange Carreiro, Dra. Lara Sette, Dr. Raphael Pimenta e Dr. Odair Bueno por todas as contribuições ao meu trabalho;

Agradeço a todos meus amigos do C.E.I.S. pela companhia, risadas e colaboração, principalmente a Necis, Luciana, Sebastião, Olívia, Ita e Marcela;

Agradeço ao Dr. André Rodrigues pelas contribuições e conhecimentos na área de microbiologia;

Agradeço ao Dr. Vanderlei Martins pelo auxílio no sequenciamento de DNA das amostras e pelos conhecimentos passados nesta área;

Agradeço a família Gazoni (Roberto, Célia, Thiago, Thaís e Juliano) por ser a minha família aqui em São Paulo. Agradeço todo o carinho e por sempre fazer eu me sentir um pouquinho mais perto de casa;

Sou muito grata por conviver com amigos tão especiais que fazem os meus dias melhores: Amarilis, Miagui, Beto, Octávio, Fabrício, Cacá, Diogo, Tati, Bernardo, Ives, Sadala, Vivi, Mariana, Dioguinho, Bárbara, Rafael, Tássio, Franco, Túlio, Bairral, Allison, etc. e tantas outras pessoas que passaram em minha vida deixando sempre uma sementinha de bondade;

Aos amigos do laboratório de Microbiologia: Silvio, Virgínia, Ife, Daniela, Daiane, Maria Carolina, Caio, Dirce, Samuel, Francisco, Noemi, Ana Paula, Lucas, Lídia, Tássia, Danilo, Rafael, Fábio, Aline, Paula, Tatiana, Thais, Mara, Sandra, Dra. Derlene Attili de Angelis, Melina e Marcela pela companhia, ajuda e amizade;

Às minhas queridas amigas, que são a extensão da minha família: Denise, Laciene, Fran, Zenilde e Chrys;

Aos amigos que estão distante, mas que nunca me esquecem: Deusiano, Alberico, Cristiane, João Vitor, Fabrício, Amaraina, Licia, Anelise, Daiane, Jil-Vanny, Danielle, Gustavo, meu muito obrigado;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho;

“Ser irmão é entrelaçar os destinos e ouvir a voz do semelhante que chama, que pede, que reclama e que chora. Ser irmão é ser feliz com a felicidade do outro, é rir com as alegrias do próximo e ser solidário nas boas e nas más horas da vida”. A vocês, meus irmãos/amigos, minha gratidão de coração!

Resumo

As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* mantêm uma associação mutualística com o fungo basidiomiceto *Leucoagaricus gongylophorus*, cultivado para alimento, o qual é responsável pela produção de enzimas extracelulares que degradam o material vegetal transportado para o interior dos ninhos. Além do fungo mutualista, uma ampla microbiota constituída por fungos filamentosos, bactérias e leveduras está presente nos ninhos e também contribui para a degradação dos tecidos vegetais. Foi caracterizada a comunidade de leveduras do jardim de fungo e material de descarte de ninhos da formiga cortadeira *Acromyrmex balzani* encontrados em ambiente preservado e perturbado de cerrado em Palmas, Tocantins. A habilidade destas leveduras para produzir enzimas extracelulares também foi investigada. Amostras de vinte e quatro ninhos, sendo 14 de área preservada e 10 de área perturbada foram coletadas, dos quais foram isoladas 720 leveduras, compreendendo 52 espécies distribuídas em 20 gêneros. A riqueza e a diversidade de espécies de área preservada foram maiores em comparação com a área perturbada, assim como a diversidade no material de descarte foi maior em relação ao jardim de fungo. A espécie de levedura mais prevalente foi *Cryptococcus laurentii* com 132 isolados, seguida de *Trichosporon mycotoxinivorans*, com 61 isolados. As leveduras basidiomicetas foram prevalentes nos ninhos, tanto nos jardins de fungo quanto no material de descarte. Entre os fungos ascomicetos, predominaram espécies de *Aureobasidium* e *Meyerozyma*. Ainda, foi encontrado novas espécies dos gêneros *Starmerella* e *Bullera*, baseado nas análises das sequências da região D1/D2 da LSU do rRNA. Setecentos e onze estirpes das 720 recuperadas foram testadas quanto à capacidade de produção de amilase, celulase, ligninases, lipase, xilanase, pectato-liase e poligalacturonase. Também foram realizados testes fisiológicos quanto à habilidade de assimilação de glicose, celobiose, ácido galacturônico, maltose e xilose pelas estirpes isoladas desses ambientes. Aproximadamente 95% das estirpes testadas apresentaram produção de pelo menos uma enzima. Xilanase foi detectada em 64,4% do total de estirpes, enquanto celulase, poligalacturonase, pectato-liase e lipase foram produzidas por 52%, 45,2%, 30,6% e 26,1% das estirpes, respectivamente. As enzimas amilase (10,4%), ligninase (8%) e lacase (2,4%) foram produzidas com menor frequência. A maior produção de celulase, xilanase, poligalacturonase, pectato-liase e lipase foi observada entre os basidiomicetos. Quanto à assimilação de açúcares simples, gerados na degradação dos compostos vegetais, 100% das estirpes assimilaram glicose, 88,3%, 87,6%, 82,5% e 75,6%, assimilaram xilose, celobiose, maltose e ácido galacturônico, respectivamente. Ensaio enzimáticos quantitativos foram realizados com 17 estirpes de *Pseudozyma* spp. e 12 estirpes de *Sporisorium* spp., as quais haviam apresentado os maiores halos de degradação nos ensaios qualitativos. Duas estirpes (*Pseudozyma aphidis* TO 189 e *Sporisorium chrysopogonis* TO 027) exibiram a maior atividade de pectato-liase (0,747 U/mL e 0,855 U/mL, respectivamente) e a estirpe *S. chrysopogonis* TO 027 também apresentou a maior atividade de poligalacturonase (0,797 U/mL). Estes resultados revelaram que a diversidade de leveduras em ninhos de *A. balzani* é alta e que estas produzem diversas enzimas que podem contribuir para a degradação do material vegetal no interior dos ninhos, além de uma fonte de enzimas com potencial aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: Formigas cortadeiras, diversidade, polissacarídeos vegetais, enzimas.

Abstract

Leafcutter ants of the genera *Atta* and *Acromyrmex* maintain a mutualism with basidiomycetous fungus *Leucoagaricus gongylophorus* cultivated for food, which is responsible for the production of extracellular enzymes that degrade plant material transported into the nests. Besides the mutualistic fungus, a diverse microbiota comprising filamentous fungi, yeasts and bacteria is present in the nest and also contribute to the degradation of plant tissues. The yeast community of the fungus garden and waste material from nests of the leaf-cutting ant *Acromyrmex balzani* in preserved and disturbed areas of cerrado in Palmas, Tocantins was characterized and the ability of these strains to produce extracellular enzymes was investigated. Twenty-four nests (14 in preserved environment and 10 in disturbed environment) were sampled, and a total of 720 yeast isolates was obtained, comprising 52 species belonging to 20 genera. The richness and diversity of species in preserved environment were higher compared to the disturbed environment, as well as diversity in waste material was higher compared to the fungus garden. The most prevalent species was *Cryptococcus laurentii*, with 132 isolates, followed by *Trichosporon mycotoxinivorans*, with 61 isolates. The basidiomycetous yeasts were prevalent in the nests of *A. balzani*, both in fungus gardens as with the discarded material. Prevalent ascomycetous were *Aureobasidium* and *Meyerozyma*. Based on sequence analysis of the D1/D2 region of LSU rRNA putative new species were found of the genera *Starmerella* and *Bullera*. Seven hundred and eleven strains of the 720 recovered ones were tested for their ability to produce amylase, cellulase, ligninases, lipase, xylanase, pectate lyase and polygalacturonase. Physiological tests for their ability to assimilate glucose, cellobiose, galacturonic acid, maltose and xylose through isolated strains of these environments were also conducted. About 95% of the strains tested showed production of at least one enzyme. Xylanase was found in 64.4% of the strains, while cellulase, polygalacturonase, pectate lyase and lipase were produced by 52%, 45.2%, 30.6% and 26.1% of the strains, respectively. Amylase (10.4%), ligninase (8%) and laccase (2.4%) were produced with less frequency. The higher production of cellulase, xylanase, polygalacturonase, pectate lyase and lipase was observed among basidiomycetous yeasts. Regarding the assimilation of simple sugars generated in the degradation of plant compounds, 100% of the strains assimilated glucose, 88.3%, 87.6%, 82.5% and 75.6%, assimilated xylose, cellobiose, maltose and galacturonic acid, respectively. Quantitative enzyme assays were performed with 17 strains of *Pseudozyma* spp. and 12 strains *Sporisorium* spp., which had presented the highest degradation halos. Two strains (*Pseudozyma aphidis* TO 189 and *Sporisorium chrysopogonis* TO 027) showed the highest pectate lyase activity (0.747 U/ml and 0.855 U/ml, respectively) and the strain *S. chrysopogonis* TO 027 also showed the highest activity for polygalacturonase (0.797 U/mL). These findings revealed that the yeast diversity in *A. balzani* nests is high and they produce several enzymes that could contribute to the degradation of the plant material inside the nests besides being a source of enzymes with potential biotechnological applications.

Keywords: Leafcutter ants, diversity, plant polysaccharides, enzymes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 As formigas cortadeiras.....	12
2.2 Fungicultura das formigas cortadeiras.....	13
2.3 Fungos antagonistas nos ninhos de formigas cortadeiras.....	15
2.4 Bactérias no jardim de fungo das formigas.....	15
2.5 Bactérias no exoesqueleto das formigas.....	17
2.6 Leveduras nos jardins de fungo de Attini.....	18
2.7 Degradação dos polissacarídeos vegetais nos jardins de fungos.....	20
2.8 Estrutura da parede celular vegetal.....	22
2.9 Aplicações biotecnológicas de enzimas extracelulares produzidas por leveduras.....	24
3 CAPÍTULO 1 - Leveduras isoladas de ninhos da formiga cortadeira <i>Acromyrmex balzani</i> Emery área de cerrado em Palmas, Tocantins, Brasil.....	28
3.1 Resumo.....	29
3.2 Introdução.....	30
3.3 Material e Métodos.....	31
3.3.1 Coleta dos ninhos.....	31
3.3.2 Isolamento e caracterização das leveduras.....	31
3.3.3 Identificação polifásica das leveduras.....	32
3.3.4 Análise de diversidade e estrutura da comunidade.....	33
3.4 Resultados.....	34
3.5 Discussão.....	40
4 CAPÍTULO 2 - Enzimas extracelulares produzidas por leveduras isoladas de ninhos de <i>Acromyrmex balzani</i> Emery.....	45
4.1 Resumo.....	46
4.2 Introdução.....	47
4.3 Material e Métodos.....	48
4.3.1 Detecção de enzimas hidrolíticas extracelulares.....	48
4.3.2 Assimilação de fontes de carbono.....	50
4.3.3 Ensaio enzimáticos Pectinases.....	51

4.3.4 Análises dos dados.....	52
4.4 Resultados.....	52
4.4.1 Ensaio enzimático Pectinases.....	56
4.5 Discussão.....	60
5 CAPÍTULO 3 - <i>Starmerella aceti</i> f.a., sp. nov., a new ascomycetous yeast species isolated from fungus garden of the leafcutter ant <i>Acromyrmex balzani</i>	66
5.1 Abstract.....	68
5.2 Introduction.....	68
5.3 Material and Methods.....	69
5.4 Species delineation and ecology.....	71
5.5 Emendation of the genus <i>Starmerella</i> Rosa & Lachance.....	74
5.6 Description of <i>Starmerella aceti</i> Melo, Morais & Pagnocca sp. nov.....	74
5.7 Acknowledgments.....	75
5.8 References.....	76
5.9 Figure legends.....	81
6 CAPÍTULO 4 - Descrição de <i>Bullera palmaensis</i> sp. nov. isolada do jardim de fungo de ninho de <i>Acromyrmex balzani</i>	85
6.1 Resumo.....	86
6.2 Introdução.....	87
6.3 Material e Métodos.....	88
6.3.1 Isolamento das leveduras.....	88
6.3.2 Caracterização morfológica e fisiológica.....	88
6.3.3 Amplificação e sequenciamento do DNA e análise filogenética.....	89
6.4 Resultados e discussão.....	90
6.5 Descrição de <i>Bullera palmaensis</i> TO 115 Melo, Morais e Pagnocca sp. nov.	93
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
REFERÊNCIAS	98
APÊNDICES	119

1 INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras *Atta* e *Acromyrmex* são conhecidas por apresentarem um mutualismo obrigatório com o fungo basidiomiceto *Leucoagaricus gongylophorus*, o qual é utilizado como alimento. Desde os primeiros estudos desse mutualismo é sabido que, além do fungo mutualista, outros micro-organismos estão associados aos ninhos desses insetos incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Apesar de alguns estudos relatarem sua ocorrência, pouco se conhece sobre o papel que as leveduras desempenham nos ninhos. Alguns estudos sugerem que a ocorrência desses micro-organismos é apenas transitória, sendo passivamente transportados no corpo das formigas ou no substrato coletado por esses insetos. Por outro lado, outros estudos sugerem que as leveduras desempenham funções importantes nos ninhos dessas formigas. Portanto, permanece um campo aberto para se explorar as funções desses micro-organismos.

Dentre os papéis sugeridos, alguns autores apontam que as leveduras presentes nos jardins de fungos são consideradas antagonistas, podendo auxiliar na inibição de micro-organismos indesejáveis à cultura do fungo mutualista, bem como participar na degradação do substrato vegetal coletado pelas operárias, fornecendo nutrientes para o fungo mutualista. Contudo, poucos são os estudos que testaram a capacidade das leveduras em degradar o material vegetal existente nos ninhos das formigas cortadeiras. Um estudo recente indica que as leveduras recuperadas de ninhos de *Atta texana* e espécies de *Acromyrmex*, apresentam a capacidade de produzir várias enzimas que atuam na degradação do substrato vegetal, como celulasas, pectinases, xilanases, entre outras, tornando os nutrientes resultantes da degradação disponíveis para o fungo mutualista e as formigas.

Embora já existam algumas informações sobre as espécies de leveduras associadas com formigas da tribo Attini, incluindo-se a descrição de algumas espécies, ainda há muito a fazer nesse campo de investigação. No entanto, não existem relatos de estudos sobre a composição e estrutura da comunidade de leveduras associadas à formiga cortadeira *Acromyrmex balzani* que ocorre no cerrado brasileiro, particularmente, no Estado do Tocantins.

O presente trabalho teve o objetivo de estudar a comunidade de leveduras recuperadas de ninhos de *A. balzani* no município de Palmas, Tocantins, e está dividido em quatro capítulos. Ainda, na primeira parte foi apresentada uma revisão com os

aspectos básicos da associação formiga cortadeira-fungo, além das pesquisas envolvendo as leveduras encontradas nos jardins de fungo e as hipóteses sobre os possíveis papéis desses micro-organismos.

No capítulo 1, o objetivo foi avaliar a composição de leveduras de ninhos de *A. balzani* em ambientes preservado e perturbado de cerrado. Índices de diversidade e similaridade foram aplicados para avaliar a diversidade de leveduras encontradas nos jardins de fungo e material de descarte e a semelhança entre a comunidade de leveduras desses dois ambientes.

No capítulo 2, os estudos foram no sentido de verificar a produção de enzimas capazes de degradar polímeros presentes na parede celular vegetal, encontrados nos jardins de fungos e no material descartado, e a capacidade de assimilação dos compostos resultantes da hidrólise desses polímeros.

No capítulo 3 e 4, foi apresentada a descrição de duas novas espécies de leveduras descobertas neste estudo. Uma espécie nova chamada de *Starmerella aceti*, recuperada do jardim de fungo de *A. balzani* em ambiente perturbado de cerrado foi descrita no capítulo 3. No capítulo 4, foi realizada a descrição de *Bullera palmaensis*, isolada de jardim de fungo de ambiente preservado.

No geral, os resultados do presente trabalho demonstraram que nos ninhos de *A. balzani* é encontrada uma elevada diversidade de leveduras, muitas delas com potencial para desenvolver um papel ecológico nos ninhos. Adicionalmente, este estudo demonstrou o potencial das leveduras isoladas de ninhos de *A. balzani* em ambiente preservado e perturbado de cerrado como fontes de enzimas industrialmente relevantes para fins biotecnológicos. Ainda, a descrição de espécies novas contribui para o conhecimento da diversidade de leveduras.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 As formigas cortadeiras

As formigas pertencem à família Formicidae, dentro da ordem Hymenoptera que também inclui abelhas e vespas. Trata-se de uma das grandes ordens de insetos juntamente com Coleoptera, Lepidoptera e Diptera, todas com mais de 100.000 espécies descritas em todo mundo (MASON et al., 2006). Triplehorn e Johnson (2005) apresentam números com cerca de 115.000 espécies descritas e estimativas de 600.000 espécies para Hymenoptera. Para a região Neotropical, Fernández e Sharkey (2006) reconhecem 76 famílias e 24.000 espécies, número que acreditam ser muito maior.

As formigas são boas candidatas para uso como bioindicadores em ambientes terrestres porque apresentam ampla distribuição geográfica, são localmente abundantes, participam de todos os níveis tróficos, são facilmente amostradas e separadas em morfoespécies, além de serem susceptíveis a mudanças climáticas (SILVESTRE; SILVA, 2001; SILVESTRE et al., 2003).

As formigas vivem e se alimentam das mais diversas formas. Algumas formigas apreciam substâncias açucaradas cuja dieta inclui o néctar e a seiva de muitas plantas, enquanto outras se alimentam dos fungos que cultivam no interior de seus ninhos. As formigas cultivadoras de fungos estão entre os poucos animais que utilizam fungos simbioses cultivados nos ninhos como fonte de alimento, dividindo essa característica com poucos taxa de besouros e cupins (WILSON, 1987). Entre os componentes mais característicos da fauna neotropical, acham-se as formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns). Estas formigas são dominantes na maioria das comunidades vegetais neotropicais (MARICONI, 1970), e podem apresentar colônias com várias câmaras de fungos subterrâneas, um elevado número de indivíduos (podendo chegar a milhões de operárias) e as operárias geralmente são polimórficas, apresentando vários tamanhos, dentre eles: operárias de tamanho máximo, médio e mínimo (GONCALVES, 1961), sendo que cada uma pode apresentar uma função específica na colônia (HOLLDÖBLER; WILSON, 1990; BASS; CHERRETT, 1994; BOT et al., 2001).

A tribo de formigas Attini compreende 15 gêneros: *Mycetarotes*, *Myrmicocripta*, *Mycocepurus*, *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycetosoritis*, *Mycetophylax*, *Paramycetophylax*, *Kalathomyrmex*, *Mycetagroicus*, *Trachymyrmex*, *Sericomyrmex*, *Pseudoatta*, e as Attini superiores cortadoras de folhas, grupo este representado pelos

gêneros *Acromyrmex* e *Atta* (SCHULTZ; MEIER, 1995; BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2001; KLINGENBERG; BRANDÃO, 2009). *Atta* e *Acromyrmex* utilizam folhas frescas, brotações e flores como substrato para o cultivo de seu fungo, e os demais gêneros utilizam, principalmente, matéria orgânica morta, fezes e carcaças de insetos para o mesmo fim (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

O gênero *Acromyrmex* possui vinte e cinco espécies (FERNÁNDEZ; OSPINA, 2003) que se caracterizam por apresentar um polimorfismo acentuado das operárias, com exemplares de diversos tamanhos ocorrendo num mesmo ninho. Os machos e as fêmeas, sempre alados, são bastante diferentes das operárias (GONÇALVES, 1961). Os espinhos da cabeça e do tórax são características sistemáticas muito importantes, mas as proporções podem variar de acordo com as colônias. Indivíduos com assimetria bilateral da cabeça são comuns (DIEHL; CAVALLI-MOLINA; ARAUJO, 2002).

Acromyrmex é um gênero que possui ampla distribuição geográfica, ocorre em todo o continente americano, exceto no Canadá, algumas ilhas da América Central e no Chile (MARICONI, 1970). No Brasil, ocorre em todos os Estados e territórios continentais (DELLA LUCIA, 1993). Essas cortadeiras vêm chamando atenção crescentemente devido ao estrago que causam nas lavouras (DIEHL; CAVALLI-MOLINA; ARAUJO, 2002).

A espécie *Acromyrmex balzani*, especializada no corte de gramíneas, causa danos severos em razão do corte da pastagem rente ao solo e pelo fato de carregarem as sementes das gramíneas, dificultando a formação do pasto (DELLA LUCIA, 1993). Esta espécie nidifica em locais abertos, ensolarados e em solos de pouca umidade (ANDRADE, 1991), apresentando ninhos caracterizados por uma torre construída de fragmentos de palhas e outros resíduos vegetais que os protegem. Nas proximidades das torres encontram-se montículos de terra de forma semicircular e ao lado, o lixo trazido do interior dos ninhos (SILVA et al., 2010) (Apêndice C). Pimenta et al. (2007) verificaram que os ninhos dessa formiga apresentam quatro ou cinco câmaras, sempre superpostas, com profundidade máxima de 95,0 cm.

2.2 Fungicultura das formigas cortadeiras

A fungicultura das formigas Attini originou-se cerca de 50 milhões de anos atrás na América do Sul (CHAPELA et al., 1994; MUELLER et al., 2001; SCHULTZ; BRADY, 2008; POULSEN et al., 2009). O fungo cultivado pelas formigas Attini

derivadas *Atta* spp. e *Acromyrmex* spp. pertence à espécie *Leucoagaricus gongylophorus* (Tribo: Leucocoprineae / Família: Lepiotaceae/ Basidiomycota: Agaricales) (CHAPELA et al., 1994; MUELLER et al., 1998; VILLESSEN et al., 2004).

Estudos têm mostrado a coevolução das formigas e seus fungos simbiontes, que resultou em um alto nível de interdependência, de modo que nenhum dos dois organismos pode viver separadamente (MARTIN, 1992; MUELLER et al., 2001). As formigas cuidam do jardim de fungos e evitam a proliferação de micro-organismos contaminantes através de diversas estratégias de higiene (CURRIE; STUART, 2001; LITTLE et al., 2003; LITTLE et al., 2006; MANGONE; CURRIE, 2007), enquanto o fungo degrada e cresce sobre o material vegetal, proporcionando nutrientes e enzimas às formigas (MARTIN, 1970; RONHEDE et al., 2004; SILVA et al., 2004; SCHIOTT et al., 2008).

Além do fungo mutualista outros micro-organismos podem ser frequentemente encontrados nos jardins de fungos desses insetos. Existem relatos de bactérias (BACCI JÚNIOR et al., 1995; VAN BORM et al., 2002; POULSEN et al., 2007; MENDES et al., 2013; SCOTT et al., 2010), leveduras (CRAVEN et al., 1970; FISHER et al., 1996; CARREIRO et al., 1997, 2002; LITTLE; CURRIE, 2007, 2008; PAGNOCCA et al., 2008, 2010; RODRIGUES et al., 2009, MENDES et al., 2012) e fungos filamentosos (LUCIANO et al., 1995; FISHER et al., 1996; VAN BORM et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005a,b; PAGNOCCA et al., 2008; HAEDER et al., 2009; OH et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010) presentes nos jardins desses insetos. Esses micro-organismos foram considerados por muito tempo contaminantes da fungicultura das formigas Attini (POULSEN et al., 2003). No entanto, a função da microbiota associada à matriz do jardim é em grande parte desconhecida. Os micro-organismos invasores adicionais poderiam ser prejudiciais quando encontrados em alta frequência em jardins de fungo (FISHER, 1996; POULSEN; CURRIE, 2006), neutros e comensais transitórios com efeitos não significativos na homeostase do jardim (RODRIGUES, et al., 2008), ou componentes auxiliares potencialmente benéficos com funções que servem para a produção de enzimas ou antibióticos (BACCI JÚNIOR, et al., 1995; MULLER, et al., 2005; RODRIGUES, et al., 2008, SUEN et al., 2010; MENDES et al., 2012).

2.3 Fungos antagonistas nos ninhos de formigas cortadeiras

Os jardins de fungos de formigas da tribo Attini são continuamente ameaçados por diferentes tipos de micro-organismos: fungos antagonistas aos jardins de fungo como *Cunninghamella elegans*, *Syncephalastrum racemosum* e *Trichoderma harzianum* (fungos saprófitas comumente encontrados em ninhos de formigas Attini de laboratório ou de campo) que são levados pelas formigas com o material vegetal que elas recolhem ou são adquiridos a partir do solo (RODRIGUES et al., 2005, 2008). Sem dúvida, o principal agente patogênico reconhecido até agora pertence ao gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales) (CURRIE et al., 1999a; CURRIE, 2001a), o qual possui duas espécies descritas até o momento: *Escovopsis aspergilloides* encontrado em ninhos de *Trachymyrmex ruthae* em Trinidad e Tobago (SEIFERT et al., 1995) e *Escovopsis weberi* encontrado em ninhos de *Atta* sp. no Brasil (MUCHOVEJ; DELLA LUCIA, 1990).

Fungos do gênero *Escovopsis* são encontrados nos jardins de quase todas as formigas Attini (CURRIE et al., 1999a). Quando presentes, esses fungos podem ocasionar um decréscimo no acúmulo de biomassa do jardim, diminuição na produção de pupas, larvas e operárias, levando assim a um retardo no crescimento da colônia (CURRIE, 2001b). *Escovopsis* é um fungo micoparasita, que se alimenta indiretamente das hifas do fungo mutualista (REYNOLDS; CURRIE, 2004), pelo qual apresenta quimiotaxia positiva, em que o fungo mutualista libera substâncias que são prontamente reconhecidas pelo *Escovopsis* (GERARDO et al., 2006).

2.4 Bactérias no jardim de fungo das formigas

As bactérias nos jardins de fungos sempre foram consideradas contaminantes que estão presentes num local (substrato) onde supostamente não deveriam estar, uma vez que a limpeza prévia das folhas pelas operárias, o pH baixo e a presença de compostos antimicrobianos secretados pelas operárias não são favoráveis ao seu desenvolvimento (PAGNOCCA et al., 2011).

Craven et al. (1970) encontraram bactérias no material de descarte de ninhos de *Acromyrmex octospinosus* e *Atta cephalotes*. Kermarrec et al. (1986), em seus estudos com ninhos de *A. laevigata*, confirmaram a presença de bactérias no jardim de fungo e identificaram pelo menos seis espécies de *Bacillus*.

Alguns estudos sugerem que as bactérias não são apenas transitórias no jardim de fungo e no material descartado (SCOTT et al., 2010), mas que podem desempenhar funções essenciais para os ninhos das formigas da tribo Attini (PINTO-TOMÁS et al., 2009).

Os ninhos de *A. sexdens* foram analisados do ponto de vista da atividade bioquímica por alguns autores, os quais constataram que tanto bactérias como leveduras apresentaram atividade proteolítica, amilolítica e pectinolítica (BACCI JÚNIOR et al., 1995; CARREIRO et al., 1997; CARREIRO, 2000; RIBEIRO, 2000; SILVA et al., 2006; MENDES et al., 2012).

Essas bactérias provavelmente estão participando de uma forma bastante positiva na simbiose, não apenas facilitando a colonização do substrato pelas hifas do fungo, mas também gerando compostos (açúcares) mais simples e assimiláveis pelas formigas (PAGNOCCA et al., 2011). Ribeiro (2000) comprovou a capacidade de algumas bactérias de utilizar os produtos de hidrólise dos polissacarídeos vegetais, tais como glicose, maltose, celobiose, xilose, arabinose e ácido galacturônico. Ainda, Pinto-Tomás et al. (2009) observaram que bactérias presentes nos jardins de fungo são capazes de fixar nitrogênio em elevadas taxas.

Quanto à capacidade de ataque enzimático aos polissacarídeos vegetais presentes no jardim de fungos, Suen et al. (2010) mostraram que a degradação de alguns compostos vegetais como celulose, por exemplo, pode ser proveniente de uma complexa comunidade microbiana ali existente, incluindo as bactérias.

Foi observado que bactérias do gênero *Burkholderia* encontradas em jardins de fungos de ninhos de campo de *A. sexdens rubropilosa* secretam compostos que inibem a germinação de esporos de *Escovopsis* sp. e do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (SANTOS et al., 2004). No entanto, essa ocorrência foi observada em apenas uma localidade geográfica e sua extensão dentre as formigas cortadeiras precisa ser determinada.

Scott et al. (2010) avaliaram a estrutura das comunidades microbianas através da análise de lipídeos e observaram que os jardins de fungo (tanto de ninhos de campo como de laboratório) de várias espécies de cortadeiras abrigam comunidades semelhantes. O mesmo ocorre para o material do depósito de descartes de ambos os tipos de colônias. Assim, as comunidades bacterianas nesses substratos são compostas por uma combinação de espécies que, aparentemente, não varia segundo a origem da colônia.

2.5 Bactérias no exoesqueleto das formigas

A presença de actinobactérias foi observada em vários gêneros de formigas da tribo Attini, vivendo na cutícula das operárias. Inicialmente descritas como *Streptomyces* sp. (CURRIE et al., 1999b), essas bactérias filamentosas são pertencentes ao gênero *Pseudonocardia* e são encontradas nas cutículas das operárias, em cavidades denominadas “fóveas” (CURRIE et al., 1999b; CURRIE et al., 2003; CAFARO; CURRIE, 2005; CURRIE et al., 2006). No entanto, actinobactérias não estão somente presentes na cutícula. Alguns trabalhos mostram a presença destas bactérias em jardins de fungo (POULSEN et al., 2003, MUELLER et al., 2008), *pellet* da cavidade infrabucal de rainhas (MUELLER et al., 2008) e de operárias (LITTLE et al., 2006).

Em formigas do gênero *Atta*, *Pseudonocardia* sp. é raramente encontrada (ZHANG et al., 2007) ou pode estar completamente ausente (CURRIE et al., 1999b; MUELLER et al., 2008).

Inicialmente foi atribuído a essas bactérias o papel de produzir substâncias específicas para inibir *Escovopsis* sp. e ao mesmo tempo estimular o desenvolvimento do fungo simbiote (CURRIE et al., 1999b; CURRIE, 2001a).

Oh et al. (2008) isolaram a bactéria *Pseudonocardia* sp. da cutícula de *Apterostigma dentigerum* e comprovaram a inibição do crescimento de *Escovopsis* proveniente da mesma colônia. O composto inibidor do fungo parasita foi identificado como dentigerumicina (OH et al., 2009). Os mesmos autores demonstraram que dentigerumicina também é ativa contra outros micro-organismos, incluindo várias estirpes de *Candida albicans*, mostrando que o composto não possui especificidade para *Escovopsis* sp. Ainda, Haeder et al. (2009) isolaram bactérias dos gêneros *Pseudonocardia*, *Streptomyces* e *Dermacoccus* de pequenas porções do jardim e do exoesqueleto de formigas *Acromyrmex octospinosus*, *A.volcanus* e *A. echinator*, e observaram que *Streptomyces* sp. foi a bactéria que secretou um composto que inibiu o crescimento do fungo *Escovopsis* sp., identificado como candidicina. Além disso, Ribeiro (2000) isolou várias actinobactérias da cutícula de operárias de *Atta sexdens*, identificando-as como *Streptomyces setonii* e demonstrou que também possuem amplo espectro de atividade antimicrobiana. Mais recentemente, Mendes et al. (2013) observaram que sete estirpes de actinobactérias isoladas de formigas do gênero *Trachymyrmex* inibiram o crescimento de algumas espécies de *Candida*, e que

Streptomyces sp. (TD025) apresentou potente espectro de inibição através das moléculas bioativas urauquimicinas A e B.

Pseudonocardia e uma diversidade de actinobactérias não-*Pseudonocardia* foram isoladas do exoesqueleto de formigas Attini, principalmente do gênero *Trachymyrmex* (MENDES, 2010) e *Acromyrmex subterraneus brunneus* (ZUCCHI et al., 2010). Nesses trabalhos, os autores verificaram que as actinobactérias não-*Pseudonocardia* apresentaram maior nível de inibição sobre *Escovopsis* sp., novamente sugerindo que outros micro-organismos além de *Pseudonocardia* sp. seriam importantes para o controle do parasita *Escovopsis*.

2.6 Leveduras nos jardins de fungo de Attini

A presença de leveduras junto às espécies de Attini tem sido relatada por vários autores. Craven et al. (1970) observaram grande quantidade de células de leveduras nos jardins de fungos das formigas cortadeiras *Atta cephalotes* e *Acromyrmex octospinosus*. Mais tarde, Angelis et al. (1983), relataram a existência de diferentes espécies de leveduras em ninhos de *A. sexdens rubropilosa* e *Atta laevigata* as quais foram identificadas como sendo dos gêneros *Candida*, *Rhodotorula* e *Kloeckera*. Fisher et al. (1996) caracterizaram a microbiota presente em ninhos de *Atta cephalotes* e mostraram que ela é formada pelo fungo mutualista, por leveduras e por outros micro-organismos. Além disso, sugeriram que as leveduras são incorporadas nos jardins de fungos com o material foliar carregado pelas formigas.

Pagnocca et al. (1996) encontraram leveduras em jardins de fungo e depósito de lixo em ninhos de laboratório de *Atta sexdens rubropilosa*, sugerindo que várias partes dos ninhos seriam ambientes propícios para esse grupo de micro-organismos. Esses autores compararam a abundância de leveduras quando foram oferecidas folhas de *Eucalyptus alba* ou *Sesamum indicum* (gergelim). Os resultados indicaram que o consumo de folhas de *Sesamum indicum*, o qual impacta de forma negativa as colônias, resultou em um expressivo aumento populacional de leveduras e bactérias nos jardins de fungos, indicando que a comunidade microbiana existente nos ninhos saudáveis deve se auto-regular.

Um dos primeiros estudos sistemáticos de leveduras em jardins de Attini foi realizado por Carreiro et al. (1997), que investigaram as leveduras de ninhos de laboratório de *A. sexdens rubropilosa*. Os autores isolaram leveduras do jardim de

fungo, do depósito de lixo, do corpo das formigas, das folhas que as operárias coletavam para o forrageamento e do fundo das câmaras onde ficam estocados os jardins de fungos, e encontraram sete gêneros de leveduras em jardins de formigas cortadeiras e no material descartado produzido pelas colônias, incluindo uma ampla distribuição do gênero *Candida*, sendo que as espécies dominantes foram identificadas fisiologicamente como *Candida homilentoma*, *Debaryomyces hansenii* e *Torulasporea delbrueckii*. Os autores propuseram que as leveduras podem ser introduzidas nos ninhos pelas próprias operárias, as quais podem adquiri-las no contato com os diversos tipos de materiais no ato de forragear.

Leveduras também foram encontradas na cavidade infrabucal de *A. texana* (RODRIGUES et al., 2009) e *A. laevigatta*, bem como sobre o exoesqueleto de fêmeas aladas (iças virgens) de *A. laevigatta* e *A. capiguara* mostrando que vários microorganismos, além do fungo simbiote, são dispersados durante a revoada (PAGNOCCA et al., 2008).

Esses estudos contribuíram para a descrição de espécies novas a partir de ninhos de formigas Attini, destacando-se *Cryptococcus haglerorum* (MIDDELHOVEN et al., 2003) e *Sympodiomyces attinorum* (= *Blastobotrys attinorum*), isoladas de ninhos de *A. sexdens rubropilosa* (CARREIRO et al., 2004) e *Trichosporon chiarellii*, descrita de um ninho da formiga *Myrmicocrypta camargoi* (PAGNOCCA et al., 2010).

Vários papéis têm sido sugeridos para as leveduras nos jardins de fungo de formigas cortadeiras. Um desses papéis pode ser a manutenção da própria comunidade de leveduras através da produção de toxinas ‘killer’ (micocinas) por algumas estirpes de leveduras (CARREIRO et al., 2002). Rodrigues et al. (2009) estudaram a comunidade de leveduras encontradas em jardins de formigas *A. texana* e realizaram ensaios de antagonismo dessas leveduras frente a microfungos isolados de diferentes espécies de formigas, incluindo os fungos *Beauveria bassiana*, *Syncephalastrum racemosum* e *Escovopsis* sp. Os autores sugeriram que algumas leveduras podem agir sinergicamente com as actinobactérias suprimindo esses microfungos prejudiciais aos formigueiros, sendo esse mais um dos possíveis papéis das leveduras nos jardins de fungos dessas formigas.

