UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ADEMIR DURRER BIGATON

Estruturas das comunidades e caracterizações metabólicas de leveduras em solos de Terra Preta Antropogênica

Piracicaba
2010

ADEMIR DURRER BIGATON

Estruturas das comunidades e caracterizações metabólicas de leveduras em solos de Terra Preta Antropogênica

Dissertação apresentada Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Piracicaba
2010

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Bigaton, Ademir Durrer
Estruturas das comunidades e caracterizações metabólicas de leveduras em solos de Terra Preta Antropogênica / Ademir Durrer Bigaton; orientador João Lúcio de Azevedo. - - Piracicaba, 2010.
102 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Biologia molecular 2. DNA 3. Ecologia de fungos 4. Microbiologia do solo I. Título

CDU 631.466

A memória de minha Avó Maria

mesmo distante esta é mais uma promessa efetuada e uma vitória que conquistamos

As duas mulheres da minha vida, que eu amo...

Minha Mãe

por me educar, auxiliar nos estudos e, acima de tudo, ensinar os verdadeiros valores de um homem.

A Lillian

por ser a verdadeira companheira vivendo ao meu lado todos os momentos alegres e tristes.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pela orientação e auxilio no trabalho.

A profa. Dra. Siu Mui Tsai pelos conselhos e ajuda para a execução deste trabalho, sempre buscando o melhor da minha formação científica.

A Lillian Liva Foltran, pela ajuda e empenho na execução deste trabalho, e por me ensinar a simplicidade do AMOR!

Ao de curso de pós-graduação do CENA e a CAPES pelo apoio e bolsa concedida.

A todos os funcionários do CENA sempre prestativos quando solicitados.

Aos técnicos do laboratório de Biologia Celular e Molecular, José Elias Gomes, Fábio Rodrigo Sanches Duarte, Wagner Picinini e Francisco Montrazi, pela ajuda, ensinamentos e amizade nestes anos de convivência.

Aos amigos de laboratório: Acácio, Amanda, Aline, Bianca (Manaus), Bianca (“Beatriz”), Caio, Daniel, Enéas, Ézio, Fabi, Fernanda, Lina, Ludmila, Lucas, Marcon, Mariana, Majú, Marquinhos, Monita, Natália, Othon, Roberto, Rodrigo e todos os outros que ajudaram neste trabalho.

A minha e Mãe e minha família por simplesmente me amarem!

Por último, mas sempre em primeiro, a DEUS e todos os bons espíritos que sempre me fortaleceram nos momentos difíceis.

“Bem aventurado o homem que acha a sabedoria e adquire conhecimento”

(Provérbios 3:13)

“Com o poder da sua mente,

determinação, instinto e experiência,

você pode voar muito alto”

Ayrton Senna

RESUMO

Estruturas das comunidades e caracterizações metabólicas de leveduras em solos de Terra Preta Antropogênica

A Terra Preta Antropogênica (TPA) é considerada um dos solos mais férteis do mundo, constituída de pequenas faixas e distribuídos aleatoriamente pela região Amazônica. Sua denominação é decorrente da presença de grupos pré-históricos que viveram nestes sítios arqueológicos ao longo dos rios da Amazônia, principalmente Central e Oriental. A grande quantidade de material deixado por esses grupos indígenas como fragmentos cerâmicos, carvão, artefatos líticos, restos de animais e vegetais promoveu uma elevada concentração de matéria orgânica, fósforo, cálcio, magnésio, manganês e zinco. Contudo, pouco se conhece sobre a diversidade e funcionalidade microbiana na TPA sendo; tal conhecimento fundamental para auxiliar na formação e manutenção destes solos, levando ao desenvolvimento de práticas sustentáveis de agricultura que conservem a biodiversidade. Dentre os microrganismos, as leveduras apresentam um papel de destaque na indústria e mesmo no ambiente. Este grupo esta correlacionado a processos fermentativos de diversos tipos de açúcares, produção de vitaminas, enzimas, lipídeos e polissacarídeos. Além disso, sua presença em solos é diversificada e variável quanto à abundância e espécies presentes. O objetivo deste trabalho foi avaliar as estruturas das comunidades de leveduras presentes nos solos de TPA, compará-las com as suas adjacências e correlacionar a possíveis diferenças apresentadas com os atributos químicos do solo. Além disso, testes metabólicos para o consumo de carboidratos e produção de micotoxinas foram efetuados buscando uma melhor compreensão da funcionalidade das leveduras nos ambientes estudados. No isolamento foram identificadas 13 espécies na TPA, 9 nos solos adjacentes e seis comuns ao dois ambientes. As leveduras dos solos adjacentes demonstraram-se capazes de consumir um maior número de carboidratos distintos, especialmente: amido, celobiose e L-arabinose. Na análise de DGGE as comunidades de TPAs apresentaram-se distintas e com maiores índices de diversidade e riqueza, quando comparadas aos seus solos adjacentes. Atributos químicos do solo como: P, matéria orgânica (MO), soma de bases (SB), Al, K, Fe e Mg foram determinantes para a diferenciar as comunidades de leveduras dos solos adjacentes e da Terra Preta. Os resultados permitiram concluir que a comunidade de leveduras presentes nos diferentes sítios de TPA e adjacência são diferentes na sua estrutura e diversidade de espécies, estando isto correlacionado as distintas propriedades químicas dos solos estudados.