Little e Currie (2007) descreveram o que eles consideraram o quinto simbiote em associação com as formigas Attini. Trata-se de uma levedura negra (“black yeast”), relacionada com o gênero *Phialophora* encontrada nas cutículas das operárias das formigas *Apterostigma*, no mesmo local onde são geralmente encontradas as

actinobactérias, que ocasiona impacto negativo e de forma indireta na simbiose entre as formigas Attini e o fungo mutualista. Os autores sugerem que possivelmente essas leveduras agiriam como um parasita, desestabilizando a associação entre formiga – *Pseudonocardia*. Nesse ponto, tais leveduras utilizariam as actinobactérias, ou algum produto por elas gerado, como fonte de nutrientes, ocasionando um impacto negativo na simbiose por interferir na ação protetora das bactérias em suprimir os fungos danosos à simbiose aos jardins de fungos (LITTLE e CURRIE, 2008).

Recentemente, Mendes et al. (2012) investigaram o potencial de leveduras associadas a formigas cortadeiras *Atta texana* e *Acromyrmex* spp., em produzir enzimas capazes de hidrolisar os polissacarídeos presentes na parede celular vegetal. Um elevado percentual de leveduras foi capaz de produzir celulases, pectinases, proteases e amilases, mostrando que essas leveduras atuam na quebra do material vegetal e consequentemente disponibilizam carboidratos mais facilmente assimiláveis nos jardins de fungos. Os autores ainda relataram que essas leveduras atuam na destoxificação dos ninhos pelo consumo de ácido galacturônico, composto danoso para as formigas (SILVA et al., 2003) e não assimilado pelo fungo mutualista.

2.7 Degradação dos polissacarídeos vegetais nos jardins de fungos

A produção de enzimas pelo fungo mutualista das formigas cortadeiras é um indicativo de que sua origem é saprofítica (SCHIOTT et al., 2008; ERTHAL JÚNIOR et al., 2009), pois este produz todas as enzimas necessárias para a degradação do tecido vegetal.

A opinião geral é que as formigas começaram a cultivar fungos saprófitas, que foram originalmente de vida livre encontrados em material vegetal ou animal em decomposição (MULLER et al., 2001).

O fungo mutualista produz grandes quantidades de pectinases quando comparada a outras enzimas extracelulares como amilases, xilanases e celulases (SIQUEIRA et al., 1998, SILVA et al., 2006). Além disso, este fungo não produz quantidades significativas de celulases em cultura pura (ABRIL; BUCHER, 2002), e apresenta baixa taxa de crescimento em ácido galacturônico, principal produto gerado da degradação da pectina (SILVA et al., 2003).

Esses fatores sugerem que as pectinases podem ser as mais importantes enzimas produzidas por *L. gongylophorus* (SIQUEIRA et al., 1998; SILVA et al., 2006;

SCHIOTT et al., 2010, MOLLER et al., 2011). A atividade pectinolítica é superexpressa nos gongilídeos do fungo, onde as enzimas são armazenadas e ingeridas pelas formigas (SCHIOTT et al., 2010). Também, essas enzimas não são degradadas no aparelho digestório das formigas, são liberadas juntamente com os fluidos fecais das mesmas que são depositados sobre a superfície das folhas (RHONHEDE; BOOMSMA; ROSENDAHL, 2004; SCHIOTT et al., 2010) e iniciam a degradação da pectina do material vegetal antes mesmo desse material ser incorporado aos jardins de fungos pelas formigas (MOLLER et al., 2011).

Mais recentemente, Aylward et al. (2013) mostraram através de uma análise combinada de genômica e metaproteômica, que *L. gongylophorus* é dominante na degradação da biomassa vegetal nos jardins de fungo das formigas cortadeiras, e que a maioria das enzimas altamente abundantes identificadas nos dados de metaproteômica são prováveis degradadoras de xilana, amido, pectina e proteínas. Esses autores constataram ainda que as enzimas que degradam lignocelulose estão entre as mais abundantes e que estes polímeros são provavelmente os primeiros polissacarídeos degradados por *L. gongylophorus* em jardins de fungos.

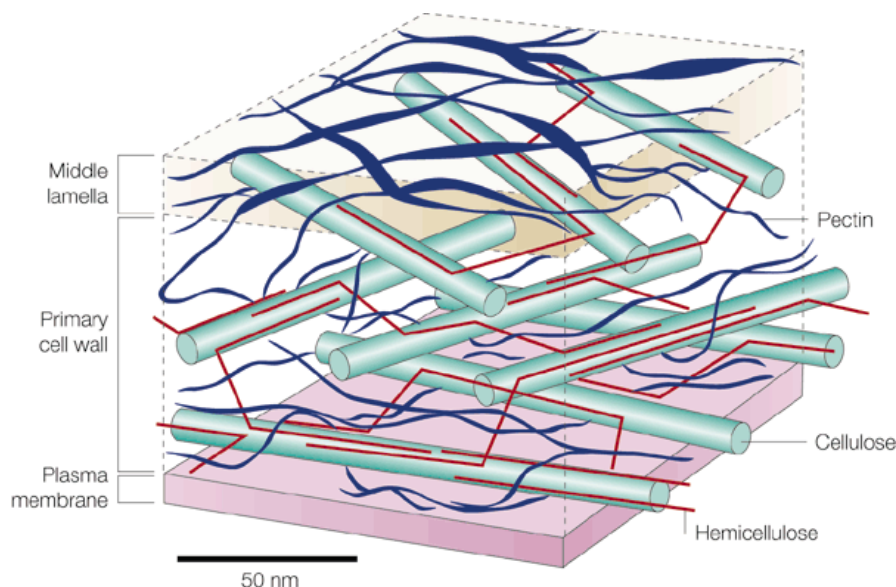
Existe uma elevada capacidade de degradação da maioria dos polissacarídeos vegetais dentro dos jardins de fungos, mas sabe-se também que a degradação de alguns compostos vegetais como celulose, por exemplo, pode ser proveniente de uma complexa comunidade microbiana existente nesse habitat, incluindo bactérias (BACCI JÚNIOR et al., 1995; SUEN et al., 2010) e leveduras (MENDES et al., 2012) e não somente pela atuação do fungo mutualista. Esses micro-organismos podem ainda realizar funções específicas, como a contribuição na degradação dos polissacarídeos vegetais através de produção de enzimas disponibilizando açúcares mais simples no jardim (BACCI JÚNIOR et al., 1995) e na fixação de nitrogênio, o qual é convertido em biomassa dentro do jardim de fungo (PINTO-TOMÁS et al., 2009).

Considerando esses fatos, sabe-se que a degradação do material vegetal nos jardins de fungos das formigas cortadeiras conta com o auxílio de micro-organismos presentes nesse micro-habitat, mas poucos foram os trabalhos que abordaram esse assunto e raros são os estudos conduzidos sobre a contribuição ecológica das leveduras dentro dos jardins de fungos de formigas cortadeiras. Dentre esses estudos, o trabalho de Mendes et al. (2012) foi o único a avaliar o papel das leveduras nos jardins desses insetos.

2.8 Estrutura da parede celular vegetal

A parede celular vegetal é a forma dominante de biomassa lignocelulósica, composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (DEMIRBAS, 2005; GÍRIO et al., 2010) (Fig. 1).

Fig. 1- Estrutura da parede celular vegetal. Fonte: (SMITH, 2001)



Cerca de 90% do peso seco vegetal é constituído por celulose, hemicelulose, lignina e pectina (IRANMAHBOOB et al., 2002), dentre estes a celulose e a hemicelulose correspondem a 2/3 da biomassa vegetal (GÍRIO et al., 2010).

A celulose e a hemicelulose são polímeros de carboidratos que estão intimamente associadas em uma estrutura mantida por ligações covalentes e não-covalentes. A lignina, por sua vez, é uma macromolécula aromática que está ligada à celulose e hemicelulose por ligações covalentes e pontes de hidrogênio (LEE, 1997; PÉREZ et al., 2002), e age como uma capa protetora contra o ataque de micro-organismos, o que confere às plantas uma grande resistência mecânica (MAMMAN et al., 2008), que conseqüentemente torna essa estrutura recalcitrante e de difícil hidrólise (GÍRIO et al., 2010).

A celulose, considerada o principal constituinte da parede celular vegetal, é um homopolímero não-ramificado e linear, constituído por unidades de D-glicose ou anidroglicopiranosose unidos por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4). Corresponde a aproximadamente 1/3 dos tecidos vegetais, porém esta percentagem varia de acordo com a

matéria-prima utilizada (FENGEL; WEGENER, 1989; LEE, 1997; LEWIN; GOLDSTEIN, 1991; PANDEY et al., 2000).

A celulose é entrelaçada por uma matriz de polissacarídeos e frequentemente está impregnada de lignina. Cada glicose, presente na celulose, possui hidroxilas livres (LEWIN; GOLDSTEIN, 1991; DEMIRBAS, 2005) que podem formar dois tipos de ligações de hidrogênio: as ligações intramoleculares, que ocorrem entre as unidades adjacentes de glicose de uma mesma molécula de celulose, e as ligações intermoleculares, que ocorrem entre as moléculas adjacentes de celulose. Essa organização nas ligações de hidrogênio da celulose resulta em regiões cristalinas. A estrutura cristalina da celulose a torna altamente insolúvel e resistente ao ataque enzimático e a ação de produtos químicos. Porém, a celulose também possui uma região amorfa, menos organizada e mais propensa à hidrólise (FENGEL; WEGENER, 1989; MAMMAN et al., 2008).

A hemicelulose se distingue da celulose por ser um polímero de carboidratos de composição variada de açúcares, de cadeias menores e por apresentar ramificações. (FENGEL; WEGENER, 1989; PÉREZ et al., 2002). É um heteropolímero que, em geral corresponde de 15-35% da biomassa vegetal, e é constituída por pentoses (β -D-xilose e α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose e α -D-galactose) e/ou ácidos urônicos (ácido α -D-glucurônico, ácido α -D-4-O-metilgalacturônico e ácido α -D-galacturônico). Outros açúcares como α -L-ramnose e α -L-fucose podem estar presentes em pequenas quantidades. Além disso, algumas hidroxilas (-OH) que estão presentes nos açúcares podem ser substituídas por radicais acetil. A hemicelulose tem um peso molecular menor que o da celulose e por apresentar uma estrutura ramificada, a hemicelulose é mais propensa à hidrólise do que a celulose (PÉREZ et al., 2002; DEMIRBAS, 2005; ALMEIDA et al., 2007; MAMMAN et al., 2008; ELSHAHED, 2010; GÍRIO et al., 2010).

Na hemicelulose, a distribuição dos açúcares varia conforme a matéria-prima empregada (WYMAN, 1994) e essa fração pode apresentar uma cadeia homopolímera, que consiste somente de um tipo de açúcar, como as xilanas, ou uma cadeia heteropolímera, que consiste de dois ou mais tipos de açúcares, como as glucomananas (FENGEL; WEGENER, 1989). Diferentes tipos de hemicelulose podem ser encontrados, como as glucuronoxilanas, as galactoglucumananas, as arabinoglucuronoxilanas, as xiloglucanas, arabinoxilanas entre outras (GÍRIO et al., 2010).

As xilanas são as formas mais comuns de hemicelulose e representam o segundo maior polissacarídeo presente na natureza. São constituídas por cadeias curtas (cerca de 200 unidades de açúcares) com ligações do tipo β -1,4 de β -D-xilopirranose. Pequenas

quantidades de arabinose, ácido glucurônico, ácido acético, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico podem estar presentes na xilana (MAMMAN et al., 2008; ELSHAHED, 2010).

A lignina, depois da celulose, é a macromolécula aromática mais abundante do planeta e corresponde a uma estrutura complexa, hidrofóbica e amorfa. É constituída por unidades de hidroxifenilpropano unidas por ligações cruzadas do tipo C-C e C-O-C. A lignina fornece suporte, impermeabilidade e resistência às plantas contra o ataque microbiológico e ao estresse oxidativo (FENGEL; WEGENER, 1989; LEE, 1997; PÉREZ et al., 2002; ALMEIDA et al., 2007). É extremamente resistente à degradação química e enzimática. A lignina é sintetizada a partir de três radicais: álcool coniferílico, álcool *p*-cumárilico e álcool sinapílico. De acordo com o grau de metoxilação a subunidade básica do álcool coniferílico é o guaiacil, do álcool *p*-cumárilico é o *p*-hidroxifenil e do álcool sinapílico é o siringil. O resultado final dessa polimerização é uma estrutura heterogênea. É importante ressaltar que a proporção desses monômeros varia entre as espécies vegetais e esta relação tem sido utilizada para fins taxonômicos (FENGEL; WEGENER, 1989; PÉREZ et al., 2002, RAMOS, 2003).

2.9 Aplicações biotecnológicas de enzimas extracelulares produzidas por leveduras

Nos últimos anos, o crescimento da indústria de enzimas tem sido particularmente robusto nos setores de produção de ração animal, em sínteses orgânicas para química fina e farmacêutica, para processamento de papel e polpa, produção de biocombustíveis, e para cuidados pessoais (KIRK et al., 2002; JOHNSON, 2013).

Na natureza, uma ampla diversidade de micro-organismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras foi dotada com grandes potencialidades, pois podem produzir uma variedade de enzimas, que têm sido comercialmente exploradas ao longo dos anos (SANCHEZ et al., 2009; SHARMA et al., 2013). Dentre essas enzimas podemos destacar as lignocelulósicas, capazes de degradar os polissacarídeos da parede celular vegetal.

Algumas leveduras como *Candida glabrata*, *C. stellata*, *C. sheatae*, *Kloeckera apiculata* (STRAUSS et al., 2001), *Aureobasidium pullulans* (KUDANGA; MWENJE, 2005; THONGEKKAEW; KHUMSAP; CHATSA-NGA, 2012), *Trichosporon cutaneum*, *T. pullulans* (STEVENS; PAYNE, 1977) e *Guehomyces pullulans* (SONG et al., 2010), foram reportadas como produtoras de celulases.

As celulases têm amplas aplicações industriais, incluindo a indústria de polpa e papel, têxtil, bioetanol, vinho, fabricação de detergentes, extração e clarificação de

vegetais e sucos de frutas, bem como para a melhoria da digestibilidade alimentar dos animais, entre outras (KUHAD et al., 2011).

As xilanases também são enzimas importantes do ponto de vista biotecnológico e vêm sendo utilizadas no branqueamento de polpa na indústria de papel, na bioconversão de material lignocelulósico e agro-resíduos em produtos fermentescíveis, fabricação de pão, bebidas e alimentos, clarificação de sucos e melhoria na consistência da cerveja (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002; POLIZELI et al., 2005). Aplicação de xilanases na sacarificação de xilana em resíduos agroindustriais e biomassa lignocelulósica para a produção de bioenergia intensifica a necessidade de explorar o potencial papel dessas enzimas na área de biotecnologia (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002).

Xilanases de leveduras como *Pseudozyma hubeiensis* (ADSUL; BASTAWDE; OKHALE, 2009) *Aureobasidium pullulans* (LI et al. 1993), *Cryptococcus adeliensis* (SCORZETTI et al., 2000) e *Trichosporon cutaneum* (LIU et al. 1998) têm sido extensivamente estudadas.

Quanto à degradação da lignina, poucas leveduras foram relatadas como produtoras das enzimas que degradam esse composto. *Trichosporon cutaneum* (GEORGIEVA et al., 2006), *T. pullulans* (SLÁVIKOVÁ et al., 2009) e *Rhodotorula glutinis* (GUPTA et al., 1990) são algumas dessas leveduras. Os organismos predominantemente responsáveis pela degradação da lignocelulose são fungos, e os mais eficientes degradadores pertencem ao grupo dos fungos filamentosos basidiomicetos (BENNETT et al., 2002; RABINOVICH et al., 2004).

Lignocelulose é o mais recalcitrante componente da parede celular vegetal e o principal componente da biomassa, que compreende cerca de metade da matéria vegetal produzida por fotossíntese, representando o mais abundante recurso orgânico renovável no solo (SANCHEZ et al., 2009). Resíduos lignocelulósicos de madeira, grama, agricultura, resíduos florestais e resíduos sólidos urbanos são particularmente abundantes na natureza e têm um potencial para a bioconversão. Diversos usos têm sido sugeridos para esses resíduos biodegradáveis; entre eles utilização como matéria-prima para a produção de etanol, fabricação de papel, como adubo para o cultivo de cogumelos comestíveis, e diretamente como ração animal (SANCHEZ et al., 2009).

Outras enzimas de interesse biotecnológico com aplicação em processos industriais são as amilases. Estas enzimas são importantes para fabricação de pães, xaropes de glicose e frutose, detergentes, álcool combustível a partir de amidos, sucos

de frutas, bebidas alcoólicas e adoçantes (HOSTINOVÁ, 2002; KIRK, BORCHERT, FUGISANG, 2002).

O amido é um produto fotossintético primário nas folhas de plantas e constitui a mais abundante e mais rapidamente renovável fonte de energia para os organismos vivos (HOSTINOVÁ, 2002). Algumas leveduras conhecidas como produtoras de amilases incluem *Schwanniomyces occidentalis* e espécies dos gêneros *Cryptococcus*, *Candida*, *Dioszegia*, *Sporobolomyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Saccharomycopsis*, *Aureobasidium* e *Galactomyces* (STRAUSS et al., 2001; BUZZINI; MARTINI, 2002; BRIZZIO et al., 2007).

Pectinases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pectínicas presentes na parede celular vegetal (WHITAKER, 1990). Essas enzimas tem sido usadas mais comumente na extração e clarificação de sucos de frutas e na produção de vinho (RIBEIRO et al., 2010; PRATHYUSHA e SUNEETHA, 2011; SANDRI et al., 2011), mas também são de grande importância em outras aplicações industriais, bem como em processamento têxtil, degomagem e maceração de fibras vegetais, fabricação de papel e fermentações de café e chá (JAYANI et al., 2005; SHARMA et al., 2013).

Na natureza, uma ampla variedade de micro-organismos como bactérias, leveduras, actinobactérias e fungos filamentosos tem sido relatados produzindo pectinases (JAYANI et al., 2005; GUPTA et al., 2008 e MALEKI et al., 2011). Entre as leveduras que produzem pectinases encontram-se espécies dos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Pseudozyma* (BIELY; KREMŇCKÝ, 1998; SHARMA et al., 2013).

As lipases constituem um grupo de enzimas cuja função biológica é catalisar a hidrólise de ligações ésteres de ácidos carboxílicos. A função natural das lipases em um meio aquoso é hidrolisar totalmente ou parcialmente triglicerídios fornecendo diglicerídios, monoglicerídios, ácidos graxos livres e glicerol (HOUDE et al., 2004; GUTIERREZ-AYESTA et al., 2007). O uso dessa enzima em aplicações industriais como reações de hidrólises, bioconversões e sínteses aumentou significativamente nos últimos anos, sendo as principais aplicações nas indústrias de alimentos, detergentes e farmacêuticas (HOUDE et al., 2004; ARAVINDAN et al., 2007; HASAN et al., 2010). Entre as leveduras que produzem lipases encontram-se espécies de *Candida rugosa*, *C. cylindracea*, *C. antartica*, *C. utilis*, *Cryptococcus* sp. e *Pseudozyma hubeiensis*

(SCHIMIDT-DANNERT et al., 1998; LIN et al., 2006; BUSSAMARA et al., 2010; PUSKAS et al., 2011).

Leveduras que podem degradar polissacarídeos vegetais são potencialmente interessantes para a produção de enzimas de importância industrial.

3

Capítulo 1

**Leveduras isoladas de ninhos da formiga cortadeira
Acromyrmex balzani Emery área de cerrado em
Palmas, Tocantins, Brasil**

3.1 Resumo

Neste estudo foi caracterizada a comunidade de leveduras do jardim de fungo e do material de descarte de ninhos da formiga cortadeira *Acromyrmex balzani* de áreas preservadas e perturbadas de cerrado em Palmas, Tocantins. Foram coletadas amostras de 24 ninhos, sendo 14 de ambiente preservado e 10 de ambiente perturbado. Usando métodos dependentes de cultivo, foram isoladas 720 leveduras, compreendendo 52 espécies distribuídas em 20 gêneros, dos quais seis são de leveduras ascomicetas, nove basidiomicetas e cinco de fungos dimórficos (4 ascomicetos e 1 basidiomiceto). A riqueza e a diversidade de espécies das amostras de ambiente preservado foram maiores em comparação com aquelas de ambiente perturbado. O mesmo foi observado quando se comparou as amostras de material descartado com as de jardim de fungo. A análise da similaridade das amostras de material descartado dos ninhos de ambientes preservados e perturbados mostrou que o material descartado compartilha um maior número de espécies em comparação com as amostras dos jardins de fungo dos dois ambientes estudados. Isso se deve provavelmente ao fato de *A. balzani* descartar seus resíduos fora dos ninhos. A espécie de levedura mais prevalente foi *Cryptococcus laurentii* com 132 isolados (18,1% do total), seguida de *Trichosporon mycotoxinivorans*, com 61 isolados (8,4%). As leveduras basidiomicetas foram prevalentes nos ninhos de *A. balzani*, tanto nos jardins de fungo quanto no material de descarte. Entre os ascomicetos, predominaram espécies de *Aureobasidium* e *Meyerozyma*, conhecidas por sua importância ecológica e econômica. Ainda, foram encontradas novas espécies dos gêneros *Starmerella* e *Bullera*, baseado nas análises das sequências da região D1/D2 da LSU do rRNA.

Palavras chave: Attini, comunidade microbiana, diversidade, jardim de fungo.

3.2 Introdução

As leveduras estão amplamente distribuídas na natureza, e podem ser encontradas nos mais diversos ambientes como água (SLAVIKOVA e VADKERTIOVÁ, 1992; 1997), solo (SLAVIKOVA e VADKERTIOVA, 2000; YURKOVA et al., 2011; 2012), frutos (MORAIS et al., 2006; MARKSIMOVA et al., 2009), flores (LACHANCE et al., 1998; ROSA et al., 1999), exsudados (MORAIS et al., 2004) ou na filosfera (INÁCIO et al., 2002; 2010; FONSECA e INÁCIO, 2006). Também podem ser encontradas associadas com uma grande variedade de insetos como térmitas (PRILLINGER et al., 1996), besouros (SUH et al., 2003; MCKENNA; FARRELL, 2006), abelhas (LACHANCE et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2003) e vespas (GANTER, 2006).

Nos ninhos das formigas Attini, além do fungo mutualista, pode ser encontrada uma ampla microbiota constituída por fungos filamentosos (CURRIE et al., 1999, 2003; RODRIGUES et al., 2005; 2008; 2010; PAGNOCCA et al., 2011), bactérias (CRAVEN et al., 1970; BACCI JÚNIOR et al., 1995; PAGNOCCA et al., 1996; SCOTT et al., 2010) e leveduras (CARREIRO et al., 1997, 2002, 2004, RODRIGUES et al., 2009; PAGNOCCA et al., 2008, 2010, 2011; MENDES et al., 2012).

Alguns autores tem registrado a ocorrência de leveduras nos jardins de fungo (CRAVEN et al., 1970; ANGELIS et al., 1983; PAGNOCCA et al., 1996; CARREIRO et al., 1997; RODRIGUES et al., 2009; MENDES et al., 2012) e no exoesqueleto das formigas Attini (PAGNOCCA et al., 2008; LITTLE e CURRIE, 2007).

Esses estudos contribuíram para a descoberta e descrição de novas espécies de leveduras e incluem espécies como *Cryptococcus haglerorum* (MIDDELHOVEN et al., 2003), *Blastobotrys (Sympodiomyces) attinorum* (CARREIRO et al., 2004) e *Trichosporon chiarellii* (PAGNOCCA et al., 2010).

Não são muitos os estudos dedicados às comunidades de leveduras associadas com formigas da tribo Attini e não existem relatos de estudos sobre a composição e estrutura da comunidade de leveduras associadas à espécie de formiga *A. balzani* que ocorre no cerrado brasileiro, particularmente, no Estado do Tocantins.

No presente trabalho foi estudada a composição e a diversidade da comunidade de leveduras isoladas de ninhos da formiga cortadeira *Acromyrmex balzani* e as diferenças na diversidade das espécies presentes nos jardins de fungo e no material de descarte dos ninhos. Amostras dos ninhos foram coletados em áreas preservadas e

perturbadas de cerrado. Duas espécies não descritas de leveduras foram encontradas em amostras do jardim de fungo.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Coleta dos ninhos

Vinte e quatro ninhos da formiga cortadeira *Acromyrmex balzani* foram coletados em área de cerrado na cidade de Palmas, Tocantins, região norte do Brasil. Quatorze ninhos foram utilizados para as coletas em área preservada (S 10° 10' 45'' e O 48° 21' 38') e 10 em área perturbada (ambiente sem vegetação natural com plantação de gramíneas) (S 10° 10' 29'' e O 48° 21' 41''). Os ninhos foram coletados no intervalo de um ano (1ª coleta - julho de 2010, 2ª coleta - janeiro de 2011 e 3ª coleta - agosto de 2011). Na primeira coleta, cinco ninhos foram escavados (3 de área preservada e 2 de área perturbada), 14 ninhos na segunda coleta (9 de área preservada e 5 de área perturbada) e cinco ninhos na terceira coleta (2 de área preservada e 3 em de área perturbada). Amostras do jardim de fungo e do material de descarte foram coletadas e estocadas em recipientes estéreis e transportadas para o laboratório e processadas para isolamento das leveduras até 24 h após a coleta.

3.3.2 Isolamento e caracterização das leveduras

Diluições em série foram realizadas com um grama do jardim de fungos e um grama do material de descarte em YMB (0,3% extrato de malte; 0,3% extrato de levedura; 0,5% peptona; 1,0% D-glicose) com 0,01% de cloranfenicol e agitados em vórtex por um minuto. Aliquotas de 100 µL foram semeadas em triplicata em placas de petri contendo os meios de isolamento YMA (0,3% extrato de malte; 0,3% extrato de levedura; 0,5% peptona; 1,0% D-glicose; 2,0% ágar) (YARROW, 1998), e MYP (0,7% extrato de malte; 0,05% extrato de levedura; 0,25% soytone; 1,5% ágar) (SAMPAIO et al., 2001) ambos suplementados com 0,01% de cloranfenicol e pH 4,0. As placas foram incubadas a 20 °C no escuro e monitoradas diariamente por cinco dias. Colônias que apresentavam diferentes morfotipos foram coletadas logo que cresciam nas placas, purificadas e mantidas em GYMP (2,0% D- glicose; 1,0% extrato de malte; 0,5% extrato de levedura; 0,2% NaH₂PO₄) (ROSA et al., 1995) contendo glicerol 15% a -80 °C. Ainda, foi empregada a técnica de flotação (SATOW et al., 2008), um método seletivo que favorece o aparecimento de leveduras negras. Para tanto, um grama de

jardim de fungos e material de descarte foram adicionados em triplicata a 15 mL de solução salina contendo NaCl 0,85%; 200 U de penicilina; 200 µg/mL de cloranfenicol; 200 µg/mL de estreptomicina e 500 µg/mL ciclohexemida (actidiona). As suspensões foram homogeneizadas emantidas em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 1,0 mL de óleo mineral foi adicionado e feita vigorosa agitação por 5 minutos em vortex. Os frascos foram incubados por 45 dias a 25 °C. Alíquotas de 100 µL da interface da solução foram semeadas em Mycosel ágar e incubadas a 25 e 35 °C e monitoradas diariamente até o crescimento das colônias. Após purificação, as colônias foram mantidas em meio GYMP contendo glicerol 15% em ultrafreezer -80 °C de acordo com Rosa et al., (1995).

3.3.3 Identificação polifásica das leveduras

As estirpes foram inicialmente agrupadas usando características macroscópicas e microscópicas. Testes fisiológicos foram realizados usando a técnica de “réplica plating”, de acordo com metodologia descrita em Kurtzman et al. (2011). O DNA genômico foi extraído segundo o protocolo de Sampaio et al. (2001). A técnica de microssatélite (MSP-PCR) foi aplicada para checar a similaridade genética entre os isolados, através da amplificação do DNA genômico, usando o primer GTG₅. A reação de PCR (Polymerase chain reaction) continha: 4,0 µL de dNTPs (1,25 mM cada); 2,5 µL de buffer 10X; 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM); 0,2 µL de Taq-polimerase (5,0 U/µL); 2,0 µL de primer (GTG)₅ (10 µM); 10,3 µL de água ultrapura e 5,0 µL de DNA template (1:750). As condições da PCR foram realizadas como segue: 95 °C por 3 min, 40 ciclos a 93 °C por 45 s, 50 °C por 60 s, 72 °C por 60 s, e extensão final 72 °C por 6 min. Para verificar o padrão de bandas, uma eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,4%, em TBE (0,5%) a 90 V por 3,5 h, e visualizada pela coloração com GelRed (Biotium) após a corrida. Representantes de cada perfil de bandas obtido no MSP-PCR e as estirpes que não puderam ser agrupadas foram selecionadas para o sequenciamento do DNA (Apêndice A). As leveduras foram identificadas pelo sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rRNA, amplificados com os primers NL1 e NL4 de acordo com Kurtzman e Robnett (1998). Para algumas estirpes, a região ITS (internal transcribed spacer) também foi sequenciada, usando os primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990). A PCR continha: 4,0 µL de dNTPs (1,25 mM cada); 2,5 µL de buffer 10X; 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM); 0,2 µL de Taq-polimerase (5,0 U/µL); 2,0 µL de cada primer

(10 μM), 10,3 μL de água ultrapura e 5,0 μL de DNA template (1:750). A PCR foi realizada como descrito em Pagnocca et al. (2008) e os produtos foram purificados usando NucleoSpin Gel e PCR Clean-up (Macherey-Nagel, MN). Sequências forward e reverse foram geradas em ABI 3130 Genetic Analyser (Life Technologies), usando BigDye Terminator v3.1. As sequências foram editadas e usadas para montar os contigs em BioEdit v7.1.3 (HALL, 1999). Contigs foram usados para pesquisar por sequências homólogas nas bases de dados do Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) e NCBI – GenBank.

3.3.4 Análise de diversidade e estrutura da comunidade

Para avaliar e comparar a diversidade de leveduras foram calculados os índices de diversidade de Shannon – Weiner (H') e o inverso de Simpson ($1/D$). Além disso, foi calculado o estimador de riqueza Chao-1 para estimar a riqueza de espécies assintóticas.

As curvas de rarefação foram geradas para comparar a riqueza de espécies entre as regiões estudadas, os jardins de fungos, material de descarte e entre 1^a, 2^a e 3^a coletas. O compartilhamento das espécies também foi calculado pelo índice de Jaccard e Sørensen (MAGURRAN; GILL, 2011) e visualizado pelo diagrama de Venn, gerado no software R v. 3.0.1 (TEAM, 2013). Todos os índices foram calculados no programa EstimateS v. 8.2.0 (COLWELL, 2009) e as curvas de rarefação foram geradas no programa EcoSim v. 7.71 (GOTELLI; ENTSMINGER, 2004).

3.4 Resultados

Foram isoladas 720 estirpes de leveduras dos 24 ninhos de *Acromyrmex balzani* amostrados. Todos os isolados estão depositados na Central de Recursos Microbianos da UNESP - Rio Claro (CRM - UNESP).

Foram realizados 294 isolamentos no meio YMA e 329 no meio MYP. A técnica de flotação, método seletivo que favorece o aparacimento de leveduras negras, juntamente com ágar Mycosel, permitiu recuperar 97 leveduras brancas e, curiosamente, nenhuma levedura negra foi isolada.

Em um total de 52 espécies, 20 gêneros foram identificados. Seis gêneros foram de leveduras ascomicetas (*Brettanomyces*, *Candida*, *Kasachstania*, *Meyerozyma*, *Starmerella* e *Torulaspota*) e nove gêneros de leveduras basidiomicetas (*Bullera*, *Cryptococcus*, *Kwoniella*, *Pseudozyma*, *Rhodospordium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, *Sporisorium*, e *Trichosporon*). Além disso, cinco gêneros de fungos dimórficos (4 ascomicetos: *Aureobasidium*, *Dothichiza*, *Exophiala*, *Coniochaeta*, e um basidiomiceto: *Moniliella*) também foram identificados (Tabela 1).

Leveduras basidiomicetas (29 espécies) foram prevalentes compreendendo 60,3% do total de isolados (434). Por outro lado, as leveduras ascomicetas (23 espécies) corresponderam a 39,7% (286) das estirpes isoladas.

As espécies predominantes nos ninhos foram: *Cryptococcus laurentii* (18,1%), *Trichosporon mycotoxinivorans* (8,4%), *Meyerozyma caribbica* (7,7%), *Aureobasidium pullulans* (6,8%), *Trichosporon asahii* (6,3%) e *Rhodospordium paludigenun* (5,5%). Juntas, estas espécies representam 52,8% do número total de isolados. Nas amostras de área preservada, as espécies prevalentes foram *Trichosporon mycotoxinivorans* (13,8%), *Cryptococcus laurentii* (12%) e *Meyerozyma caribbica* (12,4%), enquanto que nas amostras de áreas perturbadas a espécie prevalente foi *Cryptococcus laurentii* (28,2%), seguido de *Trichosporon asahii* (14,8%) (Tabela 1). Dezesesseis espécies (30,7% do total) foram representadas por não mais que um ou dois isolados e a maioria foi encontrada em material descartado de área preservada.

Tabela 1. Leveduras isoladas de jardim de fungo e material de descarte da formiga cortadeira *Acromyrmex balzani* de áreas preservada e perturbada de cerrado.