Palavras-chave: Leveduras; Terra Preta Antropogênica; DGGE, Amazônia

ABSTRACT

The communities structures and metabolic characterizations of yeasts in Anthropogenic Dark Earth soils

Anthropogenic Dark Earth (ADE) is considered one of the most fertile soils of the world, consisting in small areas and randomly distributed throughout the Amazonian region. Its name derives from the presence of prehistoric groups who lived in these archaeological sites along the Amazonian rivers, mainly Central and Eastern. The large amount of material left by these indigenous groups as pottery fragments, charcoal, lithic artifacts, the remains of animals and vegetables promoted a high concentration of organic matter, phosphorus, calcium, magnesium, manganese and zinc. However, little is known about the microbial diversity and functionality in ADE being this, fundamental to the knowledge of the formation and maintenance of these soils, leading to the development of sustainable farming practices that conserve the biodiversity. Among the microorganisms, the yeasts have interesting functionalities in the industry and even the environment. This group is correlated with fermentation processes of the several kinds of sugars, production of vitamins, enzymes, lipids and polysaccharides. Furthermore, its presence in soil is diverse and variable in abundance and species presence. The aim of this study was to evaluate the structures of the yeast communities present in the soil of ADE, to compare them with their surroundings and to correlate possible differences presented with the soil chemical properties. In addition, tests for metabolic consumption of carbohydrates and mycotoxin production were performed, seeking a better understanding of the yeast functionality in this study. In isolation were identified 13 species in the ADE , 9 in adjacent soil and six were common to both environments. Yeasts presents in adjacent soils shown are able to consume more distinct carbohydrates, especially: starch, cellobiose and L-arabinose. In DGGE analysis, the communities of ADE presented distinct and with higher levels of diversity and richness when compared to their adjacent soils. Soil chemical attributes as: P, organic matter (OM), total bases (SB), Al, K, Fe and Mg were determinates to differentiate yeast communities of adjacent soils and ADE. The results showed that yeast community in the different sites of ADE and adjacency are different in structure and diversity of the species, being this correlated to the different chemical properties found in these soils.

Keywords Yeasts, Anthropogenic Dark Earth, DGGE, Amazon

LISTA DE ABREVIATURAS

% Porcentagem

°C Grau Celsius

µg Micrograma

µL Microlitro

A absorbância

ADJ Solo Adjacente

cm Centímetro

DNA Ácido Desoxirribonucléico

dNTPs Deoxiribonucleosideo Trifosfato

EDTA Ácido Etileno Diamono Tetrecético

g Grama

L Litros

m Metro

M Molar

mg Miligrama

mL Mililitro

mm Milímetro

mM Milimolar

MO Matéria Orgânica

nm Nanômetro

pb Pares de Base

PCR "Polymerase Chain Reaction" (Reação de polimerase em cadeia)

pH Potencial Hidrogeniônico

pmol PicoMoles

RNA Ácido Ribonucléico

RNAse Ribonuclease

rpm Rotações Por Minuto

rRNA Ácido Ribonucléico Ribossomal

SB Soma de Bases

SDS Sodium Dodecil Sulfato

Taq Thermus aquaticus

TE Tris-EDTA

TPA Terra Preta Antropogênica

TPI Terra Preta de Índio

Tris Tris-(hidroximetil)-aminometano

U Unidade

UFC Unidade Formadora de Colônias

UTO Unidades Taxonomicas Operacionais
UV Radiação Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 DESENVOLVIMENTO 19