	Espécies	Área preservada (n=14) ^a		Área perturbada (n=10)		Total	%	
		JF ^b	MD ^c	JF	MD			
Ascomycota	<i>Aureobasidium leucospermi</i>		1			1	<1	
	<i>Aureobasidium pullulans</i>		29	1	19	49	6,8	
	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>		9		7	16	2,2	
	<i>Aureobasidium</i> sp.		8		5	13	1,8	
	<i>Brettanomyces naardenensis</i>		3		1	4	<1	
	<i>Candida albicans</i>	6	13	1		20	2,7	
	<i>Candida carpophila</i>		2			2	<1	
	<i>Candida cellae</i>	1	2	6		9	1,3	
	<i>Candida infanticola</i>		2			2	<1	
	<i>Candida maltosa</i>				3	3	<1	
	<i>Candida melibiosica</i>		11		3	14	1,9	
	<i>Candida orthopsilosis</i>		5			5	<1	
	<i>Candida parapsilosis</i>				1	1	<1	
	<i>Candida tropicalis</i>		4			4	<1	
	<i>Coniochaeta canina</i>				1	9	10	1,4
	<i>Dothichiza pithyophila</i>		24			24	3,3	
	<i>Exophiala bergeri</i>		1			1	<1	
	<i>Kazachstania unispora</i>		7			7	<1	
	<i>Kazachstania</i> sp.		14			14	1,9	
	<i>Meyerozyma caribbica</i>	4	51		1	56	7,7	
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>		6		7	13	1,8	
	<i>Starmerella</i> sp.				15	15	2,1	
	<i>Torulasporea globosa</i>				3	3	<1	
Basidiomycota	<i>Bullera</i> sp.	1				1	<1	
	<i>Cryptococcus flavescens</i>		1		2	3	<1	
	<i>Cryptococcus flavus</i>	3			2	5	<1	
	<i>Cryptococcus heveanensis</i>		1			1	<1	
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	52	9	69	131	18,1	
	<i>Cryptococcus mangaliensis</i>		12			12	1,6	
	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>		2			2	<1	
	<i>Cryptococcus</i> sp.	1	8	1	11	21	2,9	
	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	2	14			16	2,2	
	<i>Moniliella fonsecae</i>		1			1	<1	
	<i>Pseudozyma aphidis</i>				1	1	<1	
	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>		4		5	9	1,3	
	<i>Pseudozyma jejuensis</i>		4		1	5	<1	
	<i>Pseudozyma parantarctica</i>		1			1	<1	
	<i>Pseudozyma shanxiensis</i>				1	1	<1	
	<i>Rhodotorula dairenensis</i>				4	4	<1	

Tabela 1(Continuação)

	Espécies	Área preservada (n=14) ^a		Área perturbada (n=10) ^a		Total	%
		JF ^b	MD ^c	JF	MD		
		Basidiomicota	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		3		
<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	1				3	4	<1
<i>Rhodotorula</i> sp.			2		3	5	<1
<i>Rhodosporidium paludigenum</i>			13		27	40	5,5
<i>Rhodosporidium toruloides</i>			8		3	11	1,5
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>			26		2	28	3,8
<i>Sporisorium chrysopogonis</i>			1			1	<1
<i>Sporisorium elionuri</i>	5		6			11	1,5
<i>Trichosporon asahii</i>	2		3		41	46	6,3
<i>Trichosporon chiarelli</i>				1		1	<1
<i>Trichosporon insectorum</i>					1	1	<1
<i>Trichosporon loubieri</i>			1			1	<1
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	56		5			61	8,4
Número total de isolados	83		360	39	238	720	
Riqueza de espécies (S)	12	39	10	27	52		

^a Indica o número de ninhos amostrados em área preservada e perturbada

^b Leveduras isoladas de jardim de fungo (JF)

^c Leveduras isoladas de material de descarte (MD)

% - porcentagem do número total de isolados

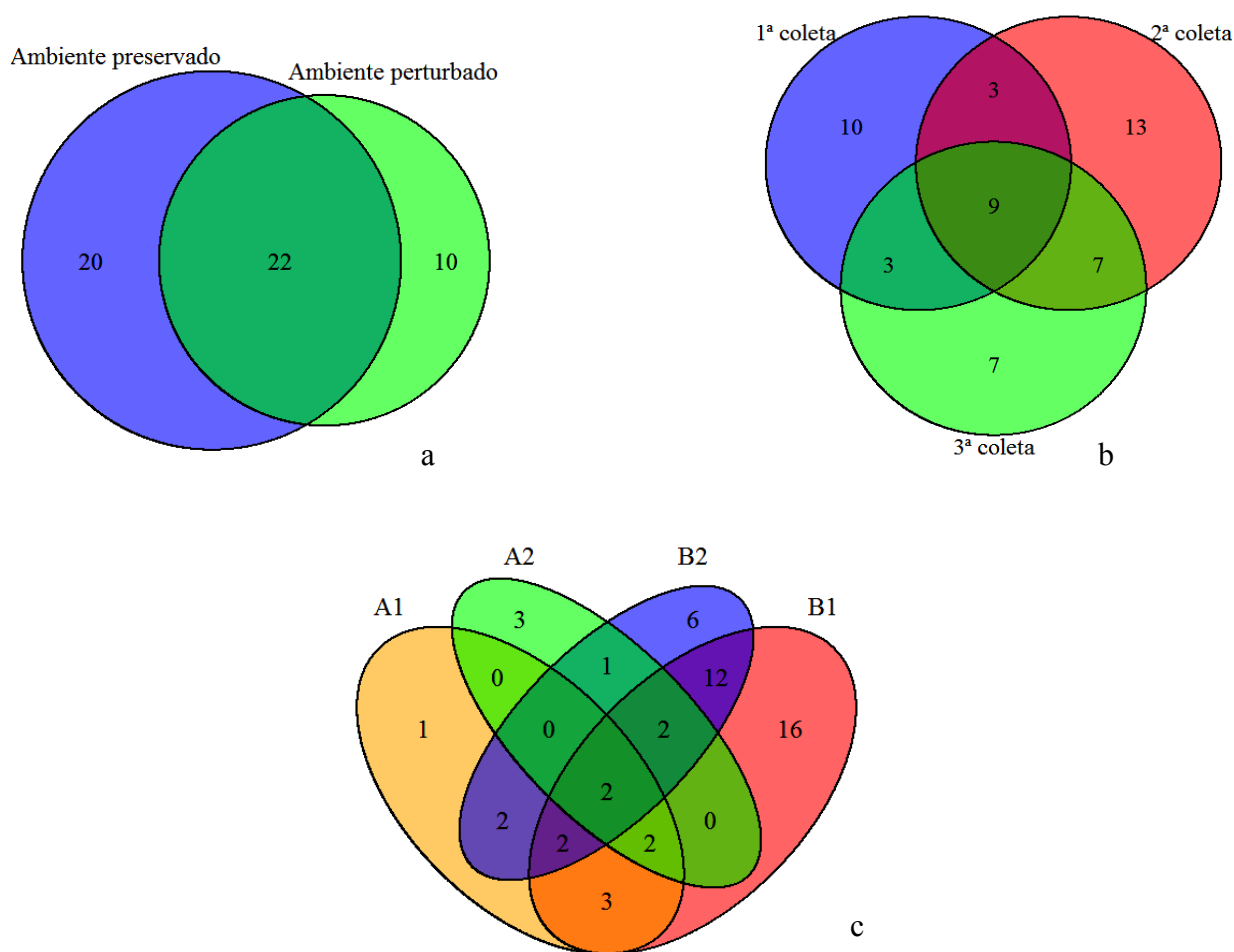
Starmerella sp., *Torulaspora globosa*, *Bullera* sp. e *Trichosporon chiarellii* foram encontrados apenas nos jardins de fungo. Por outro lado, 22 espécies foram encontradas apenas no material de descarte.

Os índices de similaridade de Jaccard e Sorensen aplicados para verificar a semelhança entre os ambientes mostraram que 22 dentre as 52 espécies foram compartilhadas nos dois ambientes (Jaccard = 0,4 e Sorensen = 0,5). Das amostras de área preservada foram recuperadas 42 espécies, sendo 20 restritas a este ambiente. Trinta e duas espécies foram obtidas das amostras de área perturbada, com 10 espécies encontradas apenas nos ninhos deste ambiente (Fig. 3a).

Analisando o compartilhamento de espécies entre as coletas verificou-se que a 2^a coleta (Janeiro de 2011) e 3^a (Agosto de 2011) compartilham mais espécies (7) quando comparadas com a 1^a coleta (Julho de 2010) e 2^a (3 espécies), e a 1^a e 3^a (3 espécies) (Fig. 3b). Ainda, verificamos o compartilhamento de espécies dos jardins de fungo das áreas preservada (A1) e perturbada (A2) e do material de descarte (B1 e B2) (Fig. 3c). Os índices de similaridade (Jaccard = 0,3, Sorensen = 0,5) mostraram que o material de descarte de área preservada (B1) e perturbada (B2) compartilham o maior número de

espécies (18). Os jardins de fungo (A1) e o material de descarte (B1) da área preservada compartilham mais espécies (9), do que o os jardins de fungo (A2) e o material de descarte (B2) da área perturbada (5 espécies). Ainda, os jardins de área preservada (A1) e perturbada (A2) compartilham o menor número de espécies (4) (Fig. 2c).

Fig. 2 – Diagramas de Venn indicando o número de espécies de leveduras registradas em ambiente preservado e perturbado de cerrado (a); das 1ª, 2ª e 3ª coletas (b); dos jardins de fungo de ambiente preservado (A1) e perturbado (A2) e do material descartado de ambiente preservado (B1) e perturbado (B2) (c).



A diversidade de espécies também foi analisada (Tabela 2). De acordo com os índices de Shannon (H') e Simpson (D) realizados na 1ª, 2ª e 3ª coleta, a maior diversidade foi observada na 1ª e 2ª coletas ($H' = 2,79$; $D = 13,8$ e $H' = 2,86$; $D = 11,8$) respectivamente, apesar da 1ª coleta apresentar a menor riqueza ($S=25$). De acordo com a curva de rarefação, a 2ª coleta apresentou a maior riqueza de espécies ($S=32$) (Fig. 3a).

Quando analisamos a diversidade das áreas preservada e perturbada, os índices de Shannon e Simpson mostraram que a diversidade na área preservada ($H' = 3,06$; $D = 14,94$) foi consideravelmente maior do que na área perturbada ($H' = 2,62$; $D = 8,12$) (Tabela 2); a riqueza de espécies também confirmou estes resultados (Fig. 3b).

Ainda, foi analisada a diversidade entre jardins de fungo e material de descarte, e observamos que o material de descarte possui uma diversidade muito maior do que os jardins de fungo ($H' = 3,1$; $D = 13,49$ e $H' = 2,01$; $D = 4,2$, respectivamente). A riqueza de espécies também foi maior no material de descarte com 48 espécies recuperadas e apenas 18 nos jardins de fungo (Fig. 3c).

Os jardins de fungo de área preservada possuem uma riqueza de espécies maior que os jardins de área perturbada (Fig. 3d). No entanto, a diversidade é maior nos jardins de área perturbada (Tabela 2). Por outro lado, o material de descarte de área preservada apresentou uma diversidade maior (Tabela 2), assim como uma maior riqueza de espécies em relação ao material descartado de área perturbada (Fig. 3e).

Além disso, calculamos o estimador de riqueza de espécies, Chao 1, que estima, em média, o número de espécies que se espera encontrar na amostra. Em geral, a riqueza observada em nossas amostras aproximou-se da riqueza mais próxima esperada, conforme revelado pelo estimador (Tabela 2). No entanto, os jardins de fungo em área perturbada, Chao 1 estimou que, em média 25 espécies são esperadas para serem encontradas e apenas 10 espécies foram observadas.

Fig. 3 – Curvas de rarefação de leveduras isoladas de ninhos de *A. balzani* de três coletas (1^a - julho 2010; 2^a – janeiro 2011; 3^a – agosto 2012) (a); ambiente preservado e perturbado de cerrado (b); jardins de fungo e material descartado (c), entre jardins de ambiente preservado e perturbado (d) e entre material descartado de ambiente preservado e perturbado (e).

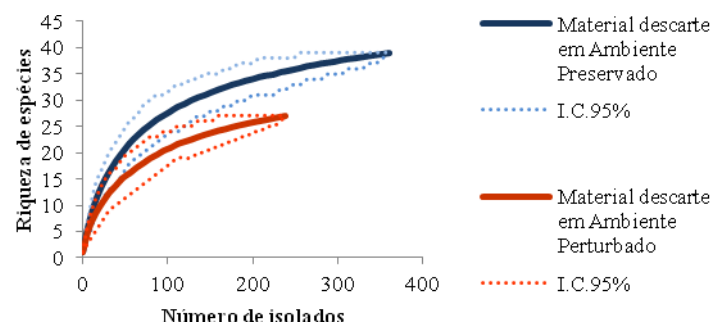
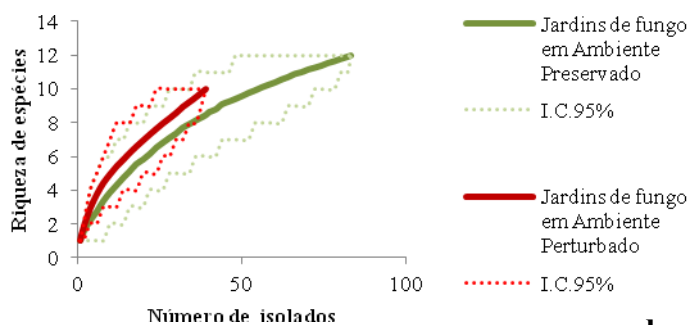
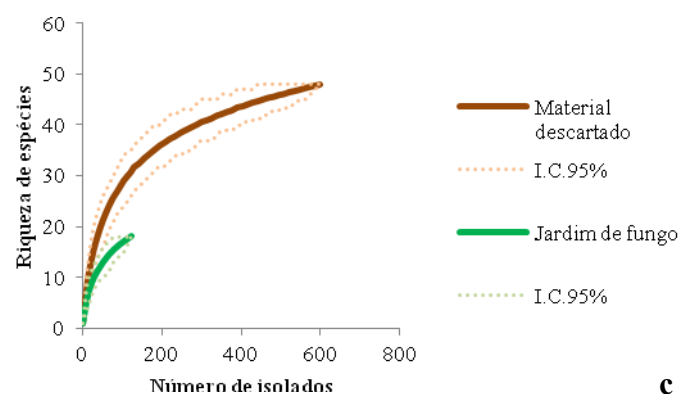
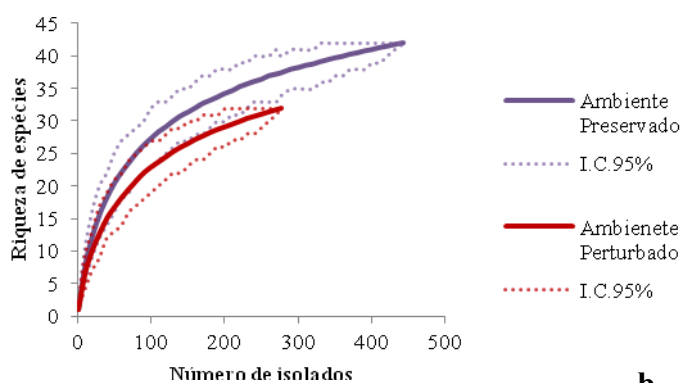
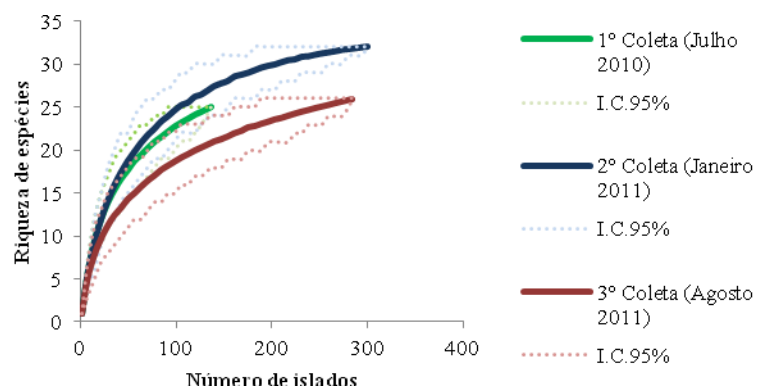


Tabela 2 – Riqueza de espécies observada e estimada, abundância de isolados e índices de diversidade de leveduras isoladas de ninhos de *A. balzani*.

Amostras	Riqueza de espécies(S)	Abundância de isolados	Índices de diversidade		Estimador de riqueza Chao 1
			Shannon	Simpson	
1ª coleta	25	136	2,79	13,8	29,2 (25,79 - 47,34)
2ª coleta	32	300	2,86	11,8	33 (32,11 - 40,96)
3ª coleta	26	284	2,48	8,4	30,2 (26,78 - 48,33)
Ambiente Preservado	42	443	3,06	14,94	51 (44,13 - 80,02)
Ambiente Perturbado	32	277	2,62	8,12	41 (34,0 - 72,45)
Jardim de fungo	18	122	2,01	4,2	21,57(18,64 - 40,02)
Material descartado	48	598	3,1	13,49	57,17 (50,29 - 84,66)
Jardim de fungo de Ambiente preservado	12	83	1,34	2,16	15,33 (12,5 – 34,07)
Jardim de fungo de Ambiente perturbado	10	39	1,75	4,66	25 (13,3 – 78,16)
Material descartado de Ambiente preservado	39	360	3,06	15,06	43,67 (39,95 – 61,83)
Material descartado de Ambiente perturbado	27	238	2,46	7,27	32,25 (28 -54,61)

3.5 Discussão

A ocorrência de leveduras em ninhos de formigas da tribo Attini tem sido relatada em vários estudos nos últimos anos (CARREIRO et al., 1997, 2002, 2004, RODRIGUES et al., 2009; PAGNOCCA et al., 2008, 2010, 2011; MENDES et al., 2012). Provavelmente, a maioria das leveduras encontradas nos jardins de fungo é transportada durante o forrageamento pelas formigas operárias, e especificamente em relação às formigas cortadeiras, as leveduras podem estar no filoplano do material vegetal fresco coletado pelas operárias, pois este é considerado um nicho onde podem ocorrer muitas espécies de leveduras.

A presença de leveduras ascomicetas e basidiomicetas em folhas e cascas de diferentes espécies de plantas foi observada por alguns autores ocorrendo em frequências aproximadamente iguais (SLAVIKOVA et al., 2007; BHADRA et al., 2008). No entanto, Fonseca e Inácio (2006) observaram que na filosfera há uma predominância clara de basidiomicetos.

Alguns estudos relataram a prevalência de leveduras basidiomicetas em ninhos de formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (PAGNOCCA et al., 2011). Em nosso estudo, essa prevalência também foi observada, com o isolamento de 434 estirpes pertencentes a 29 espécies basidiomicetas. Tal fato confirma a observação de

Rodrigues et al. (2009) e Mendes et al. (2012) de que nos jardins de fungos de formigas cortadeiras predominam leveduras basidiomicetas e que isso provavelmente é decorrência do material foliar carregado para o interior dos ninhos pelas formigas forrageadoras.

Cryptococcus e *Trichosporon* foram os gêneros prevalentes em ninhos de *A. balzani*, representando 39,5% do total de isolados obtidos, e tem sido recorrente o isolamento de leveduras destes gêneros em jardim de fungo das formigas Attini (CARREIRO et al., 1997; RODRIGUES et al., 2009; PAGNOCCA et al., 2010, 2011; MENDES et al., 2012).

Cryptococcus é um gênero cosmopolita e pode ser encontrado em ambientes aquáticos, solos, plantas, e normalmente é prevalente em comunidades de leveduras da filosfera (SLAVIKOVA e VADKERTIOVA, 2000, 2007, SLAVIKOVA et al., 2009; FONSECA e INÁCIO, 2006). Ainda, espécies do gênero *Trichosporon* são amplamente distribuídas no ambiente, ocorrendo principalmente em solo e água. Elas também são encontradas em associação com insetos (FUENTEFRÍA et al., 2008; MIDDELHOVEN et al., 2003), e, assim como algumas espécies de *Cryptococcus* podem ser consideradas patógenos oportunistas (SUGITA et al., 2002; GIRMENIA et al., 2005). A frequente associação destes dois gêneros com plantas e solo pode explicar sua presença no jardim de fungo e no material de descarte de ninhos de formigas cortadeiras.

Entre os ascomicetos, *Aureobasidium* e *Meyerozyma* foram os gêneros com a maior abundância de isolados, somando 14,5% do total recuperado. A presença destas espécies em ninhos de *A. balzani* pode ser explicada pela habilidade de adaptação a uma variedade de habitats.

O gênero *Aureobasidium* foi relatado anteriormente no jardim de fungo de formigas cortadeiras (CARREIRO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2009) e associado com o tegumento de fêmeas aladas de *Atta capiguara* e *A. laevigata* (PAGNOCCA et al., 2008). Além disso, é um gênero ubíquo, encontrado em ambientes como a filosfera e sobre superfície de frutos e folhas (SCHENA et al., 1999; ANDREWS et al., 1994). A espécie *A. pullulans* é conhecida pela produção de pululana, um polissacarídeo extracelular biodegradável (ZALAR et al., 2008) e pela produção de amilases, β -glicosidades e enzimas pectinolíticas (IEMBO et al., 2002; LEITE et al., 2007).

O gênero *Meyerozyma* está composto por duas espécies: *Meyerozyma caribbica* e *M. guilliermondii*, anteriormente classificadas no gênero *Pichia* (*P. caribbica* e *P. guilliermondii*). Elas foram transferidas para o novo gênero *Meyerozyma* após análise

filogenética de sequências combinadas da LSU e SSU do gene rRNA, onde se constatou que algumas espécies de *Candida* e *Pichia* que produzem coenzima Q-9 formavam um clado bem suportado (KURTZMAN, SUZUKI, 2010). A presença destas espécies foi registrada a partir de uma variedade de substratos e habitats, incluindo insetos, flores, frutos, cana de açúcar, ambientes extremos e como patógenos oportunistas de animais e humanos, revelando, assim, que são metabólica e geograficamente diversificadas (KURTZMAN et al., 2011). *Meyerozyma guilliermondii* tem amplas aplicações biotecnológicas, como um organismo modelo para a produção de riboflavina e também para a produção de xylitol a partir de xilose. Também são conhecidas por possuir atividade *killer*, e assim, são usadas como agentes de biocontrole contra fungos (SIBIRYNY; BETSKY, 2009). *Meyerozyma caribbica* e *M. guilliermondii* tem sido observadas em ninhos de laboratório e de campo de formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (CARREIRO et al., 2002, MENDES et al., 2012). Além disso, *Meyerozyma guilliermondii* foi isolada em abundância de vários ninhos de laboratório, e bioensaios preliminares revelaram interação antagonista contra fungos patógenos comuns em jardins de Attini (RODRIGUES et al., 2009).

Algumas das espécies encontradas nos ninhos de *A. balzani* são de importância econômica e clínica, e incluem *Exophiala bergeri*, *Candida orthopsilosis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Coniochaeta (Lecytophora) canina*, *Trichosporon asahii*, *T. loubieri* e *T. mycotoxinivorans* (De HOOG et al., 2006; VICENTE et al., 2008; KURTZMAN et al., 2011; TROY et al., 2013). É sabido que essas formigas podem dispersar leveduras e outros micro-organismos (PAGNOCCA et al., 2008) e o fato de que seus ninhos podem abrigar espécies potencialmente patogênicas é uma interessante constatação do ponto de vista epidemiológico.

Espécies do gênero *Coniochaeta (Lecytophora)* são de baixa virulência na maioria dos hospedeiros, geralmente aparecendo em tecidos mortos ou como invasores oportunistas de tecidos anteriormente infectados, de feridas ou tecidos senescentes, e também associados com necroses de madeira de árvores de *Prunus* (DAMM et al., 2010). No entanto, *C. canina*, uma espécie oportunista descrita recentemente, foi associada a lesões ósseas em cão pastor alemão (TROY et al., 2013).

A espécie de levedura negra *Exophiala bergeri* (1) foi recuperada de material de descarte em meio YMA, e tem sido relatada como fungo oportunista causando infecções que geralmente são menos sérias (VICENTE et al., 2008). Além disso, esta espécie tem sido isolada a partir de solo usando tolueno como substrato de enriquecimento (ZHAO

et al., 2010). Curiosamente, a técnica de flotação que foi utilizada, mesmo sendo uma técnica seletiva que favorece o aparecimento de espécies de leveduras deste grupo, não foi capaz de recuperar nenhum isolado de ninhos de *A. balzani*.

As espécies *Starmerella* sp. e *Bullera* sp., isoladas de jardim de fungo de ambiente perturbado e preservado, respectivamente, estão separadas de outras espécies de leveduras conhecidas, representando prováveis novas espécies. Análises das sequências do domínio D1/D2 da LSU do rRNA, mostrou que *Starmerella* sp. (89% de similaridade) e *Bullera* sp. (97%) não coincidem com sequências existentes no Genbank e Mycobank. (ver descrição dessas prováveis espécies novas nos capítulos 4 e 5).

Entre as espécies do gênero *Trichosporon* recuperadas, um isolado de *T. chiarellii* foi obtido de jardim de fungo de ambiente perturbado. Esta espécie foi descrita por Pagnocca et al. (2010), isolada de jardim de fungo e material de descarte de ninhos da formiga *Myrmicocrypta camargoi*, e até o momento somente foi encontrada em ninhos de formigas Attini, incluindo formigas do gênero *Acromyrmex* (MENDES et al., 2012). Os repetidos isolamentos em ninhos de formiga Attini sugerem que esta espécie pode estar bem adaptada a este ambiente ou quem sabe estar envolvida em uma relação mais estreita, porém de caráter ainda não esclarecido com essas formigas.

Em relação à diversidade e abundância de espécies, o jardim de fungos apresentou uma menor diversidade quando comparado com o material de descarte (Tabela 2). As formigas empregam vários mecanismos para manter seus ninhos livres de outros micro-organismos que não o fungo mutualista, e este fato pode explicar porque a diversidade foi menor nos jardins de fungo. Alguns desses mecanismos incluem: secreção de substâncias antimicrobianas produzidas pela glândula mandibular e fluido fecal em formigas operárias (BEATTIE et al., 1986; RODRIGUES et al., 2008); remoção e comportamento de limpeza dos fungos potencialmente patógenos ao jardim de fungo (CURRIE e STUART, 2001c); inoculação em massa do fungo mutualista sobre o material vegetal fresco coletado (WEBER, 1972); e a utilização de actinobactérias produtoras de antibióticos (CURRIE et al., 1999; ZUCCHI et al., 2011).

Ainda, a similaridade de espécies nos jardins de fungo de ambas as áreas estudadas (preservada x perturbada) foi menor em comparação com o material de descarte destes dois ambientes. Apesar da recorrência de algumas espécies de leveduras no interior dos ninhos, a dissimilaridade de espécies nos jardins de fungo pode ser justificada levando em conta algumas explicações sugeridas por Rodrigues et al. (2009), tais como: a população de leveduras no jardim de fungos depende do *input* de leveduras

com substratos vegetais específicos durante os diferentes períodos do ano ou os diferentes habitats; a idade ou a saúde do jardim; as leveduras podem habitar os jardins de fungo em alguns períodos do ciclo anual de cultivo.

No material de descarte foi encontrada a maior diversidade e isto pode estar relacionado ao fato de que a espécie de formiga *A. balzani* deposita seu material de descarte em pilhas localizadas em áreas externas do ninho. A maioria das espécies de formigas cortadeiras deposita seu material de descarte em câmaras subterrâneas, escavadas para esse propósito (WEBER, 1972). No entanto, algumas espécies de formigas como *Atta colombica*, *Trachymyrmex fuscus* e *A. balzani*, descartam seu material no ambiente externo (MENDES et al., 1992; ARAÚJO et al., 2002), facilitando o acesso de outros insetos e assim possibilitando que o mesmo receba continuamente novos micro-organismos. Além disso, fatores ambientais como chuva, vento e outros animais podem facilitar o acesso de leveduras no material descartado. Ainda, a deposição do material em pilhas externas facilita a germinação e o estabelecimento das espécies vegetais mais consumidas pela colônia, modificando a estrutura da comunidade de plantas (FARJI-BRENER; MEDINA, 2000).

Considerando a diversidade de leveduras das áreas preservada e perturbada, percebe-se que a área preservada é mais diversa (Tabela 2), e este resultado foi esperado devido ao fato da área preservada possuir uma maior diversidade de substrato para forrageamento das formigas, enquanto que na área perturbada havia disponibilidade de apenas uma espécie de gramínea. Morais et al. (1995, 2006) e Pimenta et al. (2009) sugerem que a diversidade de leveduras é alta em locais preservados, provavelmente como resultado de uma maior diversidade de fontes de alimentos em florestas primárias do que em áreas perturbadas, onde o habitat é mais homogêneo.

4***Capítulo 2***

**Enzimas extracelulares produzidas por leveduras
isoladas de ninhos de *Acromyrmex balzani* Emery**

4.1 Resumo

O fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* cultivado pelas formigas cortadeiras é responsável pela produção de enzimas extracelulares que degradam o material vegetal transportado para o interior dos ninhos. Além do fungo mutualista, bactérias e leveduras presentes nos ninhos também contribuem para a degradação dos tecidos vegetais. Neste estudo, investigamos a habilidade de leveduras isoladas de jardim de fungo e do material orgânico descartado de ninhos da formiga cortadeira *Acromyrmex balzani* para produzir enzimas extracelulares. Um total de 711 estirpes pertencentes a 52 espécies foram testadas quanto à capacidade de produzir amilase, celulase, ligninases, lipase, xilanase, pectato-liase e poligalacturonase. Também foram realizados testes fisiológicos quanto à habilidade de assimilação de glicose, celobiose, ácido galacturônico, maltose e xilose. Aproximadamente 95% das estirpes testadas apresentaram produção de pelo menos uma enzima. Xilanase foi detectada em 64,4% do total de estirpes, enquanto celulase, poligalacturonase, pectato-liase e lipase foram produzidas por 52%, 45,2%, 30,6% e 26,1% das estirpes, respectivamente. As enzimas amilase (10,4%), ligninase (8%) e lacase (2,4%) foram produzidas com menor frequência. A maior produção de celulase, xilanase, poligalacturonase, pectato-liase e lipase foi observada entre os basidiomicetos. Por outro lado, os ascomicetos exibiram a maior produção de amilase, ligninase e lacase. As estirpes isoladas de jardim de fungo e material descartado exibiram proporções elevadas de enzimas, porém, a produção de lacase só foi observada no material de descarte. Quanto à assimilação de açúcares simples, gerados na degradação dos compostos vegetais, 100% das estirpes assimilaram glicose, 88,3%, 87,6%, 82,5% e 75,6% assimilaram xilose, celobiose, maltose e ácido galacturônico, respectivamente. Ensaio enzimáticos quantitativos foram realizados com 17 estirpes de *Pseudozyma* spp. e 12 estirpes de *Sporisorium* spp., as quais haviam apresentado os maiores halos de degradação de pectato-liase e poligalacturonase. Duas estirpes (*Pseudozyma aphidis* TO 189 e *Sporisorium chrysopogonis* TO 027) exibiram a maior atividade de pectato-liase (0,747 U/mL e 0,855 U/mL, respectivamente) e a estirpe *S. chrysopogonis* TO 027 também apresentou a maior atividade de poligalacturonase (0,797 U/mL). Estes resultados revelaram que as leveduras de ninhos de *A. balzani* produzem diversas enzimas que podem contribuir para a degradação do material vegetal no interior dos ninhos, além de constituir uma fonte de várias enzimas potencialmente explorável para fins biotecnológicos.

Palavras-chave: formigas cortadeiras; polissacarídeos vegetais, hidrolases.

4.2 Introdução

As formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromyrmex*: Tribo Attini) cultivam um fungo mutualista especializado que serve como fonte primária de alimento da colônia. Este fungo é responsável pela produção de enzimas extracelulares que degradam o material vegetal transportado para o interior dos ninhos (SIQUEIRA et al., 1998).

O material vegetal fresco é coletado pelas formigas operárias, levado para o ninho e incorporado no topo dos jardins de fungo. Para promover a degradação inicial da biomassa vegetal este material é mastigado, misturado com o líquido fecal das formigas, e inoculado com micélio do fungo (WEBER, 1972).

Estudos sugerem que os polímeros vegetais mais facilmente degradados tais como o amido e pectina, são extraídos no topo do jardim (SCHIOTT et al., 2008). Além disso, a degradação da celulose e hemicelulose (SCHIOTT et al., 2008) também ocorrem ao longo do jardim de fungo, enquanto a lignina parece passar sem ser degradada (SUEN et al., 2010). O material vegetal parcialmente degradado é removido do fundo do jardim e descartado em depósitos de resíduos (lixeiros) pelas formigas operárias (SCOTT et al., 2010).

Os jardins de fungo recebem contínuos *inputs* de material vegetal fresco, enquanto os resíduos do jardim servem como o principal inóculo para o depósito de resíduos. O diferente grau de degradação entre jardins e depósito, influencia nas quantidades relativas de muitos polissacarídeos vegetais e nos nutrientes disponíveis (SCOTT et al., 2010).

Estudos têm demonstrado que os jardins de fungo podem abrigar diferentes micro-organismos (CRAVEN et al., 1970; BACCI JÚNIOR. et al., 1995; CARREIRO et al., 1997; CURRIE et al., 1999; LITTLE e CURRIE, 2008; PINTO-TOMÁS et al., 2009; SUEN et al., 2010; PAGNOCCA et al., 2010; MENDES et al. 2012). É provável que muitos desses micro-organismos possam não desempenhar papéis importantes, mas alguns podem permanecer desconhecidos com importantes funções (MENDES et al., 2012).

A ocorrência de leveduras em ninhos de formigas Attini tem sido registrada em vários estudos (CARREIRO et al., 1997, 2002, 2004, RODRIGUES et al., 2009; PAGNOCCA et al., 2008, 2010, 2011; MENDES et al., 2012). Esses micro-organismos apresentam a capacidade de produzir enzimas que atuam na degradação do substrato vegetal, como celulasas, pectinases, xilanases, amilases, entre outras, tornando os

nutrientes resultantes da degradação disponíveis para o fungo mutualista e para as formigas (MENDES et al., 2012).

O presente estudo avaliou se as leveduras recuperadas dos jardins de fungo e material de descarte de ninhos de *A. balzani* apresentam a capacidade de degradar polissacarídeos vegetais e outros compostos presentes nos jardins de fungo. A capacidade das leveduras em assimilar as fontes de carbono resultantes da degradação do material vegetal também foi avaliada. Adicionalmente, foi determinada quantitativamente a atividade de pectato-liase e poligalacturonase de estirpes de *Pseudozyma* spp. e *Sporisorium* spp. Os resultados sugerem que as leveduras isoladas desses ambientes apresentam um elevado potencial enzimático e assimilativo, o que demonstra a importância desses micro-organismos como parte da microbiota dos ninhos e, além disso, torna esse ambiente importante para a prospecção de leveduras com potencial biotecnológico.

4.3 Material e Métodos

Um total de 711 estirpes de leveduras provenientes de ninhos de *Acromyrmex balzani* e mantidas na Central de Recursos Microbianos - CRM, UNESP, Rio Claro, SP, foram utilizadas para a triagem enzimática. Dessas, 443 estirpes (42 espécies) foram isoladas de área preservada de cerrado em Palmas, Tocantins e 268 estirpes (32 espécies) foram isoladas de área perturbada de cerrado (S 10° 10' 45'' e O 48° 21' 38''; S 10° 10' 29'' e O 48° 21' 41'', respectivamente).

A produção de enzimas como celulase, xilanase, amilase, pectato-liase, poligalacturonase, lipase e ligninases foi avaliada em meios sólidos específicos.

4.3.1 Detecção de enzimas extracelulares

A triagem enzimática foi realizada utilizando o método de alta eficiência (high throughput screening). Para tanto, cada estirpe foi incubada durante 24 horas em 150 µL de meio basal (0,67% YNB acrescido de 0,1% de glicose). As estirpes foram incubadas em placa de Elisa (96 poços). Após o período de incubação, com auxílio de um replicador estéril, as suspensões de leveduras dos poços da placa de Elisa foram transferidas para placas de Petri contendo os meios de cultivo com os substratos para a detecção de enzimas extracelulares. As placas foram incubadas a 25 °C durante cinco

dias e os resultados foram avaliados. Para os experimentos de determinação da atividade ligninolítica, as placas foram incubadas por até 21 dias.

A produção de celulase foi avaliada em placas de Petri contendo 0,1% de Carboximetilcelulose (CMC, Sigma); 0,1% de extrato de levedura; 1,0 mg% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1% de K_2HPO_4 ; 0,05 % de NaNO_3 e 1.5% de ágar. Os resultados foram revelados segundo método de Theather e Wood (1982), que consiste em adicionar solução de vermelho congo (0,1%) ao meio de cultura durante 15 minutos. Após, a solução do corante foi retirada e adicionada solução de NaCl (1 M) por 15 minutos. Os resultados foram considerados positivos para a produção de CMCase quando foram observados halos claros ao redor das colônias.

Para determinar a produção de xilanase pelas estirpes foi utilizado o método descrito por Mendes et al. (2012). O meio de cultivo continha: 0,67% de YNB; 1,0% de xilana Birchwood (Sigma, X-4252) e 1,8% de ágar. Após o período de incubação, o resultado foi revelado adicionando Lugol no meio de cultura. Halos claros ao redor das colônias indicaram produção de xilanase (CHOI et al., 2005).

A produção de amilase foi avaliada utilizando um meio de cultivo adaptado de Looder (1970) contendo: 2,0 % de amido solúvel (Sigma, S-9765); 0,5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,0 % de KH_2PO_4 ; 1,8% de ágar. Após incubação, o meio de cultura foi recoberto com Lugol diluído (0,5% de KI e 0,25% de I_2). Colônias produtoras de amilase foram consideradas positivas quando observado halos claros ao redor das colônias.

As pectinases foram avaliadas frente a dois substratos: ácido poligalacturônico (Sigma, P-3889) e pectina de maçã (Sigma, P-8471). A atividade de poligalacturonase seguiu método proposto por McKay (1988). Foi preparado um meio basal contendo 0,67 g de YNB, 0,2 g glicose; 0,5 g agarose em 50 mL de KH_2PO_4 (100 mM). Separadamente, foi preparada uma solução contendo ácido poligalacturônico (1,25 g ácido poligalacturônico em 50 mL de água destilada) com pH ajustado para 5,5 com KOH (1,0 M). Após esterilização, as duas soluções foram misturadas e vertidas em placas de Petri. O resultado foi revelado adicionando solução de vermelho de rutênio (0,1%) ao meio de cultura durante 5 minutos. Após, a solução foi removida e as placas foram lavadas com água destilada. Foram considerados resultados positivos halos de coloração roxa ao redor das colônias (McKAY, 1988). A hidrólise da pectina foi avaliada segundo método de Oliveira et al. (2006). Foi preparado o meio basal descrito anteriormente e separadamente foi preparada uma solução de pectina (1,0 g de pectina de maçã em 50 mL de água destilada). Após esterilizado em autoclave, os dois

conteúdos foram misturados e vertidos em placas de Petri. Os resultados foram analisados segundo descrito para atividade de poligalacturonase. Halos claros ao redor das colônias foram considerados indicativos para a produção de pectinase.