2.1 Revisão de Literatura 19

2.1.1 Terra Preta Antropogênica (TPA) 19

2.1.2 Leveduras no ambiente e solo 21

2.1.3 Taxonomia molecular de leveduras 24

2.1.4 Comunidade de leveduras e técnicas moleculares independentes de cultivo 25

2.2 Materiais e Métodos 27

2.2.1 Área de estudo e amostragem 28

2.2.2 Análises dos Atributos químicos 29

2.2.3 Isolamento de leveduras do solo 29

2.2.3.1 Metodologia de isolamento e purificação 29

2.2.3.2 Testes Metabólicos 30

2.2.3.3 Identificação Molecular do isolados de levedura 31

2.2.3.4 Extração de DNA de leveduras 31

2.2.3.5 Amplificação do rDNA dos isolados 32

2.2.3.6 Purificação do produto de PCR 33

2.2.3.7 Reação de sequenciamento e precipitação 33

2.2.3.8 Análises das sequências e estatísticas 34

2.2.4 DGGE de leveduras e fungos 35

2.2.4.1 Extração do DNA total de solo 35

2.2.4.2 Reação de amplificação 36

2.2.4.3 Preparo do gel e condições de corrida 36

2.2.4.4 Recorte, re-amplificação das bandas de DGGE 37

2.2.4.5 Purificação do produto de PCR 37

2.2.4.6 Clonagem dos produtos de PCR 38

2.2.4.7 Transformação das células competentes 38

2.2.4.8 Reação de seqüenciamento dos clones 39

2.2.4.9 Preparo de células competentes 40

2.2.4.10 Análises estatísticas 40

2.3 Resultados e Discussão 42

2.3.1 Análise química dos solos 42

2.3.2 Isolamento 45

2.3.2.1 Isolamento e testes metabólicos 45

2.3.2.2 Identificação molecular dos isolados 49

2.3.2.3 Estrutura da comunidade de leveduras cultiváveis 63

2.3.3 Estrutura da comunidade de leveduras e fungos filamentosos não cultiváveis 68

3 CONCLUSÕES 83

REFERÊNCIAS 85

APÊNDICE 97

1 INTRODUÇÃO

A Amazônia apresenta uma das maiores biodiversidades do mundo. Entretanto, esta é, ainda, pouco conhecida e utilizada. A região esta fragmentada em três tipos de ecossistemas: Mata de Igapó, Várzea e Terra Firme. Seu solo apresenta baixa fertilidade, principalmente para a agricultura intensiva, devido à acidez, baixa capacidade de troca catiônica e concentração de matéria orgânica (NOVOTNY et al., 2009). Contudo, na terra firme, encontram-se solos de sítios arqueológicos que foram modificados pela ação humana pré-histórica e são extremamente férteis, sendo chamados de Terra Preta Antropogênica (TPA) ou Terra Preta de Índio (TPI).

Estes solos foram enriquecidos em nutrientes, pelo manejo de restos orgânicos e de fogo pelas populações indígenas pré-colombianas. Como características gerais apresentam coloração escura, altos teores de substâncias húmicas, fragmentos de cerâmica e artefatos indígenas incorporados a matriz dos horizontes superficiais do solo, o que originou a terminologia Terra Preta Antropogênica (KERN; KAMPF, 1988). Dentre suas características químicas a TPA apresenta altos teores de nutrientes como: cálcio, magnésio, fósforo, potássio, manganês e zinco (KERN; KAMPF, 1989; SOMBROEK, 1966). Além disso, seu pH esta entre 5 e 7, apresentam elevados teores de matéria orgânica e intensa atividade biológica, provenientes provavelmente, de restos de ossos humanos e de animais (GLASER et al., 2001; LIMA et al., 2002). Esses fatores assim como a sua sustentabilidade na fertilidade permitem à fragmentação e decomposição da matéria orgânica disponibilizando nutrientes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002) e permitindo a existência de uma ampla diversidade microbiológica ainda desconhecida.