Para avaliar a produção de lipase foi utilizado o meio contendo: 0,67% de YNB; 0,05% de extrato de levedura e 1,5% de ágar (pH ajustado para 7,0 com NaCl). Esse meio foi autoclavado em alíquotas de 30 mL durante 15 min. a 121° C. Após, foi resfriado e mantido a 60 °C, e então adicionado 0,94 mL de azeite de oliva purificado e 0,3 mL de solução de Rodamina B (10 mg de rodamina B em 10 mL de etanol absoluto) para cada 30 mL de meio. O meio foi agitado vigorosamente e vertido nas placas de Petri. Estirpes produtoras de lipase apresentaram halos fluorescentes ao redor das colônias quando expostas à luz UV (350 nm) (KOUKER; JAEGER, 1987).

A atividade ligninolítica foi avaliada de duas maneiras: i) degradação do corante Remazol Brilliant Blue – R (RBB-R) e (ii) a oxidação do guaiacol. Ambos os testes são indicativos para a seleção de micro-organismos capazes de quebrar moléculas complexas como a lignina (OKINO et al., 2000). Os meios consistiram de: 0,67% de YNB; 1,0% de glicose; 0,2% de peptona; 0,1% de extrato de levedura; 1,8% de ágar; 0,03% do substrato (RBB-R, Sigma, R-8001 ou guaiacol, Sigma, G5502). As placas foram incubadas por até 21 dias e a formação de halos claros ao redor das colônias nas placas contendo o corante RBB-R indicou a produção de ligninase, assim como a coloração avermelhada ao redor das colônias nas placas contendo guaiacol indicou a produção de fenol oxidases (ligninase).

4.3.2 Assimilação de fontes de carbono

Foram preparadas suspensões das estirpes de leveduras em poços de placas de Elisa contendo 0,67% de YNB adicionado de 0,1% de glicose as quais foram incubadas por 24 horas a 25 °C. Após incubação, as suspensões foram transferidas com auxílio de um replicador para placas de Petri contendo os meios 0,67% de YNB, 1,5% de ágar e 0,5% das respectivas fontes de carbono a serem testadas: glicose, ácido galacturônico, celobiose, maltose e xilose (YARROW, 1998). As suspensões também foram replicadas em placas de Petri sem a adição de fonte de carbono (controle negativo). As placas foram incubadas a 25° C e as leituras para verificar assimilação das fontes de carbono foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias de incubação.

4.3.3 Ensaios enzimáticos: Pectinases

Estirpes de leveduras dos gêneros *Pseudozyma* e *Sporisorium* produzindo pectinases foram selecionadas para determinação quantitativa da atividade de pectato-liase e poligalacturonase. As enzimas foram obtidas seguindo o método proposto por McKay (1988) para poligalacturonase e Oliveira et al. (2006) para pectato-liase. Para poligalacturonase foi preparado um meio contendo 0,67 g de YNB, 0,2 g glicose; 1,25 g ácido poligalacturônico em 100 mL de KH_2PO_4 (100 mM) com pH ajustado para 5,5 com KOH (1,0 M) e esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 110° C. Para pectato-liase foi preparado um meio contendo 0,67 g de YNB, 0,2 g glicose; 1,0 g de pectina de maçã em 100mL de KH_2PO_4 (50 mM) com pH ajustado para 5,5 com KOH (1,0 M) e esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121° C. Uma suspensão celular com concentração de 10^6 cel/mL foi preparada e 1 mL foi inoculado em frascos Erlenmeyer contendo 24 mL de meio. Os frascos foram incubados a 25° C em Shaker (agitador rotativo) com agitação de 150 rpm durante três dias. Após esse período, alíquotas de 1 mL foram centrifugadas a 15.000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi usado como fonte de enzima extracelular e dosagem de açúcares redutores. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A atividade enzimática foi testada usando 2 mg/mL de pectina de maçã como substrato para pectato-liase e 2 mg/mL de ácido poligalacturônico como substrato para poligalacturonase, diluídos em tampão fosfato citrato pH 5,5 (SAMBROOK et al., 1989). A reação continha 80 μL de substrato e 20 μL de extrato enzimático, incubados a 25° C por uma hora, e interrompida pela adição de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). A atividade de pectinases foi determinada a partir de uma curva padrão de ácido galacturônico. A quantidade de ácido galacturônico liberado foi medido em espectrofotômetro a 575 nm, e uma unidade de atividade (U) de pectinase foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μmol de ácido galacturônico por minuto de reação e por mL de extrato bruto (caldo fermentativo).

A estirpe *Pseudozyma* sp. ATT 068 (MENDES et al., 2012) foi usada nos testes afim de comparar a atividade enzimática desta estirpe com as investigadas nestes ensaios enzimáticos.

A quantificação de açúcares redutores totais foi realizada utilizando-se o reagente DNS de acordo com Miller (1959). Uma alíquota de 100 μL de extrato enzimático foi adicionada a 100 μL de DNS, e as leituras de absorbância realizadas em

espectrofotômetro a 575 nm. Os meios contendo ácido poligalacturônico e pectina de maçã sem inóculo foram usados como controle.

Para o cálculo da atividade enzimática, o açúcar redutor no meio fermentado foi determinado antes da determinação da atividade enzimática, e este foi descontado dos valores de atividade enzimática.

As estirpes que produziram maiores quantidades de enzimas foram selecionadas para testar a produção de poligalacturonase e pectato-liase nos meios propostos por McKay (1988) e Oliveira et al. (2006), com alteração da concentração de glicose para 2%, para verificar se a produção das enzimas era aumentada.

4.3.4 Análises dos dados

Análises estatísticas dos resultados de atividades enzimáticas foram realizadas no software R (Team, 2013) usando teste de Tukey com a análise das variâncias ($P < 0,05$). Os dados foram avaliados separadamente, mas sempre entre dois grupos distintos, um sendo o controle (sem inóculo) e o outro sendo uma das amostras.

4.4 Resultados

Setecentas e onze estirpes, pertencentes a 52 espécies de leveduras foram testadas para atividade de celulase, amilase, xilanase, poligalacturonase, pectato-liase, lipase, ligninase, lacase, e assimilação de glicose, celobiose, ácido galacturônico, maltose e xilose (Apêndice B). Seiscentas e setenta e oito estirpes (95,3%) apresentaram resultado positivo para pelo menos uma das enzimas avaliadas. *Coniochaeta canina* e *Dothichiza pithiophyla*, foram as únicas espécies que conseguiram produzir todas as enzimas avaliadas (Tabela 1). Espécies dos gêneros *Aureobasidium*, *Meyerozyma*, *Cryptococcus* e *Trichosporon*, produziram pelo menos cinco das oito enzimas avaliadas. Entre as espécies mais abundantes nos ninhos de *A. balzani*, *A. pullulans* foi o maior produtor de celulase (96%) e amilase (61%), enquanto a maior produção de xilanase e poligalacturonase foi observada em estirpes de *Cr. laurentii* (89%) e (75%), respectivamente (Fig. 1). Pectato-liase e ligninase foram produzidas principalmente por *Sporidiobolus ruinanie* (82%) e (61%), respectivamente. A maior produção de lipase foi observada em estirpes de *T. mycotoxinivorans* (87%) (Fig. 1).

Tabela 1- perfil enzimático de leveduras isoladas de ninhos de *A. balzani*.

Táxons	Total de estirpes testadas	Estirpes Positivas							
		CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)
<i>Aureobasidium leucospermi</i>	1	1	1	1	-	-	-	-	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	49	47	30	39	-	21	25	-	-
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	16	16	13	16	-	6	3	2	-
<i>Aureobasidium</i> sp.	12	10	1	10	-	9	4	2	1
<i>Brettanomyces naardenensis</i>	4	-	-	3	1	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	20	1	-	13	9	1	2	-	-
<i>Candida carpophila</i>	2	-	-	2	2	-	-	-	-
<i>Candida cellae</i>	8	-	-	-	-	4	8	-	-
<i>Candida infanticola</i>	2	1	-	2	1	1	-	-	-
<i>Candida maltosa</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida melibiosica</i>	14	4	-	12	1	5	-	-	-
<i>Candida orthopsilosis</i>	5	2	-	4	-	-	2	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	1	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	4	-	-	2	-	-	-	-	-
<i>Coniochaeta canina</i>	10	9	2	10	6	3	1	3	1
<i>Dothichiza pithyophila</i>	24	12	4	15	1	18	3	23	14
<i>Exophiala bergeri</i>	1	1	-	1	-	-	-	-	1
<i>Kazachstania unispora</i>	7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kazachstania</i> sp.	14	3	-	13	2	-	-	-	-
<i>Meyerozyma caribbica</i>	56	25	15	41	25	19	17	1	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	13	8	-	1	8	7	-	-	-
<i>Starmerella</i> sp.	15	-	-	15	-	-	-	-	-
<i>Torulaspora globosa</i>	3	3	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bullera</i> sp.	1	-	1	1	1	-	-	-	-
<i>Cryptococcus flavescens</i>	3	2	-	3	3	-	-	-	-
<i>Cryptococcus flavus</i>	5	2	4	5	3	-	1	-	-
<i>Cryptococcus heveanensis</i>	1	1	-	1	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus laurentii</i>	131	59	-	116	98	30	35	-	-
<i>Cryptococcus mangaliensis</i>	12	1	1	12	7	2	1	5	-
<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	2	-	-	-	2	2	2	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp.	21	2	-	15	18	-	-	1	-
<i>Kwoniella mangroviensis</i>	16	-	-	2	4	2	-	-	-
<i>Moniliella fonsecae</i>	1	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Pseudozyma aphidis</i>	1	-	-	1	1	1	-	-	-
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	9	4	-	9	8	8	-	3	-
<i>Pseudozyma jejuensis</i>	5	3	-	3	5	5	-	-	-
<i>Pseudozyma parantarctica</i>	1	-	1	1	1	1	-	-	-
<i>Pseudozyma shanxiensis</i>	1	-	1	-	1	1	-	-	-
<i>Rhodotorula dairenensis</i>	4	-	-	-	1	3	-	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3	-	-	-	3	1	3	-	-
<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	4	1	-	-	-	-	3	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp.	5	3	-	4	2	2	1	-	-
<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	40	32	-	27	12	2	-	-	-
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	11	7	-	5	8	7	-	-	-

Tabela 1 – cont.

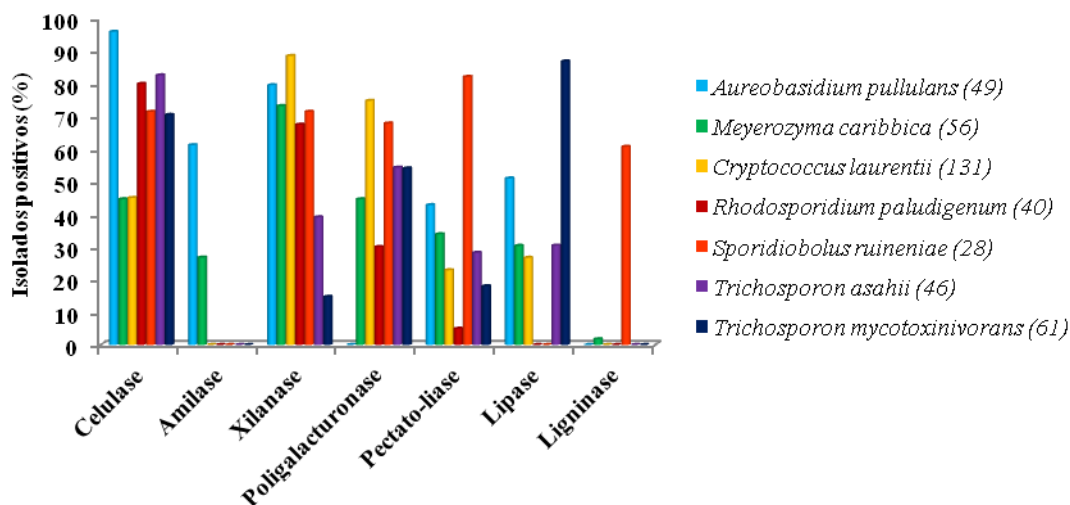
Táxons	Total de estirpes testadas	Estirpes Positivas							
		CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	28	20	-	20	19	23	-	17	-
<i>Sporisorium chrysopogonis</i>	1	-	-	-	1	1	-	-	-
<i>Sporisorium elionuri</i>	11	7	-	4	10	8	4	-	-
<i>Trichosporon asahii</i>	46	38	-	18	25	13	14	-	-
<i>Trichosporon chiarelli</i>	1	-	-	-	1	-	1	-	-
<i>Trichosporon insectorum</i>	1	1	-	1	-	-	-	-	-
<i>Trichosporon loubieri</i>	1	1	-	1	-	1	1	-	-
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	61	43	-	9	33	11	53	-	-
TOTAL	711	370	74	458	323	218	186	57	17
Estirpes positivas (%)		52	10,4	64,4	45,2	30,6	26,1	8	2,4

CMC: CMCase, AM: amilase, XIL: xilanase, PG: poligalacturonase, PL: pectato-liase, LIP: lipase, LIG: ligninase, LAC: Lacase

Entre as linhagens positivas, as enzimas produzidas com maior frequência foram xilanase (64,4%), celulase (52%) e poligalacturonase (45,2%). Pectato-liase e lipase foram produzidas por 30,6% e 26,1% das estirpes, respectivamente (Tabela 1). As enzimas amilase (10,4%), ligninas (8%) e lacase (2,4%) foram produzidas com menor frequência.

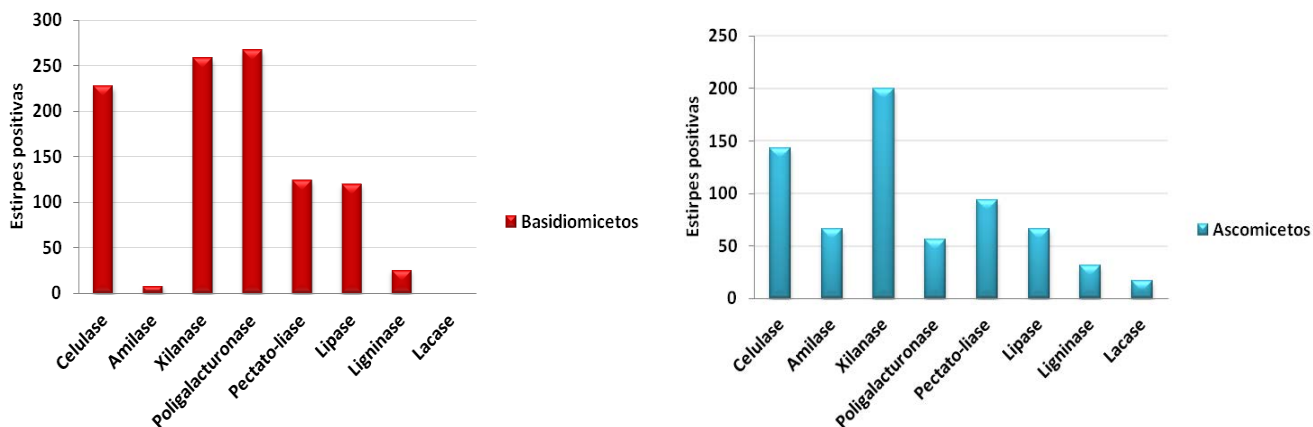
Nenhuma estirpe de *Candida maltosa* e *Kazachstania unispora* produziu enzimas (Tabela 1). Ainda, algumas estirpes das espécies *Aureobasidium* sp., *A. pullulans*, *C. melibiosica*, *C. tropicalis*, *Kazachstania* sp., *Kwoniella mangroviensis*, *Meyerozyma caribbica*, *Rhodospiridium paludigenum* e *Sporidiobolus ruineniae* não produziram nenhuma das enzimas avaliadas.

Figura 1 – produção de enzimas por leveduras prevalentes em ninhos de *A. balzani*.



Das 711 estirpes avaliadas, 284 eram de leveduras ascomicetas, compostas por 23 diferentes espécies, enquanto as basidiomicetas consistiam de 427 estirpes, pertencentes a 29 espécies (Tabela 1). Quando comparada a produção enzimática entre ascomicetos e basidiomicetos, foi observado que os ascomicetos apresentaram a maior produção de amilase, ligninases e lacase (Fig. 2), enquanto a produção de celulase, poligalacturonase, e lipase foi observada principalmente entre os basidiomicetos. A produção de xilanase e pectato-liase foram semelhantes entre esses dois grupos.

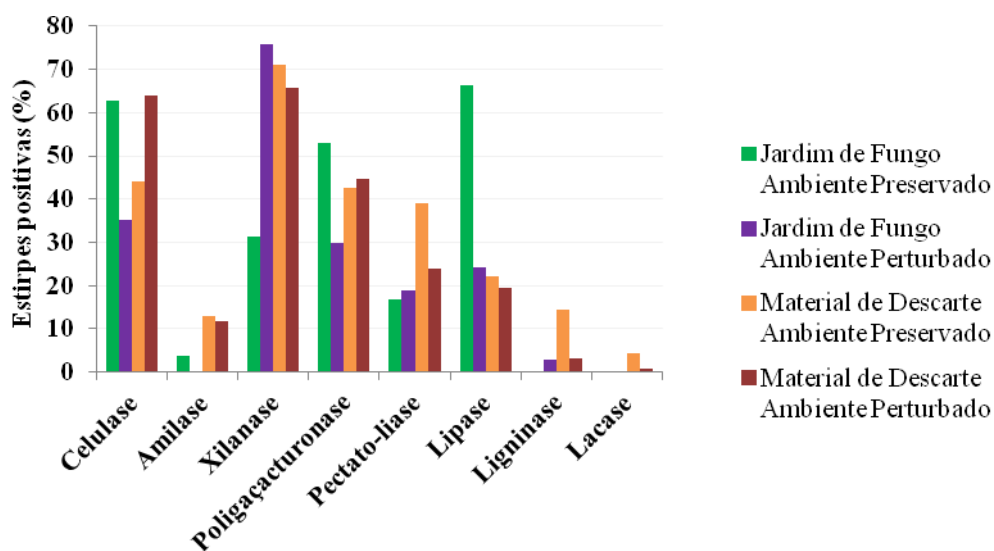
Figura 2- Produção de enzimas por leveduras ascomicetas e basidiomicetas isoladas de ninhos de *A. balzani*.



Ao comparar a produção de enzimas por leveduras isoladas dos jardins de fungo de área preservada e perturbada com o material de descarte desses dois ambientes, foi observado que as leveduras encontradas em jardins de fungo e no material de descarte produziram celulase, xilanase e poligalacturonase em grandes proporções (Fig. 3). A produção de lipase ocorreu principalmente em jardim de fungo de área preservada, enquanto amilase, pectato-liase e ligninase tiveram sua maior produção por estirpes isoladas do material de descarte de área preservada. Nenhuma estirpe de levedura de jardim de fungo produziu lacase, sendo observada apenas no material de descarte de área preservada e perturbada (Fig. 3).

A habilidade para assimilar fontes de carbono como glicose, celobiose, xilose, ácido galacturônico, e maltose, geradas pela degradação de polímeros mais complexos como celulose, xilana, pectina e amido, foi testada, e verificamos que todas as estirpes assimilaram glicose, conforme esperado (Apêndice B). Xilose foi assimilada por 88,3% das estirpes, e celobiose, maltose e ácido galacturônico foram assimiladas por 87,6%, 82,5% e 75,6% das estirpes avaliadas, respectivamente.

Figura 3 – Produção de enzimas por leveduras isoladas de jardins de fungo e material de descarte de ninhos de *A. balzani* em área preservada e perturbada de cerrado.

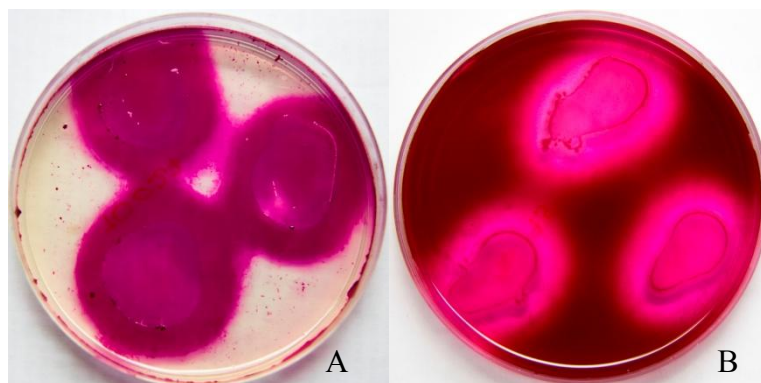


4.4.1 Ensaio enzimático: Pectinases

As atividades das enzimas poligalacturonase e pectato-liase foram quantificadas para 29 estirpes de leveduras que apresentaram halos de degradação acima de 8 mm

(Fig. 4), sendo 17 estirpes pertencentes ao gênero *Pseudozyma* e 12 ao gênero *Sporisorium*.

Fig. 4 – Halo de degradação ao redor de leveduras dos gêneros *Pseudozyma* e *Sporisorium* produzindo poligalacturonase (A) e pectato-liase (B).



A maior atividade de pectato-liase em meio com 0,2% de glicose foi observada para *Pseudozyma jejuensis* estirpe TO 1057 (0,398 U/mL), seguida de *P. jejuensis* TO 078 (0,370 U/mL), *P. hubeiensis* TO 192 (0,360 U/mL) e *P. jejuensis* TO 080 (0,313 U/mL). Para o gênero *Sporisorium*, a maior atividade de pectato-liase foi observada em *S. chrysopogonis* TO 027 (0,312 U/mL). Cerca de 58,6% das estirpes testadas exibiram atividade pectato-liase acima de 0,2 U/mL (Tabela 2), e as estirpes que apresentaram diferença significativa em relação a estirpe *Pseudozyma* sp. ATT 068 (MENDES et al., 2012) usada como controle, foram selecionadas para testes com 2% de glicose no meio, a fim de verificarmos se a produção de enzima era aumentada com o aumento da glicose.

A atividade de poligalacturonase acima de 0,1 U/mL foi observada em apenas três estirpes de leveduras dentre as 29 testadas. *Sporisorium chrysopogonis* TO 027 (0,182 U/mL), apresentou a maior atividade de poligalacturonase em meio com 0,2% de glicose (Tabela 2). *Pseudozyma aphidis* TO 189 e *P. hubeiensis* TO 028 apresentaram atividade de 0,143 U/mL. A atividade enzimática das três estirpes não foi significativamente diferente ($P < 0,05$).

Tabela 2 - Atividade enzimática de poligalacturonase e pectatoliase de estirpes de leveduras dos gêneros *Pseudozyma* e *Sporisorium* em concentrações de 0,2% de glicose.

Espécies de leveduras	Estirpe	Meio de indução para Pectato-liase		Meio de indução para Poligalacturonase	
		AR (mg/mL)	PL (U/mL)	AR (mg/mL)	PG (U/mL)
Meio de cultivo sem inóculo	-	0,206	-	0,206	-
<i>Pseudozyma</i> sp.	ATT 068 ^a	0,203	0,207	0,131	0,071
<i>Pseudozyma aphidis</i>	TO 189*	0,217	0,255	0,129	0,143
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	TO 028*	0,130	0,278	0,129	0,143
	TO 082*	0,132	0,280	0,149	0,049
	TO 105	0,125	0,170	0,131	0,077
	TO 107*	0,142	0,243	0,141	0,038
	TO 188	0,122	0,125	0,140	0
	TO 192*	0,127	0,360	0,149	0
	TO 195	0,141	0,166	0,128	0,031
	TO 200	0,137	0,218	0,140	0
	TO 1056	0,136	0,204	0,138	0
<i>Pseudozyma jejuensis</i>	TO 058	0,139	0,228	0,138	0,014
	TO 066*	0,139	0,265	0,128	0
	TO 078*	0,134	0,370	0,143	0
	TO 080*	0,141	0,313	0,171	0,072
	TO 1057*	0,159	0,398	0,154	0,013
<i>Pseudozyma parantarctica</i>	TO 077	0,143	0,134	0,124	0,036
<i>Pseudozyma shanxiensis</i>	TO 1063	0,121	0,236	0,124	0,081
<i>Sporisorium chrysopogonis</i>	TO 027*	0,131	0,312	0,135	0,182
<i>Sporisorium elionuri</i>	TO 049	0,134	0,191	0,130	0,030
	TO 051	0,146	0,189	0,114	0
	TO 057	0,136	0,187	0,139	0,024
	TO 953	0,168	0,197	0,128	0
	TO 1011	0,144	0,146	0,134	0
	TO 1017	0,134	0,115	0,104	0
	TO 1018	0,141	0,132	0,099	0
	TO 1076	0,137	0,205	0,129	0
	TO 1078*	0,225	0,289	0,139	0
	TO 1080	0,129	0,169	0,124	0,010
TO 1083	0,133	0,207	0,125	0,084	

^a Estirpe selecionada do trabalho de Mendes et al. (2012) para comparar com as estirpes deste estudo; *Diferiu significativamente ($P < 0,05$) da estirpe *Pseudozyma* sp. (ATT 068) pelo teste de Tukey e foram testadas em meio indutor para produção de enzima com 2% de glicose; AR: Açúcar Redutor (ácido galacturônico); PL: Pectato-liase; PG: Poligalacturonase.

Algumas das estirpes selecionadas para atividade enzimática de pectato-liase em meio de cultivo com 2% de glicose apresentaram valores menores do que no meio com 0,2% (*P. jejuensis* TO 078, *P. jejuensis* TO 080 e *P. hubeiensis* TO 192) (Tabela 3). A concentração de glicose não alterou a atividade enzimática da estirpe *P. jejuensis* TO 1057.

A atividade de pectato-liase em meio com concentração de glicose 2% foi maior em *P. aphidis* TO 189 (0,747 U/mL) e *S. chrysopogonis* TO 027 (0,855 U/mL). A

atividade de poligalacturonase neste meio foi maior em *S. chrysopogonis* TO 027 (0,797 U/mL) (Tabela 3).

Tabela 3 - Atividade enzimática de poligalacturonase e pectatoliase de estirpes de leveduras dos gêneros *Pseudozyma* e *Sporisorium* em concentrações de 2% de glicose.

Espécies de leveduras	Estirpe	Meio de indução para Pectato-liase		Meio de indução para Poligalacturonase	
		AR (mg/mL)	PL (U/mL)	AR (mg/mL)	PG (U/mL)
Meio de cultivo sem inóculo	-	1,96	-	2,18	-
<i>Pseudozyma</i> sp.	ATT 068	0,213	0,102	0,164	0,443
<i>Pseudozyma aphidis</i>	TO 189	0,220	0,747	0,132	0,487
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	TO 028	0,194	0,142	0,146	0,065
	TO 082	0,183	0,077		
	TO 107	0,205	0,075		
	TO 192	0,226	0,066		
<i>Pseudozyma jejuensis</i>	TO 066	0,270	0,288		
	TO 078	0,221	0,240		
	TO 080	0,198	0,112		
	TO 1057	0,261	0,346		
<i>Sporisorium chrysopogonis</i>	TO 027	0,223	0,855	0,098	0,797
<i>Sporisorium elionuri</i>	TO 1078	0,238	0,075		

Estirpes em negrito apresentaram a maior atividade em meio com 2% de glicose; AR: Açúcar Redutor (ácido galacturônico); PL: Pectato-liase; PG: Poligalacturonase

O açúcar redutor (AR) foi analisado para determinar a quantidade de açúcar liberado na hidrólise da pectina e ácido poligalacturônico pelas estirpes de leveduras testadas. De acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$), no meio de cultivo com 0,2% de glicose, apenas a estirpe de *P. jejuensis* TO 080 (0,171 mg/mL) não diferiu do controle no teor de AR pela hidrólise do ácido poligalacturônico (Tabela 2). As demais estirpes aparentemente não liberaram AR, apenas consumiram.

Em relação ao teor de AR liberado na hidrólise da pectina, as estirpes de *P. aphidis* TO 189 (0,217 mg/mL) e *S. elionuri* TO 1078 (0,225 mg/mL) não diferiram do controle. As demais estirpes não liberaram AR a partir da hidrólise da pectina, apenas consumiram o que já tinha disponível no meio de cultivo.

Ao comparar a liberação de AR das estirpes selecionadas para os testes no meio de cultivo com 2% de glicose com o branco (meio de cultivo sem inóculo), foi observado que as estirpes apenas consumiram o açúcar disponível nos meios de indução para pectato-liase e poligalacturonase, provavelmente utilizando para seu crescimento.

4. 5 Discussão

Os ninhos das formigas da tribo Attini abrigam uma ampla diversidade de leveduras (CARREIRO et al., 1997, 2002, 2004, RODRIGUES et al., 2009; PAGNOCCA et al., 2008, 2010, 2011; MENDES et al., 2012), as quais provavelmente participam da degradação do material vegetal levado para dentro dos ninhos pelas formigas operárias, tornando um ambiente propício para a obtenção de leveduras com potencial para degradar polímeros vegetais (MENDES et al., 2012).

Um estudo recente de Moller et al. (2011) sugere que grandes quantidades de polímeros vegetais como xilana e celulose, permanecem como resíduos no material de descarte que as formigas removem para fora de seus jardins de fungo. Assim, comunidades de micro-organismos, incluindo leveduras, se desenvolvem neste ambiente, explorando um nicho que o jardim de fungo não utiliza. Portanto, as espécies de leveduras encontradas no material de descarte podem ser em grande parte provenientes do jardim de fungo, descartadas juntamente com os resíduos, ou podem se estabelecer posteriormente, pois em ninhos de *A. balzani* o material de descarte está exposto ao ambiente externo, facilitando o acesso de outros insetos e assim possibilitando que o mesmo receba continuamente novos micro-organismos.

Alguns estudos sugerem que a atividade celulolítica nos jardins de fungos pode ser proveniente da complexa microbiota encontrada nesse micro-habitat, incluindo bactérias e leveduras (BACCI JÚNIOR. et al., 1995; SUEN et al., 2010; MOLLER et al., 2011; MENDES et al., 2012). Mendes et al. (2012) mostraram que 43% das estirpes isoladas de ninhos de *A. texana* e 89% das estirpes de leveduras isoladas de espécies do gênero *Acromyrmex* produzem celulasas, podendo contribuir para a degradação da celulose presente nos jardins de fungo. A elevada proporção de estirpes produtoras dessa enzima (63% e 35%, fig. 3) nos jardins de fungo de *A. balzani* pode também contribuir para a degradação desse polímero, facilitando a liberação de compostos mais assimiláveis, sugerindo uma possível função para essas leveduras dentro dos ninhos das formigas cortadeiras.

A produção de celulase foi observada em maior proporção em estirpes de *A. pullulans*, que exibiu ainda, outras enzimas extracelulares como amilase, xilanase e pectato-liase. A maior produção de amilase também foi observada neste gênero, seguido de *M. caribbica*. Entretanto, a produção de amilase foi rara em estirpes isoladas de ninhos de *A. balzani* e está de acordo como o trabalho de Buzzini e Martini (2002), que

mostraram que a atividade da degradação do amido é rara entre leveduras ascomicetas e basidiomicetas.

Aureobasidium é um gênero ubíquo encontrado em ambientes como a filosfera e sobre superfície de frutos e folhas (SCHENA et al., 1999; ANDREWS et al., 1994), e tem sido registrado frequentemente em ninhos de formigas cortadeiras (CARREIRO et al., 2002; PAGNOCCA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009). O frequente isolamento deste gênero associados às formigas cortadeiras e o alto percentual de estirpes produtoras de enzimas extracelulares encontrado neste estudo, indicam seu envolvimento na degradação do material vegetal nos ninhos das formigas Attini.

Xilanase foi produzida por um grande número de estirpes (64,4%) (Tabela 1). Embora esta seja a segunda enzima mais produzida pelo fungo mutualista (SIQUEIRA et al., 1998), Mendes et al. (2012) observaram que 59% das leveduras isoladas de jardim de *A. texana* produziram xilanase, e que as leveduras que degradam xilana podem contribuir para a degradação da hemicelulose presente no material vegetal usado pelo fungo mutualista.

A maior produção de xilanase foi observada em estirpes de *Cr. laurentii*, seguido de *A. pullulans*. *Cryptococcus laurentii* é amplamente distribuído no ambiente e tem sido registrado em ninhos de formigas Attini (CARREIRO et al., 1997; RODRIGUES et al., 2009; PAGNOCCA et al., 2010, 2011; MENDES et al., 2012), mas também é comumente encontrado no solo, pastagens e no filoplano (SLAVIKOVA et al., 2009; FONSECA e INÁCIO, 2006), e assim como *Aureobasidium* pode ser transportado para o interior dos ninhos através do material coletado pelas formigas operárias, provavelmente atuando na degradação dos polissacarídeos da parede celular vegetal.

Cryptococcus laurentii também foi o maior produtor de poligalacturonase. Esta enzima foi raramente exibida por estirpes ascomicetas, com elevada produção por estirpes basidiomicetas (Fig. 2).

Em relação à enzima pectato-liase, a maior produção foi exibida principalmente por estirpes de leveduras basidiomicetas (Fig. 2), sendo *S. runeniae* a espécie que apresentou proporcionalmente a maior produção desta enzima (Fig. 2). *Sporidiobolus runeniae* tem sido isolada de diferentes ambientes como solos de jardins, ar e folhas de diferentes espécies de plantas (VALÉRIO et al., 2002), e tem sido registrada produzindo enzimas extracelulares, principalmente proteases (KIM, 2009; 2010).

Enzimas pectinolíticas desempenham um importante papel nos ninhos das formigas cortadeiras, pois promovem a degradação das substâncias pécicas presentes na lamela media da parede celular vegetal, facilitando o acesso do fungo cultivado aos outros polissacarídeos das folhas (SIQUEIRA et al., 1998). A proporção de leveduras que degradaram poligalacturonase e pectato-liase nos jardins de fungo em ninhos de *A. balzani* foi de 45,8% e 17,5%, respectivamente. Estas leveduras possivelmente podem estar contribuindo com degradação da pectina nos jardins.

A produção de lipase tem sido observada em leveduras originárias de diferentes fontes naturais, tais como florestas tropicais brasileiras, plantas que crescem em climas áridos e águas glaciais e subglaciais (MIDDELHOVEN et al., 1997; BRIZZIO et al., 2007; VILLENA et al., 2007). No entanto, nenhum trabalho até o momento, avaliou a produção de lipases a partir de leveduras isoladas de ninhos de formigas cortadeiras. Nosso estudo mostrou que estirpes de leveduras isoladas de jardim de fungo de área preservada e perturbada de ninhos de *A. balzani* produziram lipase a partir da hidrólise da trioleína (66% e 24%, respectivamente). Este resultado está de acordo com o estudo de Molnárová et al. (2013), que recuperaram um número elevado de leveduras lipolíticas a partir de folhas, e que isto pode ser explicado pela capacidade dessas leveduras utilizarem ácidos graxos liberados pelas plantas.

Leveduras basidiomicetas exibiram a maior produção de lipase nos jardins de fungo de *A. balzani* (Fig. 2), sendo *T. mycotoxinivorans* a espécie que proporcionalmente apresentou a maior atividade lipolítica. Portanto, é esperado que as leveduras recuperadas de ninhos desta formiga atuem na quebra do material lipídico presente no substrato vegetal incorporado nos jardins de fungos das formigas cortadeiras.

Embora seja provável que os polímeros recalcitrantes da parede celular vegetal não sejam degradados em quantidades expressivas e se acumulem na parte mais velha dos jardins de fungo (SUEN et al., 2010), o recente trabalho de Aylward et al. (2013) indicou que o fungo mutualista *L. gongylophorus* produz lignocelulases e que a produção e secreção dessas enzimas em resposta a disponibilidade de nutrientes é crucial para o eficiente processamento da biomassa. Ainda assim, algumas leveduras recuperadas do jardim de fungo podem estar contribuindo para a degradação desses polímeros lignocelulósicos, pois cerca de 3% do total de estirpes produziram enzimas do grupo das ligninases.

Lacase foi a única enzima produzida somente por estirpes recuperadas no material de descarte. De Fine Licht et al. (2013) confirmaram a produção de lacases pelo fungo mutualista *L. gongylophorus*. No entanto, os autores sugerem que a produção desta enzima não é utilizada na degradação de polissacarídeos recalcitrantes lignocelulósicos, e sim para destoxificação de compostos vegetais secundários, como compostos fenólicos tóxicos para o fungo mutualista e para as formigas.

Nossos resultados mostraram que os açúcares gerados na degradação dos polissacarídeos vegetais podem ser em grande parte assimilados pelas espécies de leveduras presentes nos ninhos de *A. balzani* (Apêndice B). Este resultado sugere que assim como as leveduras podem contribuir para a degradação do material vegetal, elas também podem consumir os compostos açucarados liberados nessa degradação, competindo com o fungo mutualista e outros micro-organismos presentes no interior dos ninhos. Por outro lado, podem contribuir substancialmente na destoxificação do jardim de fungo, pois 75,6% das estirpes assimilaram o ácido galacturônico, produto gerado na degradação do ácido poligalacturônico que é pouco assimilado pelo fungo mutualista (SIQUEIRA et al., 1998) e tóxico para as formigas (SILVA et al., 2003).

Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Mendes et al. (2012), que ao avaliarem a capacidade de leveduras isoladas dos jardins de fungo de formigas cortadeiras em assimilar o ácido galacturônico, encontraram que 64% das leveduras isoladas de ninhos de *A. texana* e 79% de leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex* spp. assimilaram esse composto. Assim, os autores sugerem que estas leveduras auxiliam na remoção deste composto dos jardins de fungo.

Interessantemente, ao avaliarmos a liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise da pectina e ácido poligalacturônico em estirpes de leveduras dos gêneros *Pseudozyma* e *Sporisorium* (Tabela 2) foi observado que a maior parte dessas estirpes consomem todo o açúcar liberado na hidrólise desses polissacarídeos. Assim, este resultado pode ser mais uma evidência de que as leveduras de ninhos de formigas cortadeiras realmente desempenham a função de destoxificação do jardim de fungo, confirmando os resultados de Mendes et al. (2012).

Este estudo também revelou a atividade enzimática de pectato-liase e poligalacturonase de 17 estirpes de leveduras do gênero *Pseudozyma* e 12 estirpes de *Sporisorium* spp. Pectinases tem ampla aplicação na indústria de alimentos para clarificação de sucos de frutas, vinhos, café, fermentação de chá, e também na degomagem de fibras de linho (WHITAKER, 1984; ALKORTA et al., 1998; SHARMA

et al., 2011) e sua produção tem sido amplamente registradas em bactérias e fungos filamentos (PEDROLI et al., 2008), no entanto, os registros de leveduras produzindo essas enzimas são poucos (SHARMA et al., 2012).

A mais alta atividade de pectato-liase foi observada em meio com 2% de glicose, nas estirpes de *S. chrysopogonis* TO 027 e *P. aphidis* TO 189 (Tabela 3). A atividade de poligalacturonase foi maior em *S. chrysopogonis* TO 027. Estes resultados mostraram que a concentração de glicose de 2% influenciou positivamente na produção enzimática destas estirpes, e está de acordo com o estudo de Blanco et al. (1999) que mostraram que a atividade de poligalacturonase é maior quando a levedura cresce em 2% de glicose, do que em quantidades menores.

Sporisorium chrysopogonis TO 027 e *P. aphidis* TO 189 exibiram atividade de pectato-liase e poligalacturonase acima de 0,750 U/mL e por isso podem ser exploradas para um melhor desempenho em aplicações biotecnológicas.

Informações sobre enzimas pectinolíticas produzidas por estirpes de *Pseudozyma* e *Sporisorium* ainda são limitadas. Além disso, o rendimento enzimático é baixo (SILVA et al. 2005). No entanto, Sharma et al. (2012) utilizando vários resíduos agroindustriais baratos e facilmente disponíveis como substratos para a produção de pectinase em fermentação em estado sólido, observaram que *Pseudozyma* sp. SPJ obteve um alto rendimento (15 U/mg de substrato sólido), a partir de cascas de frutas cítricas.

Outro trabalho investigando a produção de pectinase por *Pseudozyma* sp. SPJ para degomação de fibra de linho mostrou que uma dose de enzima de 80 g L⁻¹ de fibra após incubação de 6 h a 45° C, liberou a maior quantidade de ácido galacturônico (10.825,5 ± 34,2 µg g⁻¹ de fibra seca), e que esta quantidade foi ainda maior quando a dose de enzima foi aumentada (SHARMA et al., 2011).

Os valores de atividade de pectato-liase e poligalacturonase obtidos a partir das estirpes testadas neste trabalho podem ser devido às condições de cultivo utilizadas no processo ou alguns fatores intrínsecos a reação enzimática como: temperatura, pH, tipo de substrato, concentração do substrato bem como a presença de outras proteínas que podem influenciar nas reações. Atividades maiores de pectato-liase e poligalacturonase provavelmente podem ser obtidas se estas condições forem otimizadas e as enzimas purificadas.

A produção de enzimas a partir de estirpes de leveduras recuperadas no material de descarte foi tão elevada quanto às estirpes dos jardins de fungo. Esses resultados

forneem fortes evidências de que as leveduras encontradas em ninhos de *A. balzani* podem desempenhar um importante papel na degradação do material vegetal nos ninhos de formigas cortadeiras, liberando compostos de fácil assimilação, que contribuem para a manutenção do fungo mutualista e de outros micro-organismos envolvidos na simbiose, e também no material de descarte, auxiliando na degradação dos resíduos despejados do jardim pelas formigas operárias, contribuindo para a estruturação da comunidade microbiana presente neste ambiente, e auxiliando substancialmente na ciclagem de nutrientes.

Nosso estudo deixa claro ainda, que as leveduras isoladas de ninhos de *A. balzani* de áreas preservada e perturbada de cerrado produzem uma ampla gama de enzimas extracelulares, demonstrando assim que essas leveduras representam uma fonte de enzimas potencialmente explorável para fins biotecnológicos.

5

Capítulo 3

Starmerella aceti* f.a., sp. nov., a new ascomycetous yeast species isolated from fungus garden of the leafcutter ant *Acromyrmex balzani

Starmerella aceti* f.a., sp. nov., an ascomycetous yeast species isolated from fungus garden of the leafcutter ant *Acromyrmex balzani

Weilan G. P. Melo¹, Silvio L. Arcuri¹, André Rodrigues^{1,2}, Paula B. Morais³, Lucas A. Meirelles², Fernando C. Pagnocca^{1,2}

¹Instituto de Biociências de Rio Claro, UNESP Univ Estadual Paulista, Campus Rio Claro, Centro de Estudos de Insetos Sociais, Avenida 24A, 1515 Rio Claro, SP 13506-900, Brazil

²Instituto de Biociências de Rio Claro, UNESP Univ Estadual Paulista, Campus Rio Claro, Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Avenida 24A, 1515 Rio Claro, SP 13506-900, Brazil

³Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biologia, Campus Universitário de Palmas, Fundação Universidade Federal do Tocantins, Palmas, Tocantins 77010-154, Brazil

Running title: *Starmerella aceti* sp. nov.

Keywords: Yeast taxonomy, Attini, acetic acid tolerance

Correspondence:

Weilan Gomes da Paixão Melo

weilan@rc.unesp.br

Tel.: +55 19 3526-4167; Fax: +55 19 3526-4384

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the sequences of the large subunit rRNA gene D1/D2 domains and the ITS region of the strain TO 125 are KF247224 and KF271437, respectively.

5.1 Abstract

A new yeast species was recovered from the fungus garden of the leaf-cutting ant *Acromyrmex balzani* (Hymenoptera: Formicidae). The growth of the new yeast species is limited to a few carbon and nitrogenous compounds. A remarkable characteristic of this strain is the vigorous growth in 1% acetic acid. Sequence analysis of the D1/D2 domains of the large subunit rRNA gene, showed that these new species belong to the *Starmerella* clade and were found to be phenotypically and genetically divergent from currently recognized species in this clade. Described here as *Starmerella aceti* f.a., sp. nov., it differs by 37 nucleotide substitutions in the D1/D2 region from *Starmerella jinningensis* CBS 11864^T, its closest relative species. The type strain of *Starmerella aceti* sp nov. is TO 125^T (= CBMAI 1594^T = CBS 13086).

5.2 Introduction

Besides the mutualistic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*, Attini ant colonies support a diverse community of microorganisms (Mueller *et al.*, 2005; Youngsteadt, 2008), including a rich diversity of yeasts (Craven *et al.*, 1970; Fisher *et al.*, 1996; Carreiro *et al.*, 1997, 2002; Little; Currie, 2007, 2008; Pagnocca *et al.*, 2008, 2010, 2011; Rodrigues *et al.*, 2009). There are no extensive studies of the diversity of yeasts associated with Attini ants but some reports have led to the discovery of three new species: *Cryptococcus haglerorum* (Middelhoven *et al.*, 2003), *Blastobotrys attinorum* (= *Sympodiomyces attinorum*; Carreiro *et al.*, 2004) and *Trichosporon chiarellii* (Pagnocca *et al.*, 2010). During a field trip in the winter of 2010 to Palmas, Tocantins, Brazil (S10°10'45" W 48°21'38"), the fungus garden of the leaf-cutting ant *Acromyrmex balzani* revealed the presence of several yeast species including three strains of a new species. Sequences of the D1/D2 domains of the large subunit rRNA gene showed that

this species belongs to the *Starmerella* clade and *Starmerella jinningensis* is its closest relative. In this paper, we provide the description of the species as *Starmerella aceti* sp. nov.

5.3 Material and Methods

The two nests of *A. balzani* were located in a disturbed area of cerrado (savanna-like) and both were excavated according to the procedures described in Rodrigues *et al.* (2009). Samples of the fungus garden and refuse deposit were aseptically collected and stored in sterile containers for transport to the laboratory. One gram of each sample was transferred to YM broth, vortexed for 1 min and ten-fold diluted. Aliquots of 100 μ l were spread in triplicate on the surface of each YM agar (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1.0% glucose, 2.0% agar; Yarrow, 1998) and MYP media (0.7% malt extract, 0.05% yeast extract, 0.25% soytone, 1.5% agar; Sampaio *et al.*, 2004), both supplemented with 0.01% chloramphenicol and pH 4.0. Plates were then incubated at 20 °C in the dark and monitored daily for 5 days. Colonies showing different morphotypes were collected as soon as it grew on plates, purified on YM agar and maintained at -80 °C in GYMP broth (2% glucose, 1% malt extract, 0.5% yeast extract, 0.2% NaH₂PO₄) containing 15% glycerol. Physiological tests were performed by replica plating on solid media and in liquid media according to the standard methods described in Kurtzman *et al.* (2011b). Colony morphology was examined after growth during 1-3 days on YM agar at 25 °C, while cell morphology was studied with a phase contrast microscope (Leica DM 750, software – Leica Application Suite v. 3.5.0) from 24 h old cultures in YM broth. Microscopic characteristics were also studied in corn meal agar after 3 days at 25 °C using the slide culture technique. Ascosporeulation was investigated using YM agar, 5% malt extract agar, acetate agar, GY agar, corn meal

agar and YCB with 0.01% ammonium sulfate (YCBAS), individually or as pairwise combination on the sporulation media, incubated at 14 °C and 25 °C and observed during six weeks.

Genomic DNA from the strains was extracted following the protocol of Sampaio *et al.* (2001). Microsatellite primed PCR (MSP-PCR) technique using the primer (GTG)₅ was used to check the similarity between isolates. Strains were identified by sequencing the D1/D2 variable region of the large subunit rRNA gene, amplified with primers NL1 and NL4 (Kurtzman & Robnett, 1998). The ITS (internal transcribed spacer) region was sequenced using primers ITS1 and ITS4 (White *et al.*, 1990). PCR was performed as previously described in Pagnocca *et al.* (2008), and the products were purified using NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, MN). Sequences were generated in ABI 3130 genetic analyzer (Life Technologies) using BigDye[®] Terminator v 3.1. Forward and reverse sequences were edited and used to assemble contigs in BioEdit v7.1.3 (Hall, 1999). The databases from the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) and the NCBI – GenBank were used to search for homologous sequences. Thirty nine sequences were selected for phylogenetic analysis and were aligned in MAFFT v7 (Kato & Stanley, 2013) and the final alignment was trimmed manually in BioEdit v7.1.3. The phylogenetic reconstruction was conducted in RAxML v7.2.8 (Stamatakis, 2006) under the maximum likelihood (ML) algorithm and sites with gaps were excluded from the analysis (the final dataset included 417 sites). Using the General Time Reversible (GTR) substitution model and GAMMA correction for the rate variation among sites, we performed a reconstruction of 1000 ML trees and the one with the best score was kept. Reliability of tree topology was evaluated by 1000 bootstrap replicates and this number proved to be sufficient under *a posteriori* evaluation (Pattengale *et al.*, 2010) of the necessary bootstrap replicates using RAxML v7.2.8 (bootstrap values

converged at 850 replicates). The best ML tree was edited in FigTree v1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) and the final polishing was carried out in Adobe Illustrator CS6.

5.4 Species delineation and ecology

Forty-one strains were isolated from the refuse deposit and fungus garden of two nests of *A. balzani*, which were distant 50 m from each other and located in a disturbed area of cerrado in Palmas, Tocantins, Brazil. From the refuse deposit of nest #1 the following yeast species were found: *Aureobasidium* sp. (2); *A. pullulans* (5) and *A. pullulans* var. *melanogenum* (1). From the refuse deposit of nest #2 the following yeast species were recovered: *Aureobasidium* sp. (n= 3 isolates); *A. pullulans* (7); *Candida parapsilosis* (1); *Cryptococcus* sp. (10); *Cryptococcus flavus* (2); *Meyerozyma caribbica* (1); *Pseudozyma aphidis* (1); *Pseudozyma hubeiensis* (4). Considering the fungus gardens of both nests four strains were isolated: *A. pullulans* (1, nest #1) and the remaining three were representatives of the new species, *Starmerella aceti*. One strain was isolated on YMA (from nest #2) and the remaining two strains were recovered from nest #1, being one the type strain TO 125, which was isolated in YMA and the other was isolated in MYP.

Probably most of the strains found in the fungus gardens are brought during the foraging by worker ants. On the other hand, *Aureobasidium* spp. and *Cryptococcus* spp. have been constantly isolated from Attini nests (Pagnocca *et al.*, 2011). *Aureobasidium* is a cosmopolitan yeast-like fungal genus, found on the surface of several fruits and vegetables (Schena *et al.*, 1999), in environments with different water activities, such as the phyllosphere (Andrews *et al.*, 1994), bathrooms, food and feeds (Samson *et al.*, 2004) and are known as a producer of the biodegradable extracellular polysaccharide

(EPS), pullulan (Zalar *et al.*, 2008). *Aureobasidium pullulans* has been recognized as a producer of amylases, β -glucosidases and pectolytic enzymes (Iembo *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2007). The genus *Cryptococcus* has a worldwide distribution and may be found in aquatic habitats, soil, plant stems and phyllosphere (Slavikova & Vadkertiova, 2000; Fonseca & Inácio, 2006). It has been frequently isolated from the fungus garden and refuses deposit of Attini ants (Carreiro *et al.*, 1997, 2002; Pagnocca *et al.*, 2008, 2010; Middelhoven *et al.*, 2003) and probably they are transported into the nests through the plant material collected by workers (Carreiro *et al.*, 1997). *Aureobasidium* and *Cryptococcus* species may play an important role in the degradation of the fresh plant material, generating nutrients and promoting detoxification in the fungus garden of leaf-cutting ants (Mendes *et al.*, 2012).

All the strains of *S. aceti* have identical morphological and physiological characteristics and the MSP-PCR fingerprint profile confirmed that they were similar. DNA sequencing of all *S. aceti* strains showed that the D1/D2 domains of the large subunit rRNA were identical and accommodated in the *Starmerella* clade. A specific subclade (highlighted in gray in Fig. 1) seems to be a consistent group within the *Starmerella* clade and clustered *S. aceti* and their closest relatives. The same subclade was found in the phylogenetic inferences published in a recent study by Daniel *et al.* (2013). Two undescribed species, *Starmerella* sp. JX 515983 and *Candida* sp. UWOPS00-107 and two known species, *Starmerella jinningensis* CBS 11864^T and *Candida bombi* CBS 5836^T are the closest relatives of the new species *S. aceti* (Fig. 1). It can be distinguished from *S. jinningensis* by the ability to ferment glucose, growth on melibiose, vitamin-free medium and 1% acetic acid and by the inability to assimilate galactose, L-sorbose, D-mannitol, succinate, xylitol, cadaverine, L-lysine, ethylamine. No growth was observed on 50% glucose neither in the presence of 0.01%

cycloheximide. *S. aceti* differed from the type strain of *S. jinningensis* CBS 11864^T in 37 substitutions (7.9%) of a dataset of 467 nucleotides and differed from the type strain of *C. bombi* CBS 5836^T in 41 substitutions (8.7%). With respect to the ITS region, its closest relative is *C. bombi*, differing in 66 substitutions (15.1 %) of a dataset of 434 nucleotide. Additionally, *C. bombi* can be distinguished from *S. aceti* based on the assimilation of L-sorbose, succinate, glycerol, D-gluconate, L-lysine, ethylamine and 50% glucose, which are positive for *C. bombi* and negative for *S. aceti*.

The genus *Starmerella* (Rosa & Lachance, 1998), including several *Candida* species, comprises more than 40 yeast species (Morais *et al.*, 2013), most of them associated with plant materials and flower-associated insects (Rosa & Lachance, 1998; Teixeira *et al.*, 2003; Sipiczki, 2013; Li *et al.*, 2013). *Starmerella aceti*, isolated from the fungus garden of the leaf-cutting ant *A. balzani*, may have its primary habitat in plants, reaching the fungus garden by the action of workers during the foraging process. *S. jinningensis* CBS 11864^T, the closest species to *S. aceti* was isolated from *Erianthus rufiplus* (Gramineae) flowers, frequently visited by insects, and they probably act as vectors of this yeast species (Li *et al.*, 2013). *C. bombi* CBS 5836^T was first isolated from a bumble bee (*Bombus* sp., Hymenoptera: Apidae; Montrocher, 1967), but its presence was also recorded from nectar of true oxlip (*Primula elatior*, Primulaceae), from proboscis and body of *Bombus cryptarum* and *B. hortorum*, from the nectar of stinking hellebore (*Helleborus foetidus*, Ranunculaceae) (Kurtzman *et al.*, 2011a). *A. balzani* has the habit of foraging monocotyledons, especially grasses (Pimenta *et al.*, 2007). The nests are usually built in open areas, in soils with low humidity, and the opening has a little tower built of straw fragments and other plant residues. The nests usually have a maximum depth of 95.0 cm with two to six round chambers with 4 to 10

cm wide (Silva *et al.*, 2010). The present study appears to be the first to assess the yeast community of this ant species.

5.5 Emendation of the genus *Starmerella* Rosa & Lachance

Rosa & Lachance (1998) in their description of the genus *Starmerella* included: vegetative reproduction is by multilateral budding, the cells range from spherical to ellipsoidal, pseudohyphae or true hyphae are not formed. To accommodate morphological variations observed in *S. aceti* CBS 13086 we propose to emend the description of the genus *Starmerella* as follows: cell division is by multilateral budding on a narrow base and occasionally by bipolar budding as shown in the figure 2.

5.6 Description of *Starmerella aceti* Melo, Morais & Pagnocca sp. nov.

Mycobank: MB 805541

Etimology: *Starmerella aceti* (a.ce'ti. L. gen. n. aceti of vinegar), referring to the ability of this yeast to grow vigorously on 1% acetic acid.

In YM broth after 24 h at 25 °C, cells are apiculate, ovoid to elongated, 2 - 3.1 x 6.6 – 7.2 µm single or in pairs. After one week, a small chain of three or four cells may be observed in corn meal agar slide culture. Vegetative reproduction is typically bipolar, including rather wide septa (Fig. 2). Sediment and a surface ring are visible after 7 days. After 3 days on YM agar at 25 °C, colony growth is cream colored, smooth, convex, margin entire and butyrous. In Dalmau plates after 7 days on corn meal agar at 25° C, primitive or true pseudomycelium are not formed neither ascospores were observed in individual strains or in pairwise combinations of strains on YM agar, 5% malt extract agar, acetate agar, GY agar, corn meal agar and YCBAS agar, incubated at 14 and 25 °C and observed during 42 days.

The following carbon compounds are assimilated: glucose, sucrose, melibiose, raffinose (w), L-arabinitol (w) (Table 1), whereas galactose, L-sorbose, maltose, cellobiose, trehalose, lactose, melezitose, inulin, soluble starch, D-xylose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-rhamnose, D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, methanol, ethanol, glycerol, erythritol, ribitol, galactitol, D-mannitol, D-glucitol, Methyl - α - D-glycoside, salicin, D-gluconate, DL-lactate, succinate, citrate, inositol, hexadecane, 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate, D-glucuronate, D-galacturonate, xylitol, propane 1,2 diol, butane 2,3 diol, ethyl acetate and glucono-D-lactone were not assimilated. Nitrate, nitrite, cadaverine, creatinine, L-lysine, ethylamine, are not assimilated. D-Glucose is fermented but sucrose and raffinose are not. Growth was observed in vitamin-free medium. No growth was detected in 50% glucose or 10% NaCl / 5% glucose. Starch-like compounds are not produced. Growth in 1% acetic acid is vigorous. No growth was observed in 0.01% or 0.1% cycloheximide. Diazonium Blue B and Urease reaction are negative. Growth occurred at temperature range of 15- 40 °C.

The type strain, CBMAI 1594^T = CBS 13086, was isolated in July 2010, from a nest of the leaf-cutting ant *A. balzani*, collected at the disturbed area of cerrado in Palmas, Tocantins, Brazil. The strain has been deposited in the Brazilian Collection of Environmental and Industrial Microorganisms (CBMAI), Campinas, São Paulo, Brazil, as CBMAI 1594^T and at Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands, as strain CBS 13086.

5.7 Acknowledgments

This work was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- Proc.142731/2010-2) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 2007/50.139-4), Brazil.

5.8 References

- Andrews, J. H., Harris, R. F., Speaer, R. N., Lau, G. W. & Nordheim, E. V (1994).** Morphogenesis and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. *Can J Microbiol* **40**, 6–17.
- Carreiro, S. C., Pagnocca, F. C., Bueno, O. C., Bacci, M., Hebling, M. J. A., & Silva, O. A. (1997).** Yeast associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**, 243-248.
- Carreiro, S.C.; Pagnocca, F.C.; Bacci, M., Jr.; Bueno, O.C.; Hebling, M.J.A. & Middelhoven, W.J. (2002).** Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. *Folia Microbiol* **47**, 259–262.
- Carreiro, S. C., Pagnocca, F. C., Bacci, M, Lachance, M. A., Bueno, O. C., Hebling, M. J. A., Ruivo, C. C. C. & Rosa, C. A. (2004).** *Sympodiomyces attinorum* sp. nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1891-1894.
- Craven, S. E., Dix, M. W. & Michaels, G. E. (1970).** Attine fungus gardens contains yeasts. *Science* **169**, 184 - 186.
- Daniel, H. M., Rosa, C. A., São Thiago-Calaça, P. S., Antonini, Y., Bastos, E. M. A. F., Evrard, P., Huret, S., Fidalgo-Jiménez, A. & Lachance, M. A. (2013).** *Starmerella neotropicalis* f.a., sp. nov., a new yeast species found in bees and pollen. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 3896-3903.
- Fisher, P. J., Strandling, D. J., Sutton, B. C. & Petrini, L. E. (1996).** Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. *Mycol Res* **100**, 541-546.
- Fonseca, A. & Inácio, J. (2006).** Phylloplane yeasts. In *The Yeast Handbook - Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Edited by C. Rosa & G. Péter 1st edn., pp. 263–302. New York: Springer-Verlag.

- Hall, T. A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp* **41**, 95-98.
- Iembo, T., Da-Silva, R., Pagnocca, F. C. & Gomes, E. (2002).** Production, characterization, and properties of β -Glucosidase and β -Xylosidase from a strain of *Aureobasidium* sp. *Appl Biochem Microbiol* **38**, 549–552
- Katoh, K. & Standley, D. M. (2013).** MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evo* **30**, 772-780.
- Kurtzman, C. P. & Robnett, C. J. (1998).** Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, 331-371.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W. & Boekhout, T. (2011a).** *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5th edn. Amsterdam: Elsevier.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. & Robert, V. (2011b).** Methods for the isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In *The Yeasts – a Taxonomic Study*, 5th edn., pp. 87–110. Edited by C. P. Kurtzman, J. W. Fell & T. Boekhout. Amsterdam: Elsevier.
- Leite, R. S., Gomes, E. & Da-Silva, R. (2007).** Characterization and comparison of thermostability of purified β -glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry* **42**,1101–1106.
- Li, S. L.; Li, Z. Y., Yang, L. Y., Zhou, X. L., Dong, M. H., Zhou, P., Lai, Y. H. & Duan, C. Q. (2013).** *Starmerella jinningensis* sp. nov., a yeast species isolated from flowers of *Erianthus rufipilus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 388-392.
- Little, A. E. F. & Currie, C. R. (2007).** Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine –microbe symbiosis. *Biol Lett* **3**, 501-504.

- Little, A. E. F. & Currie, C. R. (2008).** Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. *Ecology* **89**, 1216-1222.
- Mendes T. D., Rodrigues, A., Dayo-Owoyemi, I., Marson, F. A. L. & Pagnocca, F. C. (2012).** Generation of Nutrients and Detoxification: Possible Roles of Yeasts in Leaf-Cutting Ant Nests. *Insects* **3**, 228-245.
- Middelhoven, W. J., Fonseca, A., Carreiro, S. C., Pagnocca, F. C., & Bueno, O. C. (2003).** *Cryptococcus haglerorum*, sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast isolated from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Antonie van Leeuwenhoek* **83**, 167-174.
- Montrocher, R. (1967).** Quelques nouvelles especes et varietes du genre *Candida* (levures asporogenes). *Rev Mycol* **32**, 69-92.
- Morais, P. B., São Thiago-Calaça, P. S. & Rosa, C. A. (2013).** Microorganisms Associated with Stingless Bees. In *Pot-Honey - A legacy of stingless bees*, 1st edn., pp. 173–186. Edited by P. Vit, S. R. M, P. D. & W. Roubik. New York: Springer.
- Mueller, U. G., Gerardo, N. M., Aanen, D. K., Six, D. L. & Schultz, T. R. (2005).** The evolution of agriculture in insects. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **36**, 563-595.
- Pagnocca, F. C., Rodrigues, A., Nagamoto, N. S. & Bacci, M. Jr. (2008).** Yeast and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek* **94**, 517-526.
- Pagnocca, F. C., Legaspe, M. F. C., Rodrigues A., Ruivo, C. C. C., Nagamoto, N. S., Bacci, M., Jr. & Forti, L. C. (2010).** Yeasts isolated from a fungus-growing ant nest, including the description of *Trichosporon chiarellii* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 1454–1459.

- Pagnocca, F. C., Rodrigues, A. & Bacci, M., Jr. (2011).** **Micro-organismos associados às formigas-cortadeiras.** In *Formigas-Cortadeiras – da Bioecologia ao Manejo*, pp. 262-283. Edited by T. M. C. Della Lucia. Viçosa: UFV.
- Pattengale, N. D., Alipour, M., Bininda-Emonds, O. R., Moret, B. M. & Stamatakis, A. (2010).** How many bootstrap replicates are necessary? *J Comput Biol* **17**, 337–354.
- Pimenta, L. B., Araújo, M. S., Lima, R., Silva, J. M. S. & Naves, V.G. O. (2007).** Dinâmica de forrageamento e caracterização de colônias de *Acromyrmex balzani* (Emery, 1890) (Hymenoptera: Formicidae) em ambiente de cerrado goiano. *Rev C Elet Eng Florestal* **9**, 1-12.
- Rodrigues, A., Cable, R. N., Mueller, U. G., Bacci, M. Jr. & Pagnocca, F. C. (2009)** Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungus garden pathogens of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek* **96**, 331-342.
- Rosa, C. A. & Lachance, M. A. (1998).** The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bornbicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 1413-1417.
- Sampaio, J. P., Gadanho, M., Santos, S., Duarte, F. L., Pais, C., Fonseca, A. & Fell, J. W. (2001).** Polyphasic taxonomy of basidiomycetous yeasts genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 687-697.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S. & Frisvad, J. C. (2004).** *Introduction to Food - and Airborne Fungi*, 7th edn. Centraalbureau voor Schimmelcultures: Utrecht.
- Schena, L., Ippolito, A., Zahavi, T., Cohen, L. Nigro, F. & Droby, S. (1999).** Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biol Technol* **17**, 189–199.

- Slavikova, E. & Vadkertiova, R. (2000).** The occurrence of yeasts in the forest soils. *J Basic Microbiol* **40**, 207–212.
- Silva, K. S., Castellani, M. A., Forti, L. C., Moreira, A. A., Lemos, O. L., Carneiro, R. C. S., Khouri, C. R. & Ribeiro, A. E. L. (2010).** Architecture of nests of *Acromyrmex* (Moellerius) *balzani* (Formicidae: Myrmicini: Attini) in pasture. *Pes Apl Agrotecnol* **3**, 107-116.
- Sipiczki, M. (2013).** *Starmerella caucasica* sp. nov., a novel anamorphic yeast species isolated from flowers in the Caucasus. *J Gen Appl Microbiol* **59**, 67-73.
- Stamatakis, A. (2006).** RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**, 2688–2690.
- Teixeira, A. C. P., Marini, M. M., Nicoli, J. R., Antonini, Y., Martins, R. P., Lachance, M. A., & Rosa, C. A. (2003).** *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 339-343.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990).** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: a guide to methods and applications*, pp. 315-322. Edited by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Skiksky, T. White. New York: Academic Press.
- Yarrow, D. (1998).** Methods for the isolation and identification of yeasts. In *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn, pp. 77–100. Edited by C. P. Kurtzman & J. W. Fell. Amsterdam: Elsevier.
- Youngsteadt, E. (2008).** All that makes fungus gardens grow. *Science* **320**, 1006-1007.
- Zalar, P., Gostinčar, C., Hoog, G.S., Uršič, V., Sudhadham, M., & Gunde-Cimerman, N. (2008).** Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Stud Mycol* **61**, 21–38.

5.9 Figure legends

Fig. 1 - Phylogenetic tree based on the D1/D2 domains of the large subunit rRNA gene showing the placement of *Starmerella aceti* sp. nov. CBMAI 1594^T (=CBS 13086) within the *Starmerella* clade. The GTR model with GAMMA correction was applied using the maximum likelihood algorithm in RAxML. Bootstrap values are from 1000 replicates and only values above 50% are shown. The subclade highlighted in gray represents the closest relatives of *S. aceti*.

Fig. 2 - Micrograph showing bipolar budding cells of *Starmerella aceti* CBMAI 1594^T (=CBS 13086) after 24 h at 25 °C in YM broth. Scale bars: 10 µm.

Table 1 - Assimilation of carbon and nitrogenous compounds and diverse characteristics of *Starmerella aceti* CBMAI 1594^T (=CBS 13086).

Characteristics	Assimilation	Characteristics	Assimilation
D-Glucose	+	Ethyl Acetate	-
D-Galactose	-	D-Glucono-lactone	-
L-Sorbose	-	Xylitol	-
Sucrose	+	L-Arabinitol	W
Maltose	-	Propane - 1,2 Diol	-
Cellobiose	-	Butane - 2,3 Diol	-
α,α - Trehalose	-	Nitrate	-
Lactose	-	Nitrite	-
Melibiose	+	Cadaverine	-
Raffinose	W	Creatinine	-
Melezitose	-	L-Lysine	-
Inuline	-	Ethylamine	-
Soluble Starch	-	D-Glucosamine	-
D-Xylose	-	50% Glucose	-
L-Arabinose	-	10% NaCl + 5% D-Glucose	-
D-Arabinose	-	Production of amyloid compounds	-
D-Ribose	-	Diazonium Blue B	-
L-Rhamnose	-	Urea hydrolysis	-
D-Glucosamine	-	0.01% Cycloheximide	-
N-Acetyl D-glucosamine	-	0.1% Cycloheximide	-
Methanol	-	1% Acid Acetic	+
Ethanol	-	Vitamin – Free	+
Glycerol	-		
Erythritol	-	Growth at:	
Ribitol	-	15 – 40 °C	+
Galactitol	-		
D-Mannitol	-		
D-Glucitol	-	Fermentation	
α -Metyl D-glucoside	-	Glucose	+
Salicin	-	Raffinose	-
D-Gluconate	-	Sucrose	-
DL-Lactate	-		
Succinate	-		
Citrate	-		
Myo-Inositol	-		
Hexadecane	-		
2-Keto-D-gluconate	-		
5-Keto-D-gluconate	-		
D-Glucuronate	-		
D-Galacturonate	-		

+, Positive; -, negative; W, weak.

Fig. 1

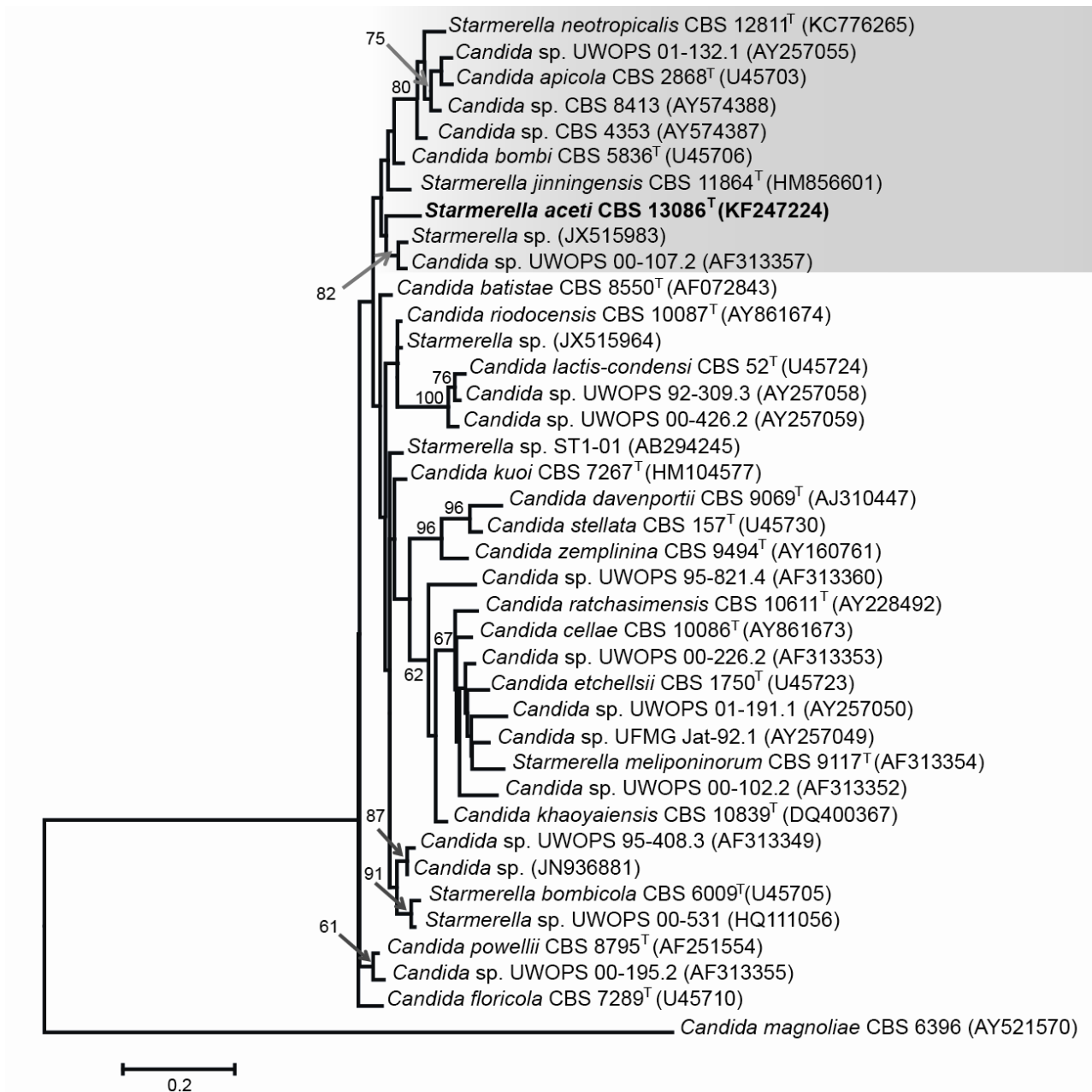
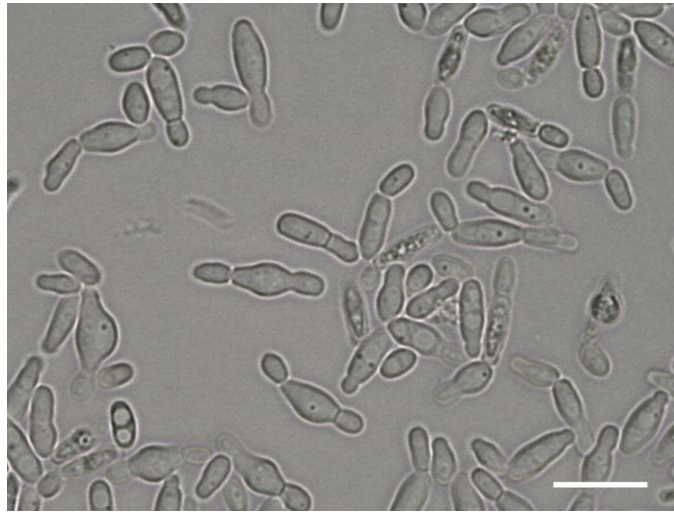


Fig. 2

6***Capítulo 4***

Descrição de *Bullera palmaensis* sp. nov. isolada do jardim de fungo de ninho de *Acromyrmex balzani*

6.1 Resumo

Cinquenta e seis leveduras distribuídas em 13 espécies foram isoladas de um ninho da formiga cortadeira *Acromyrmex balzani* (Himenoptera: Formicidae). Com exceção de 3 estirpes isoladas do jardim de fungos, as demais foram isoladas de material de descarte do ninho. O sequenciamento da região ITS (Internal Transcribed Spacer) e do domínio D1/D2 da LSU do gene rRNA, juntamente com a ausência de fermentação, reação DBB e urease positivas e produção extracelular de compostos amilóides, indicou que uma estirpe recuperada do jardim de fungo de *A. balzani* de área preservada de cerrado pertence a uma espécie não descrita. A análise filogenética das sequências combinadas da região ITS e do domínio D1/D2 da LSU do gene rRNA, mostrou que esta nova espécie pertence ao clado *Bullera*, agrupando com *B. arundinariae* CBS 9931^T, seu parente mais próximo. A nova espécie diferiu de *B. arundinariae* em sete testes fisiológicos e apresentou 97% de identidade com esta espécie no domínio D1/D2 da LSU do gene rRNA e 86% de identidade na região ITS. De acordo com os resultados moleculares e fenotípicos, a estirpe representa uma nova espécie dentro do gênero *Bullera*, para a qual o nome *Bullera palmaensis* TO 115 (=CBS 13085) está sendo proposto.