Dentre os microrganismos, as leveduras são fungos unicelulares, que se multiplicam assexuadamente por brotamento ou cissiparidade, e também sexuadamente, embora sem a formação de um corpo de frutificação. Elas estão presentes em distintos ambientes, mesmo em condições extremas, sendo comuns: em solos, na superfície de órgãos vegetais, principalmente flores e frutos, no trato intestinal de animais, em líquidos açucarados e em vários outros locais. Por serem microrganismos quimiotróficos estritos, necessitam de compostos orgânicos com fontes de carbono, como carboidratos simples e complexos, polióis, ácidos graxos e orgânicos de cadeia curta, alcoóis alifáticos e outros compostos poliméricos e heterocíclicos (FERNANDES, 2008).

O solo é um dos principais reservatórios naturais de leveduras selvagens (CARMO-SOUSA, 1969; PHAFF; STARMER, 1987), suas funcionalidades podem estar correlacionadas ao controle biológico de patógenos (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006), ciclagem de carboidratos complexos, relacionados à degradação de compostos derivados da decomposição vegetal (SLÁVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ, 2000); como biorremediadoras (PAJOT; FIGUEROA; FARIÑA, 2007) e como agentes sinérgicos sobre associações micorrízicas (SCHWAN; CAMPOS; DIAS, 2008). Contudo, a sobrevivência e o crescimento de leveduras nos solos não dependem apenas das suas habilidades em aproveitarem recursos e sim, de possíveis relações com outros microrganismos (BOTHA, 2006). O conhecimento sobre a sua ecologia é mínima, sendo estimando que apenas 1% das leveduras existentes na natureza já tenha sido descritas (FELL et al., 2000).

Portanto, o presente trabalho busca estudar a hipótese da existência de uma diferença estrutural na comunidade de leveduras dentre os diferentes tipos de TPA, quando contrastados com seus respectivos solos adjacentes. Para tal, a metodologia de isolamento; testes metabólicos, como os de antagonismo e consumo de carboidratos; análises químicas do solo e a proposta de uma metodologia de DGGE foram efetuadas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão de Literatura

2.1.1 Terra Preta Antropogênica (TPA)

A floresta Amazônica apresenta uma das maiores biodiversidades do mundo, apresentando uma alta riqueza em recursos naturais, necessitando de um melhor conhecimento e utilização desta região. Ela esta fragmentada em três tipos de ecossistemas de acordo com o relevo: regiões permanentemente inundadas, conhecidas como Mata de Igapó, regiões sazonalmente inundadas, conhecidas como faixas de Várzea e as regiões nunca inundadas, conhecidas como Terra Firme, na qual, a vegetação pode atingir até 60 metros de altura. Estes solos de terra firme apresentam baixa fertilidade, principalmente para a agricultura intensiva, devido à acidez, baixa capacidade de troca catiônica (CTC) e concentração de matéria orgânica (NOVOTNY et al., 2009). Contudo, existem solos extremamente férteis e produtivos, denominados por Kämpf et al. (2003) de "Arqueo-antrossol" (traduzido do inglês: *Archeo-anthrosol*), ambos com elevadas concentrações de cálcio e fósforo. Estes são divididos em Terra Preta Antropogênica (TPA) ou Terra Preta de Índio (TPA) e Terra Mulata e são diferenciados devido a TPA apresentar resíduos de artefatos cerâmicos ao contrário da Terra Mulata onde a presença destes é inexistente (SOMBROEK, 1966).