6.2 Introdução

O gênero *Bullera* (DERX, 1930), é um gênero constituído por fases anamórficas, caracterizado pela formação de balistoconídeos simétricos e pela presença de xilose em hidrolisados de células inteiras (FUNGSIN et al., 2002). Este gênero está localizado entre as espécies basidiomicetas da ordem Tremellales (BOEKHOUT et al., 2011).

Considerando a natureza polifilética do gênero *Bullera* e gêneros relacionados (BOEKHOUT e NAKASE, 1998), a exigência de revisão deste gênero tem sido enfatizada pela descoberta continuada de novas espécies. A distribuição de espécies do gênero *Bullera* se expandiu a partir das ordens Tremellales e Filobasidiales à ordem Trichosporonales (NAKASE et al., 2002; FUNGSIN et al., 2006).

Uma revisão filogenética de *Luteolus* em Tremellales por Wang e Bai (2008) levou a uma separação clara de *Bullera mrakii*, *B. sinensis* e o clado de *Dioszegia* como grupos morfológica e filogeneticamente monofiléticos. Consequentemente, eles propuseram os gêneros *Derxomyces* e *Hannaella* para acomodar espécies de *B. mrakii* e *B. sinensis*, respectivamente. Mais recentemente, foi proposto o gênero *Mingxiaea* para acomodar espécies anamórficas de *Bulleribasidium*, anteriormente atribuídas ao gênero *Bullera* (WANG et al., 2011).

Espécies do gênero *Bullera* têm sido encontradas em madeira em decomposição, em excrementos de larvas de besouro (VAN DER WALT e SCOTT, 1970) e principalmente associadas a plantas (FUNGSIN et al., 2002; 2003; 2006; WANG et al., 2004; LUONG et al., 2005; FONSECA e INÁCIO, 2006).

Algumas espécies de leveduras do gênero *Bullera* como *B. alba*, *B. hanna*, *B. sinensis* e *B. unica* podem produzir toxinas *killer*. A atividade *killer* foi observada contra algumas espécies de ascomicetos (principalmente membros de Lipomycetaceae) e também contra espécies basidiomicetas (GOLUBEV, 2006).

Neste trabalho uma nova espécie do gênero *Bullera* foi recuperada do jardim de fungo de *Acromyrmex balzani* (Tribo Attini: Formicidae). A tribo Attini é conhecida por possuir uma relação mutualística com um fungo basidiomiceto (ordem Agaricales), cultivado no interior dos ninhos para alimento (WEBER, 1972). As formigas forrageiam folhas frescas, frutos e flores utilizados como substrato para o crescimento do fungo, transportam esse material vegetal para as câmaras no subsolo, onde é encontrada uma estrutura chamada de jardim de fungo, em seguida, processam o material para incorporação nesses jardins (WEBER 1972). A espécie *A. balzani* é especializada no

corte de gramíneas e carrega para o interior de seus ninhos principalmente fragmentos de capim e sementes de gramíneas (PIMENTA et al., 1997). A possível origem das leveduras nos jardins de fungo está relacionada com as formigas operárias que, durante a atividade de forrageamento, estão em contato com folhas, flores e frutos que contém uma microbiota na superfície (CARREIRO et al., 1997).

A espécie *B. palmaensis* TO 115 (=CBS 13085) pertence ao clado de *Bullera*, de acordo com as análises das sequências da região ITS e domínio D1/D2 da LSU do gene rRNA, e é discutida neste estudo baseado em um único isolado.

6.3 Material e Métodos

6.3.1 Isolamento das leveduras

A estirpe de *Bullera palmaensis* TO 115 (=CBS 13085) foi isolada do jardim de fungo de um ninho de *A. balzani* em área preservada de cerrado em Palmas, Tocantins (S 10° 10' 45'' e O 48° 21' 38'). O ninho foi escavado de acordo com procedimentos descritos em Rodrigues et al. (2009). Amostras do jardim de fungo e do material de descarte foram coletadas e estocadas em recipientes estéreis e transportadas ao laboratório. Um grama do jardim de fungo ou do material de descarte foi diluído 10 vezes em caldo YM. Para o isolamento das leveduras, alíquotas de 100 µl das diluições foram inoculadas em triplicata na superfície de ágar YM (0,3% extrato de levedura, 0,3% extrato de malte, 0,5% peptona, 1,0% glicose, 2,0% ágar; YARROW, 1998) e MYP (0,7% extrato de malte, 0,05% extrato de levedura, 0,25% soytone, 1,5% ágar; SAMPAIO et al., 2004), ambos suplementado com 0,01% de cloranfenicol e pH 4.0. As placas foram incubadas a 20 °C e monitoradas diariamente por cinco dias. As colônias que apresentaram diferentes morfotipos foram coletadas logo que cresciam, purificadas em ágar YM e mantidas em ultrafreezer -80° C em caldo GYMP (2% glicose, 1% extrato de malte, 0,5% extrato de levedura, 0,2% NaH₂PO₄) contendo glicerol 15% (ROSA et al., 1995).

6.3.2 Caracterização morfológica e fisiológica

Observações morfológicas foram realizadas à partir das placas de YM depois de três dias de crescimento das colônias, enquanto a morfologia celular foi observada em microscópio de contraste de fases (Leica DM 750, software – Leica Application Suite v. 3.5.0) com culturas de 24 h crescidas em caldo YM. Características microscópicas

também foram investigadas em ágar corn meal com culturas de 5-14 dias de crescimento, usando a técnica de microcultivo. Foi investigada a produção de balistoconídeos usando ágar corn meal, PDA (Potato Dextrose Agar) e MYP, incubados a 14° C e 25° C e observados durante quatro semanas. Testes fisiológicos foram realizados através da técnica de replica plating em meio sólido e complementados em líquido de acordo com os métodos descritos em Kurtzman et al. (2011).

6.3.3 Amplificação e sequenciamento do DNA e análise filogenética

A extração de DNA genômico foi realizada de acordo com o protocolo de Sampaio et al. (2004), enquanto a reação de amplificação seguiu o protocolo elaborado em Pagnocca et al. (2008). Os primers NL1 e NL4 foram usados para amplificação do domínio D1/D2 da LSU (large subunit) do gene rRNA (KURTZMAN e ROBNETT, 1998) enquanto os primers ITS1 e ITS4 foram usados para amplificação da região ITS (WHITE et al. 1990). A PCR foi realizada para cada amostra de DNA usando: 4,0 µL de dNTPs (1,25 mM cada); 2,5 µL de buffer 10X; 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM); 0,2 µL de Taq-polimerase (5,0 U/µL); 2,0 µL de cada primer (10 µM), 10,3 µL de água ultrapura e 5,0 µL de DNA template (1:750). Os produtos da PCR foram purificados usando NucleoSpin Gel e PCR Clean-up (Macherey-Nagel, MN). Sequências forward e reverse foram geradas em ABI 3130 Genetic Analyser (Life Technologies), usando BigDye Terminator v3.1. As sequências foram editadas e usadas para montar os contigs em BioEdit v7.1.3 (HALL, 1999). Contigs foram usados para pesquisar por sequências homólogas em Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) e NCBI – GenBank. As relações filogenéticas foram realizadas usando sequências concatenadas de ITS e LSU no software Mega v. 5.1 (TAMURA et al., 2011) usando o algoritmo Maximum Likelihood (ML). Distâncias evolutivas foram computadas usando o modelo Kimura-2 parâmetros com distribuição Gama (KIMURA, 1980). Os valores de bootstrap foram calculados com 1000 repetições.

6.4 Resultados e discussão

Neste estudo de leveduras associadas com *A. balzani*, 56 estirpes foram recuperadas, sendo três do jardim de fungo e 53 do material descartado. Quarenta e quatro estirpes foram identificadas como pertencente ao grupo dos basidiomicetos e 12 como ascomicetos. Entre as leveduras basidiomicetas foram recuperadas espécies como *Cryptococcus flavescens* (1), *Cr. laurentii* (2), *Cr. mangaliensis* (12), *Cr. rajasthanensis* (2), *Kwoniella mangroviensis* (14), *Pseudozyma hubeiensis* (4), *P. jejuensis* (4), *P. parantarctica* (1), e *Sporisorium chrysopogonis* (1), todas recuperadas do material descartado. Ainda, *Cryptococcus* sp. (1), uma estirpe de *K. mangroviensis* e a estirpe TO 115 (=CBS 13085) da espécie nova *Bullera palmaensis* foram recuperadas do jardim de fungo. Entre as leveduras ascomicetas foram recuperadas espécies de *Aureobasidium pullulans* (6) e *Candida albicans* (6), todas do material descartado.

Estas espécies de leveduras provavelmente foram transportadas para o interior dos ninhos durante o forrageamento pelas formigas operárias (CARREIRO et al., 1997), pois podem estar no filoplano do material vegetal fresco coletado pelas formigas, sendo o filoplano considerado uma rica fonte de espécies de leveduras, principalmente de espécies basidiomicetas (FONSECA e INÁCIO, 2006).

Espécies dos gêneros *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Candida* e *Pseudozyma* são frequentemente observadas nos ninhos de formigas Attini (CARREIRO et al., 1997, 2002, RODRIGUES et al., 2009; PAGNOCCA et al., 2008, 2010, 2011; MENDES et al., 2012), e provavelmente esses micro-organismos participam da degradação do material vegetal levado para dentro dos ninhos pelas formigas operárias (MENDES et al., 2012), pois a maioria das espécies pertencentes a esses gêneros podem produzir enzimas extracelulares como: celulase, xilanase, amilase, pectato-liase, poligalacturonase e lipase (Tabela 1, capítulo 2).

Análises das sequências combinadas da região ITS e do domínio D1/D2 da LSU do gene rRNA mostraram que uma estirpe de levedura isolada de jardim de fungo de ninho de *A. balzani* representa uma nova espécie pertencente ao clado *Bullera*. A nova espécie agrupou com *B. arundinariae* CBS 9931^T com um forte suporte de bootstrap (100%) (Fig. 1). A espécie *B. palmaensis* TO 115 (=CBS 13085) diferiu de *B. arundinariae* CBS 9931^T em 17 substituições (3,2%) dentre 529 nucleotídeos no domínio D1/D2 da LSU do rRNA. Em relação à região ITS, *B. palmaensis* TO 115 (CBS 13085) diferiu de *B. arundinariae* CBS 9931^T em 78 substituições (14,4%) dentre

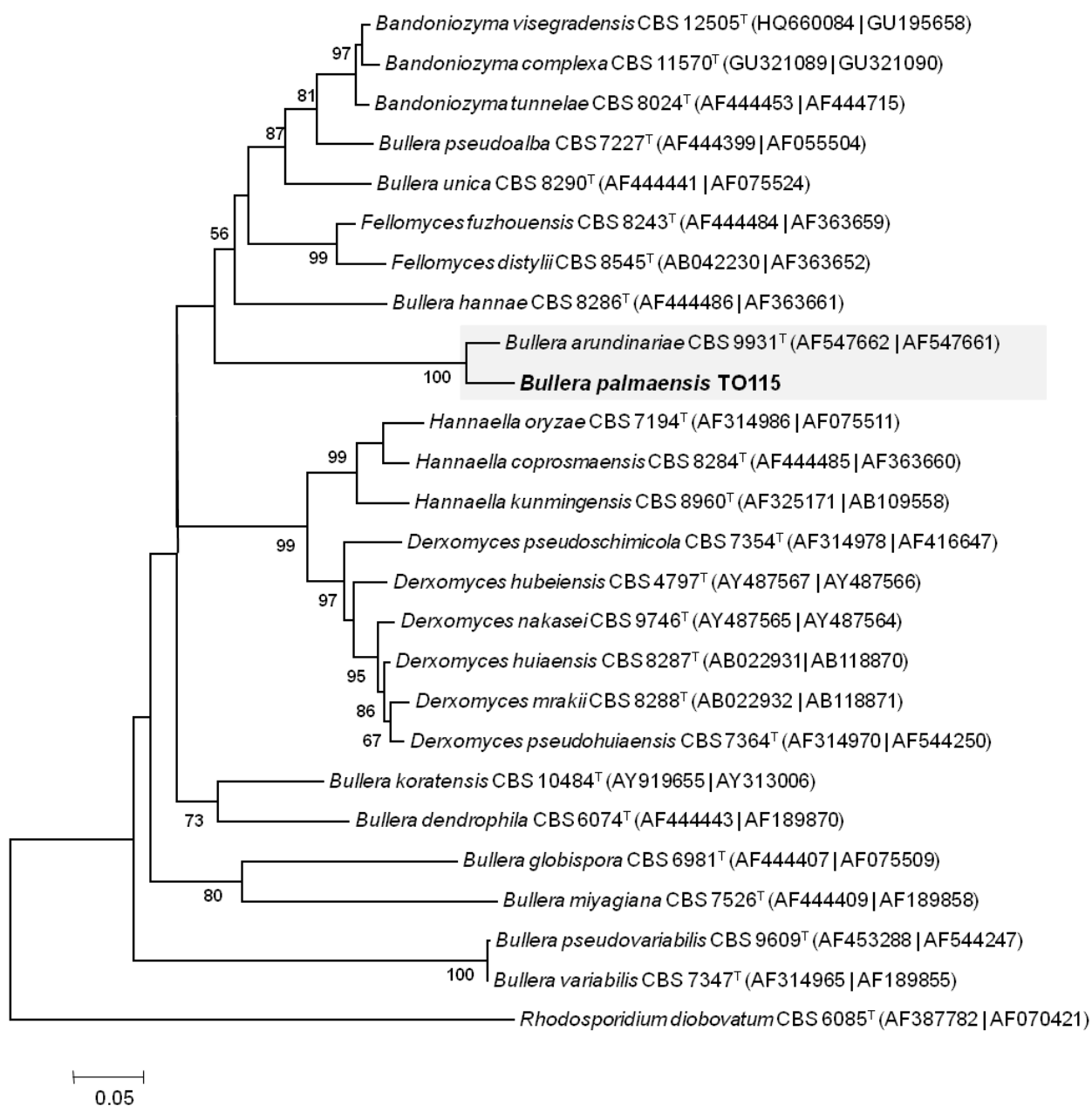
542 nucleotídeos. Estes resultados indicam que *B. palmaensis* TO 115 representa uma espécie não descrita, e esta conclusão é suportada por estudos anteriores mostrando que estirpes de levedura com 1% de substituição no domínio D1/D2 (KURTZMAN e ROBNETT, 1998) e 3% de substituições na região ITS (NILSSON et al., 2008) geralmente representam espécies distintas.

A clade mais próxima de *B. palmaensis* TO 115 (=CBS 13085) agrupou duas espécies pertencentes ao gênero *Fellomyces* (*Fellomyces fuzhouensis* CBS 8243^T e *Fellomyces distylii* CBS 8545^T) e uma espécie de *B. hanna*e CBS 8286^T (Fig. 1). *Bullera palmaensis* TO 115 (=CBS 13085) diferiu de *B. hanna*e CBS 8286^T em 84 substituições (14%) de um conjunto de dados de 600 nucleotídeos no domínio D1/D2 da LSU do rRNA, e em 161 substituições (28,6%) na região ITS de um conjunto de dados de 562 nucleotídeos.

A comparação de sequências do domínio D1/D2 da LSU do gene rRNA sugere que *B. arundinariae* CBS 9931^T possui uma posição intermediária entre espécies do gênero *Dioszegia* e entre *B. variabilis* e *B. miyagiana*. Ainda, a árvore filogenética de espécies descritas no gênero *Bullera* baseado em sequências do domínio D1/D2 da LSU do gene rRNA (BOEKHOUT et al. 2011), mostrou que enquanto a maioria das espécies pertencem a agrupamentos específicos de *Bulleromyces*, *Auriculibuller* e *Bulleribasidium*, *B. arundinariae* formou uma linhagem independente, indicando que esta espécie não está bem definida dentro do gênero.

O gênero *Bullera* é definido como polifilético (FELL et al., 2000, SCORZETTI et al., 2002), com a maioria das espécies pertencendo a ordem Tremellales. No entanto, algumas espécies descritas em *Bullera* pertencem a outras linhagens filogenéticas como Trichosporonales e Filobasidiales (BOEKHOUT et al. 2011). A maioria das espécies classificadas dentro de Tremellales mostram uma divergência considerável, indicando assim que o conceito do gênero *Bullera* e de vários outros gêneros pertencentes a Tremellales (por exemplo, *Cryptococcus* e *Tremella*), precisam ser revistos (BOEKHOUT et al. 2011).

Figura 1 – Árvore filogenética usando o método ML (Maximum Likelihood) foi obtida das sequências combinadas da região ITS e domínio D1/D2 da LSU do gene rRNA de *B. palmaensis* sp. nov. e espécies afins. O modelo Kimura 2-parâmetros com distribuição Gama foi usado para calcular a distância filogenética. Valores bootstrap são de 1000 repetições. Somente valores >50% são mostrados.



A espécie *B. palmaensis* TO 115 diferiu de *B. arundinariae* CBS 9931^T pela habilidade em assimilar glicerol, gluconato, DL-lactato, crescimento em meio de alta pressão osmótica 10% NaCl/5% glicose e formar compostos amilóides, e pela inabilidade de assimilar amido solúvel. A assimilação de L-sorbose por *B. palmaensis* TO 115 foi negativo. No entanto, ao contrário da descrição original de *B. arundinariae* CBS 9931^T (FUNGSIN et al., 2002), em que o crescimento em L-sorbose foi ausente, um crescimento lento foi observado mais recentemente (BOEKHOUT et al. 2011).

A maioria das espécies do gênero *Bullera* foi isolada de folhas, (FUNGSIN et al., 2002; 2003; 2006; WANG et al., 2004; LUONG et al., 2005) indicando que o material vegetal é o habitat natural dessas espécies (BAI et al., 2001). *Bullera palmaensis* TO 115 (=CBS 13085) foi isolada de jardim de fungo de *A. balzani*, a qual possui o hábito de cortar monocotiledôneas, principalmente gramíneas (PIMENTA et al, 2007). Assim, a origem desta espécie de levedura poderia ser atribuída ao substrato vegetal coletado pelas formigas cortadeiras para nutrir seu fungo mutualista. *Bullera arundinariae* CBS 9931^T foi isolada de uma folha de bambu pigmeu (*Arundinaria pusilla*, Graminae), coletada em uma floresta protegida na Tailândia (FUNGSIN et al., 2002).

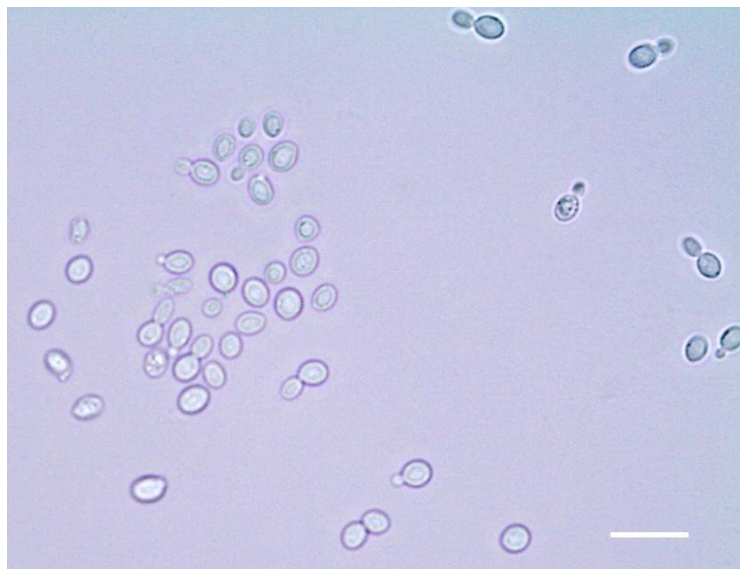
6.5 Descrição de *Bullera palmaensis* TO 115 Melo, Morais e Pagnocca sp. nov.

Bullera palmaensis (pal.ma.en.'sis. N.L. fem. adj. *palmaensis* pertencendo a cidade de Palmas, capital do Estado do Tocantins, onde a levedura foi encontrada).

Em caldo YM após 24 h a 25° C, as células são ovoides a elipsoides (2 x 3,2 e 3,1 x 4,8 µm). A reprodução é por brotamento monopolar e lateral, com células ocorrendo únicas ou em pares (Fig. 2). Depois de duas semanas, anel e película foram ausentes, mas um abundante sedimento de células foi formado.

As colônias formadas depois de três dias em ágar YM a 25° C são convexas, cor creme, brilhante, mucóide, lisa e com margem inteira. Em placas Dalmau depois de sete dias em ágar corn meal a 25° C, hifas e pseudohifas não foram observadas. A formação de balistoconídeos em ágar corn meal, PDA (Potato Dextrose Agar) e MYP a 14 e 25° C durante quatro semanas não ocorreu. Nenhuma reprodução sexual foi observada.

Fig. 2 - Fotomicrografia mostrando brotamento monopolar de células de *B. palmaensis* TO 115 (=CBS 13085) após 24 h a 25 ° C em caldo YM . Barra de escala: 10 µm.



As seguintes fontes de carbono são assimiladas pela espécie *B. palmaensis* TO 115: D-glicose, galactose, sacarose, maltose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melezitose, D-xilose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-rhamnose, D-glicosamina, N-acetil D-glicosamina, etanol, glicerol (W), eritritol, ribitol, galactitol, D-manitol, D-glucitol, α -metil D-glicosídeo, gluconato, DL-lactato (W), succinato, citrato, inositou, 2-ceto-D-gluconato, 5-ceto-D-gluconato, D-gluconato, D-galacturonato, xilitol, L-arabnitol, propano 1,2 diol e D-glucono-lactona (Tabela 1). Não são assimilados: L-sorbose, inulina, amido solúvel, metanol, salicina, hexadecano, butano 2,3 diol e acetato de etila. Fermentação da glicose é ausente. Os compostos de nitrogênio assimilados são cadaverina, creatinina, L-lisina, etilamina e D-glucosamina. Nitrato e nitrito não são assimilados. Compostos amilóides são produzidos. Crescimento foi observado em 10%NaCl/5% glicose. Não ocorreu crescimento na presença de glicose 50%, cicloheximida 0,01% e 0,1%, vitamina free e ácido acético 1%. Reação de DBB e urease são positivas. Crescimento ocorreu em temperatura de 14-28° C

Bullera palmaensis TO 115 produziu enzimas como amilase, xilanase e poligacturonase (ver capítulo 2, apêndice B).

Tabela 1 – Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e características diversas de *B. palmaensis* TO 115 (=CBS 13085).

Características	Assimilação	Características	Assimilação
D-Glicose	+	Xilitol	+
D-Galactose	+	L-arabinitol	+
L-sorbose	-	Arbutina	ND
Sacarose	+	Propano 1,2 Diol	+
Maltose	+	Butano 2,3 Diol	-
Celobiose	+	Nitrato	-
Trealose	+	Nitrito	-
Lactose	+	Cadaverina	+
Melibiose	+	Creatinina	+
Rafinose	+	L-lisina	+
Melezitose	+	Etilamina	+
Inulina	-	D-glucosamina (N)	+
Amido sol.	-	Glicose 50%	-
D-xilose	+	10%NaCl/5% glicose	+
L-arabnose	+	Síntese de amido	+
D-arabnose	+	DBB	+
D-ribose	+	Urease	+
L-rhamnose	+	Cicloheximida 0,01%	-
D-glicosamina	+	Cicloheximida 0,1%	-
N-acetil D-glicosamina	+	Tolerância Ac. Acético 1%	-
Metanol	-	Vitamina free	-
Etanol	+	Acetato de etila	-
Glicerol	W	D-glucono-lactona	+
Eritritol	+		
Ribitol (Adonitol)	+	Temperatura 14 a 28°C	+
Galactitol	+	Temperatura 30°C	-
D-manitol	+		
D-glucitol	+		
α -metil D-glicosideo	+		
Salicina	-	Fermentação	
Gluconato	+	Glicose	-
DL-lactato	W		
Succinato	+		
Citrato	+		
Myo-inositol	+		
Hexadecano	-		
2-ceto-D-gluconato	+		
5-ceto-D-gluconato	+		
D-gluconato	+		
D-Galacturonato	+		

(+) assimilação positiva; (-) assimilação negativa; (W) assimilação fraca; (ND) não determinado.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alguns estudos tem registrado a composição da comunidade de leveduras nos ninhos de formigas Attini. Nesta pesquisa, prourou-se conhecer a diversidade de leveduras presente nos ninhos da formiga cortadeira *A. balzani*, de áreas de cerrado de Palmas TO. *Acromyrmex balzani* é uma formiga considerada praga, principalmente de pastagens, e este é o primeiro estudo de leveduras associadas a esta formiga em ambientes de cerrado.

Considerando os resultados, pode-se concluir com métodos dependentes de cultivo que os ninhos de *A. balzani* abrigam uma comunidade diversa de leveduras, e que a origem dessas leveduras provavelmente está associada ao material vegetal coletado pelas formigas operárias, que utilizam este substrato para cultivar o fungo mutualista. Observou-se a predominância de leveduras basidiomicetas nos ninhos, e possivelmente, esta ocorrência se deu devido à dominância de leveduras deste grupo na filosfera.

É importante salientar que algumas das espécies recuperadas nos ninhos são patógenos oportunistas, e incluem *Candida albicans*, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Coniochaeta canina*, *Trichosporon asahii*, *T. loubieri* e *T. mycotoxinivorans*, sendo as formigas prováveis veiculadores desses micro-organismos.

A espécie *Trichosporon chiarellii* também foi encontrada em ninhos de *A. balzani*. Essa espécie, até o momento, só foi encontrada em ninhos da tribo Attini, o que pode indicar uma possível adaptação a esse micro-ambiente.

Duas espécies novas de leveduras isoladas do jardim de fungo estão sendo propostas, indicando que este ambiente é promissor para descoberta de novos micro-organismos.

O papel das leveduras dentro dos ninhos das formigas Attini tem sido investigado, mas pouco se sabe quais as funções que esses micro-organismos podem desempenhar dentro dos ninhos. Os resultados estão demonstrando que leveduras presentes nos ninhos de *A. balzani* apresentam capacidade de degradar polímeros vegetais e assimilar os compostos resultantes da degradação dos substratos coletados pelas formigas operárias. É possível que essas leveduras consumam açúcares importantes para nutrição do fungo mutualista, podendo atuar como competidoras. Por outro lado, o papel benéfico desse grupo microbiano

destaca-se pelo consumo de ácido galacturônico por grande parte das leveduras (composto tóxico para as formigas).

Este trabalho demonstrou ainda que os ninhos de *A. balzani* representam um interessante ambiente para a prospecção de leveduras produtoras de enzimas, as quais podem ser importantes para fins biotecnológicos.

REFERÊNCIAS

- ABRIL, A. B.; BUCHER, E. H. Evidence that the fungus cultured by leaf-cutting ants does not metabolize cellulose. **Ecology Letters**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 325-328, 2002.
- ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Biochemical characterization of two xylanases from yeast *Pseudozyma hubeiensis* producing only xylooligosaccharides. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 24, p. 6488-6495, 2009.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, London, v. 33, n.1, p. 21–28,1998.
- ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄNH-HAGERDAL, B.; IDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.82, n.4, p.340-349, 2007.
- ANDRADE, M.L. **Bionomia e Distribuição Geográfica do Gênero Acromyrmex Mayr, 1865 (Hymenoptera: Formicidae) no Estado de São Paulo, Brasil**. 1991. 120f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho – UNESP, Botucatu, 1991.
- ANDREWS, J. H.; HARRIS, R. F.; SPEAER, R. N.; LAU, G. W.; NORDHEIM, E. V. Morphogenesis and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 40, n. 1, p. 6-17, 1994.
- ANGELIS, C.; SERZEDELLO, A.; DE ANGELIS, D. F. Yeasts found in gardens of *Atta sexdens rubropilosa* and *Atta laevigata*. **Naturalia**, São Paulo, v.8, p.149-151, 1983.
- ARAUJO, M. S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; MAYNÉ-NUNES, A. J. Caracterização de ninhos e atividade forrageadora de *Trachymyrmex suscus* Emery (Himinoptera: Formicidae) em plantio de eucalipto. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 419-427, 2002.
- ARAVINDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, n.2, p. 141-158, 2007.
- AYLWARD, F. O.; BURNUM-JOHNSON, K. E.; TRINGE, S. G.; et al. *Leucoagaricus gongylophorus* produces a diversity of enzymes for recalcitrant plant polymer degradation in leaf-cutter ant fungus gardens. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 79, n. 12, p. 3770-3778, 2013.
- BACCI JÚNIOR M.; RIBEIRO, S. B.; CASAROTTO, M. E. F.; PAGNOCCA, F. C. Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 1, p. 79-82, 1995.

BAI, F. Y.; TAKASHIMA, M.; NAKASE, T. Phylogenetic analysis of strains originally assigned to *Bullera variabilis*: descriptions of *Bullera pseudohuiaensis* sp. nov., *Bullera komagatae* sp. nov. and *Bullera pseudoschimicola* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 51, n. 6, p. 2177-2187, 2001.

BASS, M.; CHERRETT, J. M. The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance. **Ecological Entomology**, Oxford, v. 19, n.3, p. 215-220 1994.

BEATTIE, A. J.; TURNBULL, C. L.; HOUGH, T.; KNOX, R.B. Antibiotic production: A possible function for the metapleural glands of ants (Hymenoptera: Formicidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Annapolis, v. 79, n. 3, p. 448-450, 1986.

BENNETT, J. W.; WUNCH, K. G.; FAISON, B. D. Use of fungi in biodegradation. In: HURST, C. J. **Manual of Environmental Microbiology**. 2nd ed. Washington: AMS press, 2002. p. 960–971.

BHADRA, B.; RAO, R. S.; SINGH, P. K.; SARKAR, P. K.; SHIVAJI, S. Yeasts and yeast-like fungi associated with tree bark: diversity and identification of yeasts producing extracellular endoxylanases. **Current microbiology**, New York, v. 56, n. 5, p. 489-494, 2008.

BIELY, P.; KREMNIČKÝ, L. Yeasts and their enzyme systems degrading cellulose, hemicellulose and pectin. **Food Technology and Biotechnology**, Croatia, v.36, n. 4, p. 305-312, 1998.

BLANCO, P.; SIEIRO, C.; VILLA, T. G. Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 175, n. 1, p. 1-9, 1999.

BOEKHOUT, T.; NAKASE, T. *Bullera* DERX. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 731–741.

BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SAMPAIO, J. P.; BANDONI, R. J.; FELL, J. W.; KWONCHUNG, K. J. Discussion of Teleomorphic and Anamorphic Basidiomycetous Yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Eds.) **The yeasts: a taxonomic study**, 5th edn. San Diego: Elsevier, 2011. p. 1339-1371.

BOT, A. N. M.; CURRIE, C. R.; HART, A. G.; BOOMSMA, J. J. Waste management in leafcutting ants. **Ethology, Ecology and Evolution**, Florence, v. 13, n. 3, p. 225-237, 2001.

BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J. A new genus of fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, California, EUA, v. 38, n. 3B, p. 639-665, 2001.

BRIZZIO, S.; TURCHETTI, B.; DE GARCIA, V.; LIBKIND, D.; BUZZINI, P.; VAN BROECK, M. Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated

from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, n. 4, p. 519-525, 2007.

BUSSAMARA, R.; FUENTEFRIA, A. M.; OLIVEIRA, E. S.; BROETTO, L.; SIMCIKOVA, M.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n.1, p. 268-275, 2010.

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, n. 6, p. 1020-1025, 2002.

CAFARO, M. J.; CURRIE, C. R. Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, n. 6, p. 441-446, 2005.

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; BACCI JÚNIOR, M.; HEBLING, M. J. A.; DA SILVA, O. A. Yeast associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 71, n. 3, p. 243-248, 1997.

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. JR; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; MIDDELHOVEN, W. J. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 47, n. 3, p. 259-262, 2002.

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI JÚNIOR, M.; LACHANCE, M-A.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; RUIVO, C. C. C.; ROSA, C. A. *Sympodiomyces attinorum* sp. nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 54, n. 5, p. 1891-1894, 2004.

CHAPELA, I. H.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R.; MUELLER, U. G. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, Washington, v. 266, n. 5191, p. 1691-1694, 1994.

CHOI, Y.W.; HODGKISS, I.J.; HYDE, K.D. Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. **Journal of Agricultural Technology**, Bangkok, v.1, n.1, p. 55-66, 2005.

COLWELL, R. K. Estimate S: statistical estimation of species richness and shared species from sample. Version 8. 2009. <http://purl.oclc.org/estimates>. Accessed 27 Feb 2012.

CRAVEN, S. E.; DIX, M. W.; MICHAELS, G. E. Attine fungus gardens contains yeasts. **Science**, Washington, v. 169, n. 3941, p. 184- 186, 1970.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 14, p. 7998-8002, 1999a.

CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, London, v. 398, n. 6729, p. 701-704, 1999b.

CURRIE, C. R. A community of ants, fungi and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 55, p. 357-380, 2001a.

CURRIE, C. R. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia**, Berlin, v. 128, n. 1, p. 99-106, 2001b.

CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceeding of the Royal Society of London. Serie B, Biological Science**, London, v. 268, n. 1471, p.1033-1039, 2001.

CURRIE, C. R.; BOT, A. N. M.; BOOMSMA, J. J. Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. **Oikos**, Copenhagen, v. 101, n. 1, p. 91-102, 2003.

CURRIE, C. R.; POULSE, M.; MENDENHALL, J.; BOOMSMA, J.J.; BILLEN, J. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. **Science**, Washington, v. 331, p. 81-83, 2006.

DAMM, U.; FOURIE, P. H.; CROUS, P. W. *Coniochaeta (Lecythophora)*, *Collophora* gen. nov. and *Phaeomoniella* species associated with wood necroses of *Prunus* trees. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 24, s/n, p. 60, 2010.

DE FINE LICHTA, H. H.; SCHIØTT, M.; ROGOWSKA-WRZESINSKAB, A.; ROEPSTORFF, S. N. P.; BOOMSMAA J. J. Laccase detoxification mediates the nutritional alliance between leaf-cutting ants and fungus-garden symbionts **PNAS** v. 110, n. 2, p.583–587, 2013.

De HOOG, G.S.; ZENG, J.S.; HARRAK, M.J.; SUTTON, D.A. *Exophiala xenobiotica* sp. nov., an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Netherlands, v.90, p.257–268, 2006.

DELLA LUCIA, T. M. C.; FOWLER, H. G. As formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M. C. **As formigas cortadeiras**. Vicoso: Editora Folha de Vicoso, 1993. p. 1-3.

DEMIRBAS, A. Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. **Energy Sources**, v.27, n. 4, p.327-337, 2005.

DIEHL, E.; CAVALLI-MOLINA, S.; ARAÚJO, A.M. Isoenzyme variation in the leaf-cutting ants *Acromyrmex heyeri* and *Acromyrmex striactus* (Hymenoptera, formicidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n.2, p.173-178, 2002.

ELSHAHED, M. S. Microbiological aspects of biofuel production: Current status and future directions. **Journal of Advanced Research**, v.1, n.2, p.103-111, 2010.

ERTHAL JÚNIOR, M.; SILVA, C.P.; COOPER, R.M.; SAMUELS, R.I. Hydrolytic enzymes of leaf-cutting ant fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, New York, v. 152, n. 1, p. 54-59, 2009.

FARJI-BRENER, A.G.; MEDINA, C. The importance of where to dump the refuse: seed Banks and fine roots in nests of the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* and *Atta colombica*. **Biotropica**, Washington, v. 32, n. 1, p. 120-126, 2000.

FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 50, n. 33, p. 1351-1371, 2000.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure reactions**. New York: W. De Gruyter, 1989. p. 613.

FERNÁNDEZ, F.; OSPINA, M. Sinopsis de las hormigas de la región Neotropical. In: FERNÁNDEZ, F. **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá, Smithsonian Institution Press, 2003. p.49-64.

FERNÁNDEZ, F.; SHARKEY, M. J. (Eds.). Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical. Sociedad Colombiana de Entomología & Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 894p. 2006.

FISHER, P. J.; STRANGLING, D. J.; SUTTON, B. C.; PETRINI, L. E. Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, n. 5, p. 541-546, 1996.

FONSECA, A.; INÁCIO, J. Phylloplane Yeasts. In: ROSA, C. A.; GABOR, P. (Eds.) **The yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Berlin: Springer-Verlag, 2006, p. 263-302.

FUENTEFRÍA, A. M.; SUH, S-O.; LANDELL, M. F.; FAGANELLO, J.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; BLACWELL, M.; VALENTE, P. *Trichosporon insectorum* sp. nov., a new anamorphic basidiomycetous killer yeast. **Mycological Research**, Oxford, v. 112, n. 1, p. 93-99, 2008.

FUNGSIN, B.; TAKASHIMA, M.; ARTJARIYASRIPONG, S.; ARUNPAIROJANA, V.; HAMAMOTO, M.; NAKASE, T. *Bullera arundinariae* sp. nov., a new species of ballistoconidium- forming yeast isolated from a plant in Thailand. **Microbiol Cult Collect**, v.18 n. 2, p.83-90, 2002.

FUNGSIN, B.; TAKASHIMA, M.; BAI, F. Y.; ARTJARIYASRIPONG, S.; NAKASE, T. *Bullera panici* sp. nov. and *Bullera siamensis* sp. nov., two new yeasts in the *Bullera variabilis* cluster isolated in Thailand. **Microbiol Cult Collect**, v. 19, n.1, p. 23-32, 2003.

FUNGSIN, B.; TAKASHIMA, M.; SUGITA, T.; ARTJARIYASRIPONG, S.; POTACHAROEN, W.; TANTICHAROEN, M.; NAKASE, T. *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, n. 2, p. 73-81, 2006.

GANTER, P. F. **Yeast and Invertebrate Associations**. In: ROSA, C. A.; GABOR, P. (Eds.) **The yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Berlin: Springer-Verlag, 2006, p. 461-500.

GEORGIEVA, N.; YOTOVA, L.; BETCHEVA, R.; HADZHIYSKA, H.; VALTCHEV, I. Biobleaching of lignin in linen by degradation with *Trichosporon cutaneum* R57. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, Sofia, v. 41, n. 2, p. 153-156, 2006.

GERARDO, N. M.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R. Complex host-pathogen coevolution in the *Apterostigma* fungus-growing ant-microbe symbiosis. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 6, p. 88, 2006.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v.101, n. 13, p.4775-4800, 2010.

GIRMENIA C.; PAGANO, L.; MARTINO, B. et al. Invasive Infections Caused by *Trichosporon* Species and *Geotrichum capitatum* in Patients with Hematological Malignancies: a Retrospective Multicenter Study from Italy and Review of the Literature. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 4, p. 1818-1828, 2005.

GONCALVES, C. R. O Gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hym. Formicidae). **Studia Entomologica**, Petrópolis, v. 4, n. 1-4, p. 113-180, 1961.

GOLUBEV, W. I. Antagonistic Interactions Among Yeasts. In: ROSA, C. A.; GABOR, P. (Eds.) **The yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Berlin: Springer-Verlag, 2006, p. 197-219.

GOTELLI, N.J; ENTSMINGER, G. L. EcoSim: Null models software for ecology. Version 7. Acquired Intelligence Inc. & Kesey-Bear. 2004. <http://garyentsminger.com/ecosim/index.htm>. Accessed 17 November 2012.

GUPTA J.K.; SHARMA, P.; KERN, H. W.; SAHM, H. Degradation of synthetic lignins and some lignin monomers by the yeast *Rhodotorula glutinis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 53-58, 1990.

GUPTA, S.; KAPOOR, M.; SHARMA, K. K.; NAIR, L. M.; KUHAD, R. C. Production and recovery of an alkaline exopolysaccharonase from *Bacillus subtilis* RCK under solid-state fermentation using statistical approach. **Bioresource technology**, Essex, v. 99, n. 5, p. 937-945, 2008.

GUTIERREZ-AYESTA, C.; CARELLI, A. A.; FERREIRA, M.L. Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyze triglycerides and phospholipids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n.1, p. 35-43, 2007.

HAEDER, S.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. Candidicin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. **PNAS**, v. 106, n. 12, p. 4742-4746, 2009.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, s/n, p. 95-98, 1999.

HASAN, F. et al. Enzymes used in detergents: Lipases. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 31, p. 4836-4844, 2010.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990. 732p.

HOSTINOVÁ, E. Amylolytic enzymes produced by the yeast *Saccharomycopsis buligera*. **Biologia**, Bratislava, 57/Suppl. 11: 247-251, 2002.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.

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

INÁCIO, J.; LUDWIG, W.; SPENCER-MARTINS, I. FONSECA, A. Assessment of phylloplane yeasts on selected Mediterranean plants by FISH with group- and species-specific oligonucleotide probes. **FEMS Microbiology Ecology**, Washington, v. 71, n. 1, p. 61-72, 2010.

IEMBO, T.; DA-SILVA, R.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E. Production, characterization, and properties of β -Glucosidase and β -Xylosidase from a strain of *Aureobasidium* sp. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Clifton, v. 38, n. 6, p. 549-552, 2002.

IRANMAHBOOB, J.; NADIM, F.; MONEMI, S. Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips. **Biomass and Bioenergy**, v.22, n.5, p.401-404, 2002.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005.

JOHNSON, E. A. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the ascomycetes. **Applied microbiology and biotechnology**, Alemanha, v. 97, n. 2, p. 503-517, 2013.

KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Current trends in research and application of microbial cellulases. **Research Journal of Microbiology**, New York, v. 6, n. 1, p. 41-53. 2011.

KERMARREC, A.; FEBVAY, G.; DECHARME, M. Protection of leaf-cutting ants from biohazards: Is there a future for microbiological control? In: LOFGREN, C. S.;

- VANDER MEER, R. K. (Eds.) **Fire Ants and Leaf-Cutting Ants**. Boulder: Westview, 1986. p. 339–55.
- KIM, J. Y. Isolation of Protease-producing Yeast, *Pichia farinosa* CO-2 and Characterization of Its Extracellular Enzyme. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 133-141, 2010.
- KIM, J. Y. Isolation of *Sporidiobolus ruineniae* CO-3 and Characterization of Its Extracellular Protease. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 1-10, 2009.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.
- KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGISANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n. 4, 345-351, 2002.
- KLINGENBERG, C; BRANDÃO, R.F. Revision of the fungus-growing ant genera *Mycetophylax* Emery and *Paramycetophylax* Kusnezov rev. stat., and description of *Kalathomyrmex* n. gen. (Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Zootaxa**, New Zealand, v.2052, p.1-31, 2009.
- KOUKER, G.; JAEGER, K.E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 1, p. 211-213, 1987.
- KUDANGA, T.; MWENJE, E. Extracellular cellulase production by tropical isolates of *Aureobasidium pullulans* **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, p. 9, p. 773-776, 2005.
- KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. “Microbial Cellulases and Their Industrial Applications,” **Enzyme Research**, Egito, v. 2011, n.1, p. 1-10, 2011.
- KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 73, n. 4, 331-371, 1998.
- KURTZMAN, C.P.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces* and *Scheffersomyces*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 51, n. 1, p. 2-14, 2010.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Eds) **The yeasts: a taxonomic study**, 5th edn. San Diego: Elsevier, 2011. p. 88-110.
- LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A, STARMER, W. T.; SCHLAG-EDLER, B.; BAKER, J. S. F.; BOWLES, J. M. *Metschnikowia continentalis* var. *borealis*, *Metschnikowia continentalis* var. *continentalis*, and *Metschnikowia hibisci*, new

heterothallic haploid yeasts from ephemeral flowers and associated insects. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, n. 3, p. 279-288, 1998.

LACHANCE, M. A.; STARMER, W.T.; ROSA, C. A.; BOWLES, J. M.; BAKER, J. S. F.; JAZEN, D. H. Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2001.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v.56, n.1, p.1-24, 1997.

LEITE, R. S.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Characterization and comparison of thermostability of purified β -glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, London, v. 42, n. 7, p. 1101-1106, 2007.

LEWIN, M.; GOLDSTEIN, I. S. **Wood Structure and Composition**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 488.

LITTLE, A. E. F.; MURAKAMI, T.; MUELLER, U. R.; CURRIE, C. R. The infrabuccal pellet piles of fungus-growing ants. **Naturwissenschaften**, New York, v. 90, p. 558-562, 2003.

LITTLE, A. E. F.; MURAKAMI, T.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their gardens. **Biology Letters**, London, v. 2, n. 1, p. 12-16, 2006.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. **Biology Letters**, London, v. 3, n. 5, p. 501-504, 2007.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. **Ecology**, Washington, v. 89, n.5, p. 1216-1222, 2008.

LIN, C.; HIRAGA, Y.; MASAKI, K.; IEFUJI, H.; OHKATA, K. Temperature-dependence of enantioselectivity and desymmetrization in the acetylation of 2-mono- and 2,2-di-substituted 1,3-propanediols by a novel lipase isolated from the yeast *Cryptococcus* spp. S-2. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 24, n. 5, p. 390-395, 2006.

LIU, W.; ZHU, W.; LU, Y.; KONG, Y.; MA, G. Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* SL409. **Process Biochemistry**, London, v. 33, n. 3, p. 331-326, 1998.

LOODER, J. **The yeast: a taxonomic study**. 2 ed. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1970.

LUCIANO, H. M.; DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E. Organismos associados a uma colônia de *Acromyrmex heyeri* (Hymenoptera: Formicidae) mantida em laboratório. **Acta Biologica Leopoldensia**, Sao Leopoldo, v. 17, n. 2, p. 47-56, 1995.

LUONG, D. T.; TAKASHIMA, M.; TY, P. V.; DUNG, N. L.; NAKASE, T. *Bullera hoabinhensis* sp. nov., a new ballistoconidiogenous yeast isolated from a plant leaf collected in Vietnam. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 51, n. 335-342, 2005.

MAGURRAN, A. E.; GILL, B. J. Biological diversity: frontiers in measurement and assessment. Oxford University Press, Oxford. 2011.

MAKSIMOVA, I. A.; YURKOV, A. M.; CHERNOV, I. Y. Spatial structure of epiphytic yeast communities on fruits of *Sorbus aucuparia* L. **Biology Bulletin**, Wood Hole, v. 36, n. 6, p. 613-618, 2009.

MALEKI MH, TAJICK GHANBARY MA, RANJBAR G, ASGHARZADEH A, LOT FI A. Screening of some zygomycetes strain for pectinase activity. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, p. 1-7, 2011.

MAMMAN, A. S.; LEE, J. M.; KIM, Y. C.; HWANG, I. T.; PARK, No-J.; HWANG, Y., K.; CHANG, J. S.; HWANG, J. S. Furfural: Hemicellulose/xyloseederived biochemical. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v.2, n.5, p.438-454, 2008.

MANGONE, D. M.; CURRIE, C. R. Garden substrate preparation behaviours in fungus- growing ants. **Canadian Entomologist**, v. 139, n. 6, p. 841-849, 2007.

MARICONI, F.A.M. *As saúvas*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1970. 167p.

MARTIN, M. M. The Biochemical Bases of the Fungus-Attini Ants Symbiosis. **Science, Washington**, v.169, p. 16-20, 1970.

MARTIN, M.M. The evolution of insect–fungus associations from contact to stable symbiosis. **American Zoology** v. 32, p. 593–605, 1992.

MASON, W.R.M.; HUBER, J.T. & FERNÁNDEZ, F. El orden Hymenoptera. In: FERNÁNDEZ, F.; SHARKEY, M. J. (Eds.). Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical. Sociedad Colombiana de Entomología & Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2006. p. 1-6.

McKAY, A.M.; A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 56, n. 3, p. 355-358, 1988.

MCKENNA, D. D.; FARRELL, B. D. Tropical forests are both evolutionary cradles and museums of leaf beetle diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 29, p. 10947-10951, 2006.

MENDES, T. D. **Atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas de formigas Attini (Hymenoptera: Formicidae)**. 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho - UNESP, Rio Claro, 2010.

MENDES, T. D.; RODRIGUES, A.; DAYO-OWOYEMI, I.; MARSON, F. A. L.; PAGNOCCA, F. C. Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. **Insects**, Postfach, v. 3, n. 1, p. 228-245, 2012.

MENDES, T. D.; BORGES, W. S.,; RODRIGUES, A.; SOLOMON, S. E.; VIEIRA, P. C.; DUARTE, M. C. T.; PAGNOCCA, F. C. Anti-*Candida* Properties of Urauchimycins from Actinobacteria Associated with *Trachymyrmex* Ants **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

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

MIDDELHOVEN, W. J.; FONSECA, A.; CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. *Cryptococcus haglerorum*, sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast isolated from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 167-174, 2003.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the production of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-620, 1959.

MOLLER, I.E.; LICHT, H.H.F.; HARHOLT, J.; WILLATS, W.G.T.; BOOMSMA, J.J. The dynamics of plant cell-wall polysaccharide decomposition in leaf-cutting ant fungus gardens. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 3, p. 1-9, 2011.

MOLNÁROVÁ, J.; VADKERTIOVÁ, R.; STRATILOVÁ, E. Extracellular enzymatic activities and physiological profiles of yeasts colonizing fruit trees. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 53, n. 7, p. 1–11, 2013.

MORAIS, P. B.; MARTINS, M. B.; KLACZKO, L. B.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeast succession in the Amazon fruit *Parahancornia amapa* as resource partitioning among *Drosophila spp.* **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 12, p. 4251-4257, 1995.

MORAIS, P. B.; TEIXEIRA, L. C. R. S.; BOWLES, J. M.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C. A. *Ogataea falcaomoraisii* sp. nov., a sporogenous methylotrophic yeast from tree exudates. **FEMS Yeast Research** 5:81–85. 2004.

MORAIS, P. B.; ROSA, C. A.; PAGNOCCA, F. Yeast Communities in Tropical Rain Forests in Brazil and other South America Ecosystems. In: ROSA, C. A.; GABOR, P. (Eds.) **The yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Berlin: Springer-Verlag, 2006, p. 461-500.

MUCHOVEJ, J. J.; DELLA LUCIA, T. M. C. *Escovopsis*, a new genus from leaf cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomem invalidum. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 37, p. 191-195, 1990.

MUELLER, U. G.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in ants. **Science**, Washington, v. 281, n. 5385, p. 2034-2038, 1998.

MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R.; ADAMS, R. M. M.; MALLOCH, D. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **Quartely Review of Biology**, Chicago, v. 76, n. 2, p. 169-197, 2001.

MUELLER, U. G.; GERARDO, N. M.; AANEN, D. K.; SIX, D. L.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in insects. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 36, n. x, p. 563-595, 2005.

MUELLER, U. G.; DASH, D.; RABELING, C.; RODRIGUES, A. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. **Evolution**, Lawrence, v. 62, n. 11, p. 2894-2912, 2008.

NAKASE, T.; TSUZUKI, S.; TAKASHIMA, M. *Bullera taiwanensis* sp. nov. and *Bullera formosensis* sp. nov., two new ballistoconidiumforming yeasts isolated from plant leaves in Taiwan. **The Journal of general and applied microbiology**, Tokyo, v. 48, n. 6, p. 345-355, 2002.

NILSSON, R. H., KRISTANSSON, E., RYBERG, M., HALLENBERG, N., AND LARSSON, K.-H. Intraspecific ITS variability in the Kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 4, p. 193-201, 2008.

OH, D.-C.; SCOTT, J. J.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Discovery of new secondary metabolites mediating insect-microorganism symbioses. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 74, n. 9, p. SL2, 2008.

OH, D.-C.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 5, n. 6, p. 1-4, 2009.

OKINO, L.K.; MACHADO, K.M.G.; FABRIS, C. BONONI, V.L.R. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 16, n.8-9, p. 889-893, 2000.

OLIVEIRA, K.F.; MALAVOLTA, L.; SOUZA, C.S.; VICENTE, E.J.; LALUCE, C. Pectinolytic activity secreted by yeasts isolated from fermented citrus molasses. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n.4, p. 633-640, 2006.

PAGNOCCA, F. C.; CARREIRO, S. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J.; DA SILVA, O. A. Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 120, n. 5, p. 317-320, 1996.

PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI JÚNIOR, M. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 94, n. 4, p. 517-526, 2008.

PAGNOCCA, F. C.; LEGASPE, M. F. C.; RODRIGUES, A.; RUIVO, C. C. C.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI JÚNIOR, M.; FORTI, L. C. Yeasts isolated from a fungus-growing ant nest, including the description of *Trichosporon chiarelli* sp. nov., an

anamorphic basidiomycetous yeast. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 60, n. 6, p. 1454-1459, 2010.

PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; BACCI JÚNIOR, M. Microrganismos associados às formigas-cortadeiras. In: DELLA-LUCIA, T. M. C. **Formigas cortadeiras, da bioecologia ao manejo**. 1 ed. Viçosa: UFV, 2011, p. 262-283.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCOOL, V., T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, n.1, p.69-80, 2000.

PEDROLI, D. B., GOMES, E., MONTI, R., & CARMONA, E. C. (2008). Studies on productivity and charecterisation of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton v. 144, n. 2, p. 191-200, 2008.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Internetiional Microbiology** v.5, n.2, p.53-63, 2002.

PIMENTA, L.B.; ARAÚJO, M.S.; LIMA, R.; SILVA, J.M.S.; NAVES, V.G.O. Dinâmica de forrageamento e caracterização de colônias de *Acromyrmex balzani* (Emery, 1890) (Hymenoptera: Formicidae) em ambiente de cerrado goiano. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, n.9, p.1-12, 2007.

PIMENTA, R. S.; ALVES, P. D. D.; ALMEIDA, G. M. F.; SILVA, J. M. F.; MORAIS, P. B.; CORRÊA JR, A.; ROSA, C. A. Yeast communities in two Atlantic rain forest fragments in southeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 1, 90-95, 2009.

PINTO-TOMÁS, A. A.; ANDERSON, M. A.; SUEN, G.; STEVENSON, D. M.; CHU, F. S. T.; CLELAND, W. W.; WEIMER, P. J.; CURRIE, C. R. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. **Science**, Washington, v. 326, n. 5956, p. 1120-1123, 2009.

POLIZELLI, M.L.; RIZZATTI, A.C.; MONTI, R.; TERENCE, H.; JORGE, J. AMORIM, D. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Alemanha, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

POULSEN, M.; BOT, A. N. M.; CURRIE, C. R.; NIELSEN, M. G.; BOOMSMA, J. J. Within- colony transmission and the cost of mutualistic bacterium in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. **Functional Ecology**, Oxford, v. 17, p. 260-269, 2003.

POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Complexity of insect-fungal associations: exploring the influence of microorganisms on attine ant-fungus symbiosis. In: BOURTZIS, K.; MILLER, T. A. (Eds.) **Insect Symbiosis**, v. 2, Newbury: CRC Press, 2006. P. 57-77.

POULSEN, M.; ERHARDT, D. P.; MOLINARO, D. J.; LIN, T. L.; CURRIE, C. R. Antagonistic bacterial interactions helps shape host-symbiont dynamics within fungusgrowing ant-microbe mutualism. **PLoS One**, California, v. 2, n. 9, e 960, 2007.

POULSEN, M.; FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; CURRIE, C.R.; BOOMSMA, J.J. Ephemeral windows of opportunity for horizontal transmission of fungal symbionts in leafcutting ants. *Evolution*, Lawrence, v. 63, n. 9, p. 2235–2247, 2009.

PRATHYUSHA, K.; SUNEETHA, V. Bacterial pectinases and their potent biotechnological application in fruit processing/juice production industry: a review. *Journal of Phytology*, Humnabad, v. 3, n. 6, p. 16-19, 2011.

PRILLINGER, H.; MESSNER, R.; KÖNIG, H. et al. Yeasts associated with termites: a phenotypic and genotypic characterization and use of coevolution for dating evolutionary radiations in asco-and basidiomycetes. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 19, n. 2, p. 265-283, 1996.

PUSKAS, J.; SEO, K. S.; SEN, M. Y. Green polymer chemistry: Precision synthesis of novel multifunctional poly(ethylene glycol)s using enzymatic catalysis. *European Polymer Journal*, v. 47, n.4, p. 524–534, 2011.

RABINOVICH, M. L.; BOLOBOVA, A. V.; VASILCHENKO, L. G. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Clifton, v. 40, n. 1, p. 1-17, 2004.

RAMOS, L. P. The Chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v.26, n.6, p.863-871, 2003.

REYNOLDS, H. T.; CURRIE, C. R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. *Mycologia*, Lawrence, v. 96, n. 5, p. 955-959, 2004.

RIBEIRO, S. B. **Caracterização de espécies bacterianas encontradas em ninhos de *Atta sexdens* L. e isolamentos de *Streptomyces* de formigas da Tribo Attini.** 2000. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

RIBEIRO, D. S.; HENRIQUE, S. M. B.; OLIVIERA, L. S.; MACEDO, G. A.; FLEURI, L. F. Enzymes in juice processing: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 45, n. 4, p. 635-641, 2010.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. Jr.; HEBLING, M. J.A.; BUENO, O. C.; PENNING, L. H. Variability of non-mutualistic fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. *Folia Microbiologica*, Prague, v. 50, n. 5, p. 421-425, 2005a.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; PFENNING, L. H.; BACCI, M. Jr. Assessment of microfungi in fungus gardens free of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, Chico, v. 46, n. 2, p. 329-334, 2005b.

RODRIGUES, A.; BACCI, M. Jr.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. *Microbial Ecology*, Washington, v. 56, n.4, p. 604-614, 2008.

RODRIGUES, A.; CABLE, R. N.; MUELLER, U. G.; BACCI JÚNIOR, M.; PAGNOCCA, F. C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 331-342, 2009.

RODRIGUES, A.; SILVA, A.; BACCI JR., M.; FORTI, L. C.; PAGNOCCA, F. C. Filamentous fungi found on foundress queens of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 134, n. 4, p. 342-345, 2010.

RONHEDE, S.; BOOMSMA, J. J.; ROSENDAHL, S. Fungal enzymes transferred by leaf-cutting ants in their fungus garden. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, p. 101-106, 2004.

ROSA, C. A.; MORAIS, P. B.; SANTOS, S. R.; NETO, P. R. P.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeast communities associated with different plant resources in sandy coastal plains of south eastern Brazil. **Mycological Research**, Oxford, v. 99, n. 9, p. 1047-1054, 1995.

ROSA, C. A.; LACHANCE, M. A.; STARMER, W. T.; BAKER, J. S. F.; BOWLES, J. M.; SCHLAG-EDLER, B. *Kodamaea nitidulidarum*, *Candida restingae* and *Kodamaea anthophila*, three new related yeast species from ephemeral flowers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v. 49, n. 1, p. 309-318, 1999.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: a laboratory manual.**, Cold Spring Harbor, New York., 1989. 112 p.

SAMPAIO, J. P.; GADANHO, M.; SANTOS, S.; DUARTE, F. L.; PAIS, C.; FONSECA, A.; FELL, J. W. Polyphasic taxonomy of basidiomycetous yeasts genus *Rhodospodium*: *Rhodospodium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, London, v. 51, n. 2, p. 687-697, 2001.

SAMPAIO, J. P.; INACIO, J.; FONSECA, A.; GADANHO, M.; SPENCER-MARTINS, I.; SCORZETTI, G.; FELL, J. W. *Auriculibuller fuscus* gen. nov., sp. nov. and *Bullera japonica* sp. nov., novel taxa in the Tremellales. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London. v. 54, n. 3, p. 987-993, 2004.

SANCHÉZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnological advances**, Netherlands, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SANDRI IG, FONTANA RC, BARFKNECHT DM, SILVEIRA MM (2011) Clarification of fruit juices by fungal pectinases. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2217-2222, 2011.

SANTOS, A. V.; DILLON, R. J.; DILLON, V. M.; REYNOLDS, S. E.; SAMUELS, R. I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 239, n.2, p. 319-323, 2004.

SATOW, M.M.; ATTILI-ANGELIS, D.; DE HOOG, G.S.; ANGELIS, D.F.; VICENTE, V.A. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. **Stud Mycol**, Utrecht, v.61, p.157–163, 2008.

SCHENA, L., IPPOLITO, A., ZAHAVI, T., COHEN, L. NIGRO, F. & DROBY, S. Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 17, n. 3, p. 189-199, 1999.

SCHMIDT-DANNERT, C.; PLEISS, J. SCHMID, R.D. A Toolbox of recombinant lipases for industrial applications. **Annals New York academy of Sciences**, v. 864, n.1, p.12-22, 1998.

SCHIOTT, M.; DE FINE LICHT, H. H.; LANGE, L.; BOOMSMA, J. J. Towards a molecular understanding of symbiont function: identification of a fungal gene for degradation of xylan in the fungus gardens of leaf-cutting ants. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 40, 2008.

SCHIOTT, M.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; ROEPSTORFF, P.; BOOMSMA, J.J. Leaf-cutting ant fungi produce cell wall degrading pectinase complexes reminiscent of phytopathogenic fungi. **BMC Biology**, London, v. 8, n. 156, p. 1-12, 2010.

SCHULTZ, T.R.; MEIER, R.A Phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic Entomology**, Oxford, v.20, n.4, p. 337-370, 1995.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transition in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 2008.

SCORZETTI, G.; PETRESCU, I.; YARROW, D.; FELL, J. W. *Cryptococcus adeliensis* sp. nov., a xylanase producing basidiomycetous yeast from Antarctica. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 153-157, 2000.

SCORZETTI, G.; FELL, J. W.; FONSECA, A.; STATZELL-TALLMAN, A. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 2, n. 4, p. 495-517, 2002.

SCOTT, J. J.; BUDSBERG, K. J.; SUEN, G.; WIXONS, D. L.; BALSER, T. C.; CURRIE, C. R. Microbial community structure of leaf-cutter ant fungus gardens and refuse dumps. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 3, 2010.

SEIFERT, K. A.; SAMSON, R. A.; CHAPELA, I. H. *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. **Mycologia**, Bronx, v. 87, n. 3, p. 407-413, 1995.

SHARMA, A.; SHRIVASTAVA, A.; SHARMA, S.; GUPTA, R.; KUHAD, C. R. **Microbial Pectinases and Their Applications**. In: KUHAD, R. C.; SINGH, A. Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery. Springer, India, 2013, p. 107-124.

SHARMA, S.; MANDHAN, R. P.; SHARMA, J. *Pseudozyma* sp. SPJ: an economic and eco-friendly approach for degumming of flax fibers. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 27, n. 11, p. 2697-2701, 2011.

SHARMA, S.; MANDHAN, R. P.; SHARMA, J. Utilization of agro-industrial residues for pectinase production by the novel strain *Pseudozyma* sp. SPJ under solid state cultivation. **Annals of Microbiology**, Milan, v. 62, n. 1, p. 169-176, 2012.

SIBIRNY, A. A.; BORETSKY, Y. R. *Pichia guilliermodii*. In: SATYANARAYANA, T.; KUNZE, G. **Yeast biotechnology: diversity and applications**. Berlin: Springer, 2009, p. 114-132.

SILVA, A.; BACCI JÚNIOR, M.; SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. Survival of *Atta sexdens* works on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, n. 5, p. 397-313, 2003.

SILVA, E. G.; BORGES, M. F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R. F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 5, n. 9, p. 859-865, 2005.

SILVA, A.; BACCI JÚNIOR, M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Production of polysaccharidases in different carbon sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer), the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* Linnaeus. **Current Microbiology**, New York, v. 53, n. 1, p. 68-71, 2006.

SILVA, K. S.; CASTELLANI, M. A.; FORTI, L. C.; MOREIRA, A. A.; LEMOS, O. L.; CARNEIRO, R. C. S.; KHOURI, C. R.; RIBEIRO, A. E. L. Architecture of nests of *Acromyrmex* (Moellerius) *balzani* (Formicidae: Myrmicini: Attini) in pasture. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, Paraná, v. 3, n. 2, p. 99-116, 2010.

SILVA-PINHATI, A. C. O.; BACCI, M.; HINKLE, G.; SOGIN, M. L.; PAGNOCCA, F. C.; MARTINS, V. G.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 10, p. 1463-1472, 2004.

SILVESTRE, R.; SILVA, R. R. Guildas de formigas da Estação Ecológica Jataí, Luiz Antônio – SP – sugestões para aplicação do modelo de guildas como bio-indicadores ambientais. **Biotemas**, Florianópolis, v. 14, n. 1, p. 37-69, 2001.

SILVESTRE, R.; BRANDÃO, C.R.F & SILVA, R. R. Grupos funcionales de hormigas: el caso de los gremios del Cerrado. In: FERNÁNDEZ, F. (Ed.), **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Instituto Humboldt, Bogotá. 2003. P. 113-148.

SIQUEIRA, C.G.; BACCI JÚNIOR, M.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4820-4822, 1998.

SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R.; KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. Yeasts isolated from artificial lake waters. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, n. 11, p. 1206-1209, 1992.

SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R. Seasonal occurrence of yeasts and yeast-like organisms in the river Danube. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 77-80, 1997.

SLAVIKOVA, E.; VADKERTIOVA, R. The occurrence of yeasts in the forest soils. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 40, n. 3, p. 207-212, 2000.

SLAVIKOVA, E.; VADKERTIOVA, R.; VRANOVA, D. Yeasts colonizing the leaf surfaces. **Journal of basic microbiology**, Berlin, v. 47, n. 4, p. 344-350, 2007.

SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R.; VRÁNOVÁ, D. Yeasts colonizing the leaves of fruit trees. **Annals of Microbiology**, Milan, v. 59, n.3, p. 419-424, 2009.

SMITH, L. G. Plant cell division: building walls in the right places. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 1, p. 33-39, 2001.

SONG, C.; CHI, Z.; LI, J.; WANG, X. β -Galactosidase production by the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica and lactose hydrolysis. **Bioprocess Biosystems Engineering**, Heidelberg, v. 33, n. 9, p. 1025-1031, 2010.

STEVENS, B. J. H.; PAYNE, J. Cellulase and xylanase production by yeasts of the genus *Trichosporon*. **Microbiology**, Reading, v. 100, n. 2, p. 381-393, 1977.

STRAUSS, M. C. A.; JOLLY, N. P.; LAMBRECHTS, M. G.; VAN RESEMBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 1, p. 182-190, 2001.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 22, n.1, p. 33-46, 2002.

SUEN, G.; SCOTT, J.J.; AYLWARD, F.O.; ADAMS, S.M.; TRINGE, S.G.; PINTO-TOMÁS, A.A.; FOSTER, C.E.; PAULY, M.; WEIMER, P.J.; BARRY, K.W.; GOODWIN, L.A.; BOUFFARD, P.; LI, L.; OSTERBERGER, J.; HARKINS, T.T.; SLATER, S.C.; DONOHUE, T.J.; CURRIE, C.R. An insect herbivore microbiome with high plant biomass-degrading capacity. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. 1-14, 2010.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; NAKASE, T.; ICHIKAWA, T.; SHINODA, T.; NISHIKAWA, A. A basidiomycetous anamorphic yeast, *Trichosporon terricola* sp. nov. isolated from soil. **The Journal of general and applied microbiology**, Tokyo, v. 48, n. 5, p. 293-297, 2002.

SUH, S. O. MARSHALL, C. J.; MCHUGH, J. V.; BLACKWELL, M. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 11, p. 3137-3145, 2003.

TAMURA K.; PETERSON D.; PETERSON N.; STECHER G.; NEI M.; KUMAR S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TEAM, R. D.C. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013. URL <http://www.R-project.org/>.

TEATHER, R.M.; WOOD, P.J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.

TEIXEIRA, A. C. P.; MARINI, M. M.; NICOLI, J. R.; ANTONINI, Y.; MARTINS, R. P.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. *Starmerella meliponinorum* sp.nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 53, n. 1, p. 339-343, 2003.

THONGEKKAEW, J.; KHUMSAP, A.; CHATSA-NGA, P. Yeasts in mixed deciduous forest areas of Phujong Nayoy National Park and their ability to produce xylanase and carboxymethylcellulose. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Thailand, v. 34, n. 2, p. 157-163, 2012.

TRIPLEHORN, C.A. & JOHNSON, N.J. Borror and Delong's introduction to the study of insects. 7a ed., Thomson Brooks, Cole, Belmont. 864p, 2005.

TROY, G. C.; PANCIERA, D. L.; PICKETT, J. P.; SUTTON, D. A.; GENE, J. ; CANO, J. F. ; GUARRO, J. ; THOMPSON, E. H.; WICKES, B. L. Mixed infection caused by *Lecythophora canina* sp. nov. and *Plectosphaerella cucumerina* in a German shepherd dog. **Medical Mycology**, v. 51, n. 5, p. 455-460, 2013.

VALÉRIO, E.; GADANHO, M.; SAMPAIO, J. P.. *Sporobolomyces odoratus* sp. nov., a new species in the *Sporidiobolus ruineniae* clade. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 9-16, 2002.

VAN DER WALT, J. P.; SCOTT, D. B. *Bullera dendrophila* sp. n. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 383-387, 1970.

VAN BORM, S.; BILLEN, J.; BOOMSMA, J. J. The diversity of microorganisms associated with *Acromyrmex* leafcutter ants. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2002.

VICENTE, V.A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M.R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, L. M.; NAJAFZADEH, M.J.; De HOO, G.S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Stud Mycol**, Utrecht, v. 61, n. 1, p. 137-144, 2008.

VILLENNA, A. M.; IRANZO, U. J. F.; PERÉZ, A. I. B. b-Glucosidase activity in wine yeasts: application in enology. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, n. 3, p. 420-425, 2007.

VILLESEN, P.; MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; ADAMS, R. M. M.; BOUCK, A. C. Evolution of ant-cultivar specialization and cultivar switching in *Apterostigma* fungus-growing ants. **Evolution**, Lawrence, v. 58, n. 10, p. 2252-2265, 2004.

WANG, Q. M.; BAI, F. Y. Molecular phylogeny of basidiomycetous yeasts in the *Cryptococcus luteolus* lineage (Tremellales) based on nuclear rRNA and mitochondrial cytochrome b gene sequence analyses: proposal of *Derxomyces* gen. nov. and *Hannaella* gen.nov., and description of eight novel *Derxomyces* species. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam v. 8, n. 5, p. 799-814, 2008.

WANG, Q. M.; BAI, F. Y.; LU, H. Z.; JIA, J. H.; TAKASHIMA, M. *Bullera cylindrica*, *Bullera hubeiensis* and *Bullera nakasei*, ballistoconidium-forming yeast species isolated from plant leaves. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 54, n. 5, p. 1877-1882, 2004.