Nesses solos, populações ribeirinhas os utilizam para plantações de: banana, mandioca, milho e mamão há centenas de anos, sendo, sua fertilidade permanecida mesmo sem a adição de insumos ou fertilizantes (GLASER et al., 2001). A Terra Preta Antropogênica (TPA) ocorre em todas as eco-regiões Amazônicas, estendendo-se da Cordilheira dos Andes até a Ilha de Marajó, podendo ser encontrada sobre os mais diversos tipos de solos. Normalmente, ela esta localizada em regiões de terra firme, em locais bem drenados, próxima as margens de rios e em posições topográficas que permitem uma visão geral da paisagem (KERN et al., 2003). O tamanho dos sítios de TPA são consideradas pequenos, estando seu tamanho entre 2 a 3 hectares (SMITH, 1980). Contudo, estas podem ser encontradas, ocasionalmente, em áreas maiores, como no caso da Estação Científica Ferreira Penna, Floresta Nacional de Caxiuanã (PA), onde há grandes extensões de TPA chegando a mais de 100 ha.

Para explicar a formação e origem das TPAs várias hipóteses foram elaboradas. Uma delas é que são originadas de eventos geológicos, como cinzas vulcânicas, decomposição de rochas vulcânicas e outras, a partir de sedimentos depositados em fundos de lagos extintos (FALESI, 1972). Atualmente, a hipótese mais aceita afirma que as Terras Pretas teriam sido procedentes da ação antrópica, a partir do seu enriquecimento por tribos indígenas pré-Colombianas (WOODS; MCCANN, 2001). Porém, ainda existem dúvidas a respeito desta formação ter ocorrido de forma intencional ou não por estas populações (NEVES et. al., 2003). Esta hipótese de formação é corroborada devido a fatores como: a semelhança na textura entre a TPA e solos adjacentes e inferiores a ela, características químicas associadas à habitação humana, e a presença de artefatos de cerâmica e líticos (WOODS; MCCANN, 2001).

Os solos de TPA possuem coloração escura devido às altas concentrações de matéria orgânica e elementos como Ca, C, Mg, Mn, P e Zn (KERN et al., 2003). Estas características químicas marcantes do solo de TPA podem estar associadas à ocupação humana, a qual depositou sobre o solo restos animais (carapaças de tartarugas, conchas, excrementos, urina e peixes) e vegetais (restos de folhas de palmeiras, sementes e cipós), alem de uma grande quantidade de cinzas e carvão vegetal (MADARI et. al., 2009; NEVES et. al., 2003).

O principal benefício da Terra Preta, quando comparada aos solos adjacentes, é a alta fertilidade que permiti a realização de uma agricultura de subsistência por logos períodos, não existindo a necessidade de adição de insumos ou, quando efetuados, ocorre em pequenas proporções. Elevados valores de: matéria orgânica (MO), capacidade de troca catiônica (CTC) e pH, são propriedades peculiares destes solos (LEHMANN et al., 2003), sendo constante presença de carvão pirogênico um importante fator que contribui para a CTC (LIANG et. al., 2006; NOVOTNY et al., 2009) e a estabilidade da matéria orgânica (GLASER et al., 2003) . Além disso, foi contato a presença de microrganismos vivos nas fendas destes carvões, os quais podem servir como habitat, sendo necessários estudos adicionais para uma maior compreensão desta relação (TSAI et al., 2009).

Os resíduos acumulados pela ação humana na formação dos ambientes de TPAs, os quais apresentam uma alta fertilidade, devido a suas características químicas diferenciadas dos demais solos amazônicos, podem apresentar uma comunidade microbiana característica e diversa, estando esta, associada a processos microbiológicos fundamentais para a manutenção da fertilidade assim como a interação de forma benéfica com plantas. Recentemente, Kim et al. (2007) estudaram e comunidade bacteriana presente em solos de florestas e TPA da floresta nacional de Jamari, localizada em Rondônia e demonstraram, a partir de análises com

bibliotecas de 1500 clones da região 16S do gene rRNA, uma maior diversidade bacteriana nos solos de TPA, com a presença de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) características deste ambiente. Trabalhando com bactérias cultiváveis presentes em três TPAs (Hatahara, Lago Grande e Açutuba), O'Neill et al. (2009), também demonstraram uma distinta composição na comunidade de bacteriana presente entre os solos de TPA e adjacências, sendo novamente a diversidade superior nos solos de TPA. Além disso, Cannavan (2007) estudando a comunidade bacteriana dos sítios Mina I e Balbina de TPA e solos adjacentes, baseada na metodologia de sequenciamento da região de 16S do gene de rRNA, demonstrou uma composição distinta entre a TPA e seu respectivo solo adjacente, com índices de riqueza na Terra Preta superiores no sítio Balbina e inferiores no sítio Mina I.