WANG, Q. M.; BAI, F. Y.; FUNGSIN, B.; BOEKHOUT, T.; NAKASE, T. Proposal of *Mingxiaea* gen. nov. for the anamorphic basidiomycetous yeast species in the *Bulleribasidium* clade (Tremellales) based on molecular phylogenetic analysis, with six new combinations and four novel species. **International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 61, n. 1, p. 210-219, 2011.

WEBER, N. A. **Gardening ants: The Attines**. Philadelphia: American Philosophical Society, v. 92, 1972. 146 p.

WHITAKER, J. R. Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 6, n. 8, p. 341-349, 1984.

WHITAKER, J. R. Microbial pectinolytic enzymes. **Microb Enzyme Biotechnol**, v. 2, n. 1, p. 133-176, 1990

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE T. J. (Eds.) **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WILSON, E.O. Causes of ecological success: The case of the ants. **Journal of Animal Ecology**, London, v. 56, n. 1, p. 1-9, 1987.

WYMAN, C. E. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. **Bioresource Technology**, v.50, n.1, p.3-15, 1994.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Eds.) **The yeasts: a taxonomic study**, 4th edn. Amsterdam: Elsevier, 1998. pp 77-100.

YOUNGSTEADT, E. All that makes fungus gardens grow. **Science**, Washington, v. 320, n. 5879, p. 1006-1007, 2008.

YURKOV, A. M.; KEMLER, M.; BEGEROW, D.. Species accumulation curves and incidence-based species richness estimators to appraise the diversity of cultivable yeasts from beech forest soils. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 8, p. e23671, 2011.

YURKOV, A. M.; KEMLER, M.; BEGEROW, D. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. **Fungal Ecology**, v. 5, n. 1, p. 24-35, 2012.

ZALAR, P.; GOSTINČAR, C.; HOOG, G.S.; URŠIČ, V.; SUDHADHAM, M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 61, n. 1, p. 21-38, 2008.

ZHANG, M. M.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Symbiont recognition of mutualistic bacteria by *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **The ISME Journal**, New York, v. 1, n. 4, p. 313-320, 2007.

ZHAO, J.; ZENG, J.; de HOOG, G.S.; ATTILI-ANGELIS, D.; PRENAFETA-BOLDÚ, F.X. Isolation and identification of black yeasts by enrichment on atmospheres of monoaromatic hydrocarbons. **Microb Ecol**, New York, v.60, p.149-156, 2010.

ZUCCHI, T.D.; GUIDOLIN, A.S.; CÔNSOLI, F.L. Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae). **Microbiological Research**, Jena, v. 166, n. 1, p. 68-76, 2011.

Apêndices

APÊNDICE A (Capítulo 1) – Identificação das leveduras de ninhos da formiga cortadeira *Acromyrmex balzani* de acordo com os marcadores moleculares.

Espécies	D1/D2					² Agrupamento MSP-PCR
	Genbank			CBS		
	¹ bp	%	Accession#	%	Accession#	
<i>Aureobasidium leucospermi</i>	572	99	JN712553	-	-	TO 294 TO 065 , TO 012, TO 021, TO 024, TO 044, TO 071, TO 097 , TO 102, TO 108 , TO 109, TO 114, TO 138 , TO 155, TO 175, TO 176, TO 178 , TO 179, TO 181, TO 184, TO 288 , TO 289, TO 290, TO 291, TO 302 , TO 556 , TO 559 , TO 560, TO 594 , TO 859, TO 860 , TO 874, TO 875 , TO 877, TO 878 , TO 880 , TO 924, TO 928, TO 952, TO 975 , TO 977, TO 978, TO 979, TO 980 , TO 982 , TO 983 , TO 995 , TO 996, TO 1066 , TO 1082 TO 100 , TO 563, TO 567, TO 573 , TO 575 , TO 640, TO 660, TO 848, TO 855, TO 856, TO 858, TO 861 , TO 862 , TO 863 , TO 879, TO 986
<i>Aureobasidium pullulans</i>	571	100	AB617922	-	-	TO 099 , TO 101 , TO 158 , TO 182 , TO 186 , TO 295 , TO 519, TO 528 , TO 853 , TO 854, TO 864 , TO 950 ,
<i>Aureobasidium pullulans var. melanogenum</i>	571	99	FJ150920	-	-	
<i>Aureobasidium sp.</i>	571	100	JX462674	-	-	

APÊNDICE A (Continuação)

Espécies	D1/D2					² Agrupamento MSP-PCR
	Genbank			CBS		
	¹ bp	%	Accession#	%	Accession#	
<i>Aureobasidium sp.</i>	571	100	JX462674	-	-	TO 1022
<i>Brettanomyces naardenensis</i>	570	100	AY969108	100	CBS 6116	TO 807, TO 776, TO 783, TO 808
<i>Bullera sp.</i>	600	97	AF547661	97	CBS 9931	TO 115
<i>Candida albicans</i>	572	99	AB828131	-	-	TO 205, TO 202, TO 207, TO 219, TO 220, TO 221, TO 770, TO 772, TO 773, TO 774, TO 775, TO 784, TO 785, TO 786, TO 788, TO 791, TO 792, TO 793, TO 801, TO 804
<i>Candida carpophila</i>	571	99	FM180531	-	-	TO 529, TO 530
<i>Candida cellae</i>	494	99	AY861673	99	CBS 10086	TO 203, TO 204, TO 205, TO 206, TO 208, TO 214, TO 215, TO 216, TO 217
<i>Candida infanticola</i>	558	99	DQ438230	99	CBS 7922	TO 811, TO 814
<i>Candida maltosa</i>	523	99	AF506755	99	CBS 5611	TO 815, TO 781, TO 782
<i>Candida melibiosica</i>	514	100	U44813	100	CBS 5814	TO 531, TO 516, TO 517, TO 522, TO 532, TO 533, TO 538, TO 539, TO 550, TO 551, TO 552, TO 553, TO 554, TO 557

APÊNDICE A (Continuação)

Espécies	D1/D2					² Agrupamento MSP-PCR
	Genbank			CBS		
	¹ bp	%	Accession#	%	Accession#	
<i>Candida orthopsilosis</i>	570	100	AB772042	-	-	TO 416, TO 419, TO 488, TO 984, TO 989
<i>Candida parapsilosis</i>	570	100	JX441605	-	-	TO 150
<i>Candida tropicalis</i>	570	100	AB772433	-	-	TO 802, TO 287, TO 803, TO 806
<i>Coniochaeta canina</i>	559	98	JX481774	-	-	TO 352, TO 354, TO 355, TO 356, TO 373, TO 374, TO 375, TO 376, TO 377, TO 759
<i>Cryptococcus flavescens</i>	597	100	FN428866	-	-	TO 013, TO 561, TO 570
<i>Cryptococcus flavus</i>	597	100	AF075497	100	CBS 331	TO 197, TO 201, TO 268, TO 346, TO 398
<i>Cryptococcus heveanensis</i>	599	99	AB557813	-	-	TO 951
<i>Cryptococcus laurentii</i>	597	99	FN428900	-	-	TO 023, TO 026, TO 047, TO 067, TO 272, TO 303, TO 306, TO 308, TO 312, TO 313, TO 319, TO 369, TO 372, TO 380, TO 381, TO 436, TO 437, TO 441, TO 493, TO 564, TO 568, TO 580, TO 602, TO 604,

APÊNDICE A (Continuação)

Espécies	D1/D2					² Agrupamento MSP-PCR
	Genbank			CBS		
	¹ bp	%	Accession#	%	Accession#	
<i>Cryptococcus laurentii</i>	597	99	FN428900	-	-	TO 607, TO 608 , TO 615 , TO 616 , TO 629 , TO 633, TO 637, TO 641, TO 650, TO 655 , TO 659, TO 668, TO 669, TO 672, TO 673 , TO 675 , TO 681, TO 682, TO 695, TO 701, TO 715, TO 720, TO 723 , TO 724, TO 725, TO 726, TO 727, TO 730 , TO 731, TO 736, TO 737, TO 738, TO 740 , TO 746 , TO 747, TO 751, TO 756 , TO 757 , TO 760 , TO 762 , TO 849, TO 850, TO 851, TO 857, TO 876, TO 885 , TO 887, TO 890 , TO 892 , TO 893, TO 895 , TO 900 , TO 902, TO 903, TO 906, TO 907, TO 910 , TO 911, TO 913, TO 915, TO 916, TO 917 , TO 918 , TO 919, TO 920 , TO 921, TO 922, TO 929 , TO 930 , TO 932 , TO 933, TO 935 , TO 936 , TO 939 , TO 943 , TO 944, TO 945, TO 946, TO 976 , TO 981 , TO 985, TO 987, TO 988 , TO 990 , TO 997 , TO 999 , TO 1003, TO 1004 , TO 1007 , TO 1030, TO 1032 , TO 1034,

APÊNDICE A (Continuação)

Espécies	D1/D2					² Agrupamento MSP-PCR
	Genbank			CBS		
	¹ bp	%	Accession#	%	Accession#	
<i>Cryptococcus laurentii</i>	597	99	FN428900	-	-	TO 1037, TO 1039, TO 1040 , TO 1041, TO 1042 , TO 1043 , TO 1044 , TO 1045, TO 1046 , TO 1048 , TO 1050 , TO 1052 , TO 1053 , TO 1058, TO 1070
<i>Cryptococcus mangaliensis</i>	591	99	FJ008046	99	CBS 10870	TO 011 , TO 031, TO 032, TO 033 , TO 034, TO 035, TO 045 , TO 070 , TO 072, TO 075, TO 079, TO 083
<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	597	100	AM262324	100	CBS 10406	TO 022 , TO 037
<i>Cryptococcus sp.</i>	597	99	KC182138	-	-	TO 144 , TO 173 , TO 180, TO 183 , TO 185, TO 190, TO 191 , TO 194 , TO 196 , TO 198 , TO 199 , TO 209 , TO 440 , TO 447, TO 450, TO 452, TO 469 , TO 495 , TO 758 , TO 954 , TO 1071
<i>Dothichiza pithyophila</i>	573	97	FJ150969	-	-	TO 948 , TO 852, TO 865, TO 866 , TO 867, TO 868 , TO 869, TO 870, TO 881, TO 882, TO 883, TO 947, TO 949, TO 955, TO 992, TO 993, TO 994, TO 1023, TO 1024, TO 1025,

APÊNDICE A (Continuação)

Espécies	D1/D2					² Agrupamento MSP-PCR
	Genbank			CBS		
	¹ bp	%	Accession#	%	Accession#	
<i>Dothichiza pithyophila</i>	573	97	FJ150969	-	-	TO 1072, TO 1073, TO 1074, TO 1075
<i>Exophiala bergeri</i>	575	100	FJ358240	100	CBS 353.52	TO 390
<i>Kazachstania unispora</i>	571	99	HM627101	-	-	TO 1115 , TO 518, TO 521, TO 1116, TO 1117 , TO 1119, TO 1120
<i>Kazachstania sp.</i>	570	100	JQ861272	-	-	TO 525 , TO 512, TO 513, TO 514, TO 515, TO 520, TO 523, TO 526, TO 535, TO 536 , TO 537, TO 544, TO 545 , TO 546
<i>Kwoniella mangroviensis</i>	599	100	AF444742	100	CBS 8507	TO 017 , TO 015, TO 016, TO 025 , TO 029 , TO 046 , TO 059 , TO 061, TO 062, TO 063, TO 064 , TO 069 , TO 076 , TO 093 , TO 106 , TO 142
<i>Meyerozyma caribbica</i>	570	100	KC111450	-	-	TO 187 , TO 210 , TO 211, TO 212, TO 213 , TO 389 , TO 422, TO 425, TO 431 , TO 445, TO 446, TO 455, TO 458, TO 460, TO 461, TO 465, TO 471 , TO 474 , TO 479 , TO 484, TO 485, TO 486, TO 487, TO 489, TO 490, TO 491 , TO 498, TO 499, TO 540 , TO 543,

APÊNDICE A (Continuação)

Espécies	D1/D2					² Agrupamento MSP-PCR
	Genbank			CBS		
	¹ bp	%	Accession#	%	Accession#	
<i>Meyerozyma caribbica</i>	570	100	KC111450	-	-	TO 547, TO 548, TO 549, TO 686, TO 687 , TO 728, TO 753, TO 777, TO 780, TO 787 , TO 794, TO 795, TO 796, TO 800, TO 805 , TO 809, TO 810, TO 812, TO 813, TO 1107 , TO 1108, TO 1109, TO 1110, TO 1111, TO 1112, TO 1113
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	570	100	KC798418	-	-	TO 500, TO 439 , TO 473, TO 501, TO 502, TO 569, TO 1086, TO 1089, TO 1091 , TO 1094, TO 1102, TO 1103 , TO 1106
<i>Moniliella fonsecae</i>	535	99	DQ400366	100	CBS 10567	TO 991
<i>Pseudozyma aphidis</i>	576	99	AB617892	-	-	TO 189
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	605	100	DQ008953	100	CBS 10077	TO 028, TO 082, TO 105, TO 107, TO 188, TO 192, TO 195, TO 200, TO 1056
<i>Pseudozyma jejuensis</i>	605	99	FN428892	-	-	TO 058, TO 066 , TO 078, TO 080, TO 1057
<i>Pseudozyma parantarctica</i>	605	100	JN940524	-	-	TO 077

APÊNDICE A (Continuação)

Espécies	D1/D2					² Agrupamento MSP-PCR
	Genbank			CBS		
	¹ bp	%	Accession#	%	Accession#	
<i>Pseudozyma shanxiensis</i>	589	99	DQ008955	99	CBS 10075	TO 1063
<i>Rhodotorula dairenensis</i>	571	100	AF387146	100	CBS 7715	TO 310, TO 274, TO 296, TO 311
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	571	100	AF444738	100	CBS 9070	TO 019, TO 018, TO 020, TO 630, TO 755, TO 886, TO 905, TO 925, TO 1031, TO 1033
<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	571	99	AB773341	-	-	TO 1015, TO 1047, TO 1054, TO 1069
<i>Rhodotorula sp.</i>	571	100	AF387142	-	-	TO 705, TO 651, TO 729, TO 934, TO 941
<i>Rhodospidium paludigenum</i>	575	99	AF363640	99	CBS 6566	TO 626, TO 612, TO 643, TO 649, TO 663, TO 677, TO 678, TO 679, TO 680, TO 683, TO 688, TO 692, TO 693, TO 697, TO 702, TO 703, TO 706, TO 733, TO 884, TO 888, TO 889, TO 891, TO 894, TO 899, TO 901, TO 908, TO 909, TO 912, TO 914, TO 923, TO 926, TO 927, TO 937, TO 938, TO 942, TO 1036, TO 1049, TO 1051, TO 1059, TO 1068

APÊNDICE A (Continuação)

Espécies	D1/D2					² Agrupamento MSP-PCR
	Genbank			CBS		
	¹ bp	%	Accession#	%	Accession#	
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	573	100	AF070426	100	CBS 349	TO 050, TO 055, TO 378, TO 424, TO 438, TO 442, TO 443, TO 448, TO 453, TO 1035, TO 1038
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	574	100	FJ743624	-	-	TO 618, TO 048, TO 056, TO 293, TO 307, TO 417, TO 421, TO 423, TO 426, TO 427, TO 429, TO 430, TO 444, TO 449, TO 451, TO 454, TO 456, TO 457, TO 459, TO 463, TO 464, TO 472, TO 475, TO 477, TO 480, TO494, TO 497, TO 904
<i>Sporisorium chrysopogonis</i>	600	99	AY740131	-	-	TO 027
<i>Sporisorium elionuri</i>	605	99	AY740157	-	-	TO 049, TO 051, TO 057, TO 953, TO 1011, TO 1017, TO 1018, TO 1076, TO 1078, TO 1080, TO 1083
<i>Starmerella sp.</i>	480	100	KF247224	-	-	TO 125 TO 126, TO 127, TO 129, TO 130, TO 131, TO 132, TO 133, TO 134, TO 135, TO 136, TO 137, TO 139, TO 140, TO 141

APÊNDICE A (Continuação)

Espécies	D1/D2					² Agrupamento MSP-PCR
	Genbank			CBS		
	¹ bp	%	Accession#	%	Accession#	
<i>Torulasporea globosa</i>	574	99	U72166	99	CBS 764	TO 998, TO 1000, TO 1002
<i>Trichosporon asahii</i>	597	100	EU559350	100	CBS 2479	TO 286, TO 492, TO 579, TO 601, TO 603, TO 605, TO 606, TO 613, TO 614, TO 623, TO 674, TO 816, TO 817, TO 818, TO 819, TO 820, TO 821, TO 822, TO 823, TO 824, TO 825, TO 826, TO 827, TO 828, TO 829, TO 830, TO 838, TO 847, TO 1010, TO 1012, TO 1013, TO 1014, TO 1084, TO 1085, TO 1090, TO 1092, TO 1093, TO 1095, TO 1096, TO 1097, TO 1098, TO 1099, TO 1100, TO 1101, TO 1104, TO 1105
<i>Trichosporon chiarelli</i>	594	100	EU030272	100	CBS11177	TO 1009
<i>Trichosporon insectorum</i>	597	100	AY520383	100	CBS 10422	TO 241
<i>Trichosporon loubieri</i>	594	100	JN939448	100	CBS 7719	TO 769
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	594	100	JQ266092	-	-	TO 778, TO 428, TO 433, TO 434, TO 435, TO 462, TO 466, TO 467, TO 468, TO 504, TO 505, TO 506,

APÊNDICE A (Continuação)

Espécies	D1/D2					² Agrupamento MSP-PCR
	Genbank			CBS		
	¹ bp	%	Accession#	%	Accession#	
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	594	100	JQ266092	-	-	TO 507, TO 779 , TO 831, TO 832, TO 833, TO 834, TO 835, TO 836, TO 837, TO 839, TO 840, TO 841, TO 842, TO 843, TO 844, TO 845, TO 846, TO 871 , TO 872, TO 873 , TO 957 , TO 958, TO 959 , TO 960, TO 961, TO 962 , TO 963, TO 964 , TO 966 , TO 967 , TO 968, TO 969 , TO 970 , TO 971 , TO 972 , TO 973 , TO 974 , TO 1016 , TO 1019 , TO 1021 , TO 1026 , TO 1027 , TO 1028 , TO 1029 , TO 1081 , TO 1114 , TO 1118 , TO 1121 , TO 1122

Estirpes destacadas em negrito foram sequenciadas; (¹bp): pares de bases; ²sequencias agrupadas pelo MSP-PCR (Microsatellite Primed Technique).

APÊNDICE B (Capítulo 2) - Perfil da atividade enzimática extracelular e assimilação de fontes de carbono por espécies de leveduras isoladas de jardim de fungo e material de descarte de ninhos de *A. balzani* em ambiente preservado e perturbado de cerrado.

Estirpes jardins de fungo – Ambiente Preservado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 093	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 115	<i>Bullera</i> sp.	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 142	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 144	<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 206	<i>Candida cellae</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
TO 268	<i>Cryptococcus flavus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 346	<i>Cryptococcus flavus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 398	<i>Cryptococcus flavus</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 428	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 433	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 434	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 435	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 466	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 467	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 468	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 504	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 505	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 506	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 507	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 762	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
TO 784	<i>Candida albicans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 785	<i>Candida albicans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 786	<i>Candida albicans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 787	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

APÊNDICE B – Continuação

Estirpes jardins de fungo – Ambiente Preservado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 791	<i>Candida albicans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 792	<i>Candida albicans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 793	<i>Candida albicans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 794	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 795	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 796	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 831	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 832	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 833	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 834	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 835	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 836	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 837	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 838	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 839	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 840	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 841	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 842	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 843	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 844	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 845	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 846	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 847	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 871	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 872	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 873	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

APÊNDICE B – Continuação

Estirpes jardins de fungo – Ambiente Preservado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 957	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 958	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 959	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 960	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 961	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 962	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 963	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 964	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 966	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 967	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 968	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 969	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 970	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 971	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 972	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 973	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 974	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1015	<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1016	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1017	<i>Sporisorium elionuri</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1018	<i>Sporisorium elionuri</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1019	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1021	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1026	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1027	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1028	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+

APÊNDICE B – Continuação

Estirpes jardins de fungo – Ambiente Preservado		Triagens enzimáticas							Assimilação					
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 1029	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1076	<i>Sporisorium elionuri</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1076	<i>Sporisorium elionuri</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1078	<i>Sporisorium elionuri</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1080	<i>Sporisorium elionuri</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1081	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1121	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1122	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Total		52	3	26	44	14	55	0	0	83	80	74	81	80

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Jardins de Fungo – Ambiente Perturbado		Triagens enzimáticas							Assimilação					
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 125	<i>Starmerella</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
TO 126	<i>Starmerella</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
TO 127	<i>Starmerella</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
TO 129	<i>Starmerella</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
TO 130	<i>Starmerella</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
TO 131	<i>Starmerella</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
TO 132	<i>Starmerella</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
TO 133	<i>Starmerella</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
TO 134	<i>Starmerella</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
TO 135	<i>Starmerella</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
TO 136	<i>Starmerella</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
TO 137	<i>Starmerella</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Jardins de Fungo – Ambiente Perturbado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 138	<i>Aureobasidium pullulans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 139	<i>Starmerella</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
TO 140	<i>Starmerella</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
TO 141	<i>Starmerella</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
TO 203	<i>Candida cellae</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
TO 204	<i>Candida cellae</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
TO 208	<i>Candida cellae</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
TO 214	<i>Candida cellae</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
TO 608	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 615	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 755	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	W
TO 756	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
TO 757	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
TO 758	<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 759	<i>Coniochaeta canina</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	W
TO 788	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 917	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 918	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 919	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 997	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 998	<i>Torulaspora globosa</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 999	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1000	<i>Torulaspora globosa</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 1002	<i>Torulaspora globosa</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 1009	<i>Trichosporon chiarellii</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
Total		13	0	28	11	7	9	1	0	37	11	9	27	13

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material de Descarte – Ambiente Preservado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 011	<i>Cryptococcus mangaliensis</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 012	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 013	<i>Cryptococcus flavescens</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 015	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 016	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 017	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 018	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
TO 019	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
TO 020	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
TO 021	<i>Aureobasidium pullulans</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 022	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 023	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 024	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 025	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 026	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 027	<i>Sporisorium chrysopogonis</i>	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 028	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 029	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 031	<i>Cryptococcus mangaliensis</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 032	<i>Cryptococcus mangaliensis</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 033	<i>Cryptococcus mangaliensis</i>	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 034	<i>Cryptococcus mangaliensis</i>	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 035	<i>Cryptococcus mangaliensis</i>	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 037	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 044	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 045	<i>Cryptococcus mangaliensis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material de Descarte – Ambiente Preservado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 046	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 047	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 048	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 049	<i>Sporisorium elionuri</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 050	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 051	<i>Sporisorium elionuri</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 055	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 056	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 057	<i>Sporisorium elionuri</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 058	<i>Pseudozyma jejuensis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 059	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 061	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 062	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 063	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 064	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 065	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 066	<i>Pseudozyma jejuensis</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 067	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 069	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 070	<i>Cryptococcus mangaliensis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 071	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 072	<i>Cryptococcus mangaliensis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 075	<i>Cryptococcus mangaliensis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 076	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 077	<i>Pseudozyma parantarctica</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 078	<i>Pseudozyma jejuensis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+

APENDICE B - Continuação

Estirpes Material de Descarte – Ambiente Preservado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 079	<i>Cryptococcus mangaliensis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 080	<i>Pseudozyma jejuensis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 082	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 083	<i>Cryptococcus mangaliensis</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 105	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 106	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 107	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 202	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 205	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 207	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 209	<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 210	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 211	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 212	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 213	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 217	<i>Candida cellae</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
TO 219	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
TO 220	<i>Candida albicans</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 221	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
TO 272	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 274	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 286	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 287	<i>Candida tropicalis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
TO 288	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 289	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 290	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material de Descarte – Ambiente Preservado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 291	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 293	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 294	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 295	<i>Aureobasidium</i> sp	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 296	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 302	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 303	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
TO 306	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
TO 307	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 308	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
TO 310	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 311	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 312	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
TO 313	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
TO 319	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
TO 389	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 390	<i>Exophiala bergeri</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
TO 416	<i>Candida orthopsilosis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
TO 417	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 419	<i>Candida orthopsilosis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
TO 421	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 422	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 423	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 424	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 425	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 426	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material de Descarte – Ambiente Preservado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 427	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 429	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 430	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 431	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 436	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 437	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 438	<i>Rhodospodium toruloides</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 439	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 440	<i>Cryptococcus sp.</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 441	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 442	<i>Rhodospodium toruloides</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 443	<i>Rhodospodium toruloides</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 444	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 445	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 446	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 447	<i>Cryptococcus sp.</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 448	<i>Rhodospodium toruloides</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 449	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 450	<i>Cryptococcus sp.</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 451	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 452	<i>Cryptococcus sp.</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 453	<i>Rhodospodium toruloides</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 454	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 455	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 456	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 457	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material de Descarte – Ambiente Preservado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 458	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 459	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 460	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 461	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 462	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 463	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 464	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 465	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 469	<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 471	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 472	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 473	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 474	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 475	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 477	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 479	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 480	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 484	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 485	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 486	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 487	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 488	<i>Candida orthopsilosis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
TO 489	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 490	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 491	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 492	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material de Descarte – Ambiente Preservado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 493	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 494	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 495	<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 497	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 498	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 499	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 500	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 501	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 512	<i>Kazachstania</i> sp.	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 513	<i>Kazachstania</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 514	<i>Kazachstania</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 515	<i>Kazachstania</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 516	<i>Candida melibiosica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 517	<i>Candida melibiosica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 518	<i>Kazachstania unispora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 519	<i>Aureobasidium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 520	<i>Kazachstania</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 521	<i>Kazachstania unispora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 522	<i>Candida melibiosica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 523	<i>Kazachstania</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 525	<i>Kazachstania</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 526	<i>Kazachstania</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 528	<i>Aureobasidium</i> sp.	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	W
TO 529	<i>Candida carpophila</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 530	<i>Candida carpophila</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 531	<i>Candida melibiosica</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material de Descarte – Ambiente Preservado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 532	<i>Candida melibiosica</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 533	<i>Candida melibiosica</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 535	<i>Kazachstania</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 536	<i>Kazachstania</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 537	<i>Kazachstania</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 538	<i>Candida melibiosica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 539	<i>Candida melibiosica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 540	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 543	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 544	<i>Kazachstania</i> sp.	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 545	<i>Kazachstania</i> sp.	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 546	<i>Kazachstania</i> sp.	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 547	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
TO 548	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
TO 549	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
TO 550	<i>Candida melibiosica</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 551	<i>Candida melibiosica</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 552	<i>Candida melibiosica</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 668	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
TO 669	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
TO 672	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
TO 673	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
TO 674	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 675	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
TO 677	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 678	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material de Descarte – Ambiente Preservado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 679	<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 680	<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 681	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
TO 682	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
TO 683	<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 686	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 687	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 688	<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	W
TO 692	<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 693	<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 695	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 697	<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 701	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 702	<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	W
TO 703	<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 705	<i>Rhodotorula</i> sp.	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	W
TO 706	<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 715	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 720	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 723	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 724	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 725	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 726	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 727	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 728	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 729	<i>Rhodotorula</i> sp.	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material de Descarte – Ambiente Preservado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 730	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 731	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 733	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 736	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 737	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 738	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 740	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 746	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 747	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 751	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 753	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 760	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
TO 769	<i>Trichosporon loubieri</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 770	<i>Candida albicans</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 772	<i>Candida albicans</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 773	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 774	<i>Candida albicans</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 775	<i>Candida albicans</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 776	<i>Brettanomyces naardenensis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 777	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 778	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 779	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 780	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 800	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 801	<i>Candida albicans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 802	<i>Candida tropicalis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material de Descarte – Ambiente Preservado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 803	<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
TO 804	<i>Candida albicans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 805	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 806	<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 807	<i>Brettanomyces naardenensis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 808	<i>Brettanomyces naardenensis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 809	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 810	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 811	<i>Candida infanticola</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	W
TO 812	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 813	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 814	<i>Candida infanticola</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 848	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 849	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 850	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 851	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 852	<i>Dothichiza pithyophila</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	W
TO 853	<i>Aureobasidium</i> sp.	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 854	<i>Aureobasidium</i> sp.	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 855	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 856	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 857	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 858	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 859	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material de Descarte – Ambiente Preservado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 950	<i>Aureobasidium</i> sp.	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	W
TO 951	<i>Cryptococcus heveanensis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 952	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 953	<i>Sporisorium elionuri</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 954	<i>Cryptococcus</i> sp.	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 955	<i>Dothichiza pithyophila</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	W
TO 975	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 976	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 977	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 978	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 979	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 980	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 981	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 982	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 983	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 984	<i>Candida orthopsilosis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
TO 985	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 986	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
TO 987	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 988	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 989	<i>Candida orthopsilosis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
TO 990	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 991	<i>Moniliella fonsecae</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	W	-
TO 992	<i>Dothichiza pithyophila</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	W
TO 993	<i>Dothichiza pithyophila</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	W
TO 994	<i>Dothichiza pithyophila</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	W

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material de Descarte – Ambiente Preservado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 995	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 996	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1011	<i>Sporisorium elionuri</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1022	<i>Aureobasidium sp.</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 1023	<i>Dothichiza pithyophila</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
TO 1024	<i>Dothichiza pithyophila</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
TO 1025	<i>Dothichiza pithyophila</i>	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
TO 1072	<i>Dothichiza pithyophila</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
TO 1073	<i>Dothichiza pithyophila</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
TO 1074	<i>Dothichiza pithyophila</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
TO 1075	<i>Dothichiza pithyophila</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
TO 1082	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1083	<i>Sporisorium elionuri</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1106	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1107	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1108	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1109	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1110	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1111	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1112	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1113	<i>Meyerozyma caribbica</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
TO 1114	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1115	<i>Kazachstania unispora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 1116	<i>Kazachstania unispora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 1117	<i>Kazachstania unispora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 1118	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+

APÊNDICE B – Continuação

Estirpes Material de Descarte – Ambiente Preservado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 1119	<i>Kazachstania unispora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TO 1120	<i>Kazachstania unispora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Total		157	44	254	159	140	78	50	15	360	327	284	291	306

APENDICE B - Continuação

Estirpes Material Descartado – Ambiente Perturbado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 097	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 099	<i>Aureobasidium sp.</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 100	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 101	<i>Aureobasidium sp.</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 102	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 108	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 109	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 114	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 150	<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
TO 155	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 158	<i>Aureobasidium sp.</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 173	<i>Cryptococcus sp.</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 175	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 176	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 178	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 179	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 180	<i>Cryptococcus sp.</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+

APÊNDICE B – Continuação

Estirpes Material Descartado – Ambiente Perturbado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 181	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 182	<i>Aureobasidium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 183	<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 184	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 185	<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 186	<i>Aureobasidium</i> sp.	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 187	<i>Meyerozyma caribbica</i>	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
TO 188	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TO 189	<i>Pseudozyma aphidis</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 190	<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 191	<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 192	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 194	<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 195	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 196	<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 197	<i>Cryptococcus flavus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 198	<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 199	<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 200	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 201	<i>Cryptococcus flavus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 241	<i>Trichosporon insectorum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 352	<i>Coniochaeta canina</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	W
TO 354	<i>Coniochaeta canina</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	W
TO 355	<i>Coniochaeta canina</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	W
TO 356	<i>Coniochaeta canina</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	W
TO 369	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material Descartado – Ambiente Perturbado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 372	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 373	<i>Coniochaeta canina</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	W
TO 374	<i>Coniochaeta canina</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	W
TO 375	<i>Coniochaeta canina</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	W
TO 376	<i>Coniochaeta canina</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	W
TO 377	<i>Coniochaeta canina</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	W
TO 378	<i>Rhodospodium toruloides</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
TO 380	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 381	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 553	<i>Candida melibiosica</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 554	<i>Candida melibiosica</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 556	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 557	<i>Candida melibiosica</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 559	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 560	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 561	<i>Cryptococcus flavescens</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 563	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 564	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 567	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 568	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 569	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 570	<i>Cryptococcus flavescens</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 573	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 575	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material Descartado – Ambiente Perturbado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 579	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 580	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 594	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 601	<i>Trichosporon asahii</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 602	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 603	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 604	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 605	<i>Trichosporon asahii</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 606	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 607	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 612	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 613	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 614	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 616	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 618	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
TO 623	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	W
TO 626	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 629	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 630	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
TO 633	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 637	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 640	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 641	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 643	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 649	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 650	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material Descartado – Ambiente Perturbado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 651	<i>Rhodotorula</i> sp.	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 655	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 659	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 660	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 663	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 815	<i>Candida maltosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
TO 816	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 817	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 818	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 819	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 820	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 821	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 822	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 823	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 824	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 825	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 826	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 827	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 828	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 829	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 830	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 884	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 885	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 886	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
TO 887	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 888	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material Descartado – Ambiente Perturbado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 889	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
TO 890	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 891	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 892	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 893	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 894	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 895	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 899	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 900	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 901	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 902	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
TO 903	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 904	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 905	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 906	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 907	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 908	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 909	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
TO 910	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 911	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 912	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 913	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 914	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 915	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 916	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 920	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material Descartado – Ambiente Perturbado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 921	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 922	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 923	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 924	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 925	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 926	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 927	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 928	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 929	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 930	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 932	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
TO 933	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 934	<i>Rhodotorula</i> sp.	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 935	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 936	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 937	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 938	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 939	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 941	<i>Rhodotorula</i> sp.	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
TO 942	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 943	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 944	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 945	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 946	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1003	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1004	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material Descartado – Ambiente Perturbado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 1007	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1011	<i>Sporisorium elionuri</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1012	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1013	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1014	<i>Trichosporon asahii</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1030	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
TO 1031	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1032	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
TO 1033	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1034	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
TO 1035	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1036	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 1037	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
TO 1038	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1039	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
TO 1040	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
TO 1041	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
TO 1042	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
TO 1043	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
TO 1044	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
TO 1045	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
TO 1046	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
TO 1047	<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	W	+
TO 1048	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1049	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 1050	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material Descartado – Ambiente Perturbado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 1051	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 1052	<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
TO 1053	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1054	<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1056	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1057	<i>Pseudozyma jejuensis</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	W	+
TO 1058	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1059	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 1063	<i>Pseudozyma shanxiensis</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1066	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1068	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
TO 1069	<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1070	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1071	<i>Cryptococcus</i> sp.	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	W
TO 1084	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1085	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1086	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1089	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1090	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1091	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1092	<i>Trichosporon asahii</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1093	<i>Trichosporon asahii</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1094	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1095	<i>Trichosporon asahii</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1096	<i>Trichosporon asahii</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
TO 1097	<i>Trichosporon asahii</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+

APÊNDICE B - Continuação

Estirpes Material Descartado – Ambiente Perturbado		Triagens enzimáticas								Assimilação				
Estirpe	Identificação	CMC	AM	XIL	PG	PL	LIP	LIG (RBB-R)	LIG (LAC)	GLIC	CEL	AG	MALT	XILO
TO 1098	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1099	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1100	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1101	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1102	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1103	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1104	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
TO 1105	<i>Trichosporon asahii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Total		148	27	152	103	55	44	6	2	231	205	171	188	229

CMC: CMCase, AM: amilase, PG: poligalacturonase, PL: pectato-liase, LIP: lipase, XIL: xilanase, Lig RBB-R: ligninase, Lig (Lac): ligninase (lacase); GLIC: glicose; CEL: celobiose; AG: ácido galacturônico; MALT: maltose; XILO: xilose. (+) indica que atividade enzimática e ou assimilação das fontes de carbono foi positiva; (-) indica que a atividade enzimática e ou assimilação das fontes de carbono foi negativa; letra 'w' indica uma assimilação fraca das fontes de carbono.

APÊNDICE C – Ninhos de *Acromyrmex balzani* de áreas de cerrado em Palmas TO: (1) Área preservada; (2) Área perturbada; (3) Estrutura do ninho de *A. balzani*; (4) Características da abertura do ninho; (5) Resíduos (lixo) descartado do interior do ninho; (6) Coleta do material de descarte; (7 e 8) Escavação do ninho e exposição das câmaras com jardim de fungo; (9) Câmara com jardim de fungo; (10) Coleta do jardim de fungo.



Ambiente preservado



Ambiente perturbado



Característica dos ninhos de *A. balzani*



Torre de fragmentos de palha na abertura do ninho

Abertura do ninho

Material descartado (lixo)



Material de descarte de ninho de *A. balzani*



Coleta do material de descarte



Escavação do ninho



Jardim de fungo de ninho de *A. balzani*



Coleta do jardim de fungo