Portanto, a alta fertilidade da TPA pode ser a chave do desenvolvimento da agricultura regional nos trópicos. Atualmente, existe um grande interesse científico na elucidação da sua gênese, principalmente, pela possibilidade de obterem-se áreas semelhantes em outros locais. O conhecimento da funcionalidade e diversidade microbiana no solo de TPA pode ser uma importante contribuição para a formação e manutenção deste solo, levando ao desenvolvimento de práticas sustentáveis de agricultura que conservem a biodiversidade, beneficiando especialmente os pequenos agricultores e melhorando as condições de vida do homem amazônico.

2.1.2 Leveduras no ambiente e solo

Dentre os microrganismos, as leveduras são fungos unicelulares, pertencentes aos filos dos Ascomicetos ou Basidiomicetos, podendo reproduzirem-se sexuadamente, sem formação de um corpo de frutificação; ou assexuadamente, por brotamento. As leveduras são quimiotróficos estritos necessitando de compostos orgânicos com fontes de carbono como: carboidratos simples e complexos, polióis, ácidos graxos e orgânicos de cadeia curta, alcoóis alifáticos e outros compostos poliméricos e heterocíclicos (FERNANDES, 2008).

Estima-se que apenas 1% das espécies existentes de leveduras foram classificadas e identificadas (FELL et al., 2000). O número de espécies distintas é cada vez maior, sendo: 164 em 1952, 349 em 1970, 500 em 1974 e 700 em 1998 (LODDER, 1970; KURTZMAN; FELL, 1998). Com o advento de metodologias moleculares rápidas e precisas, como o sequenciamento de regiões consideradas marcadores filogenéticos do genoma, este número vem crescendo

vertiginosamente, permitindo a identificação de novas leveduras e estimando-se um número de 1000 espécies para 2016 (LACHANCE, 2006).

Aplicações biotecnológicas das leveduras são amplamente estudadas, especialmente, no processo fermentativo para produção de pães e bebidas provenientes de diversas origens vegetais, álcool combustível e outros produtos oriundos deste processo. Outras funcionalidades como a dos carotenóides, importantes constituintes na indústria alimentícia, devido as suas propriedades na produção de: corantes, compostos anticarcinogênicos, antioxidantes e pró-vitamina A, foram relatados pelos gêneros: *Rhodosporidum, Rhodotorula, Sporidiobolu* e *Sporobolomyces* (BUZZINI et al., 2007; MALDONADE, 2008). Leveduras do gênero *Candida*, apresentaram diversas espécies, algumas comercialmente viáveis, capazes de produzirem lípases e degradarem lipídios (WACHÉ et al., 2006). Em processos destinados a biorremediação, leveduras dos gêneros *Candida*, *Debaryomyces* e *Rhodotorula*, foram isoladas de ambientes contaminados com bifenil e demonstraram a funcionalidade em degradá-los (LANGE et al., 1998; ROMERO et al., 2006). O fenol, outro composto tóxico proveniente de resíduos industriais, também pode ser degradado pela espécie *Candida tropicalis*, isolada de solos Amazônicos (BASTOS et al., 2000). Na agricultura, atividades destinadas ao controle biológico de patógenos, especialmente de frutos na pós-colheita, são amplamente estudadas sendo, cada vez maior o número de espécies relacionadas (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; JANISIEWICZ, 2006; JANISIEWICZ; KURTZMAN; BUYER, 2010).

Muitas leveduras foram isoladas de processos de bebidas e alimentos (AIDOO; NOUT; SARKAR, 2006; BASÍLIO et. al., 2008; DUARTE et al., 2009; HIERRO et. al., 2006; SILVA-FILHO et al., 2005), sendo inclusive encontradas em carnes embutidas (NIELSEN et al., 2008). Para maiores informações, Fleet (2007) aborda em sua revisão, trabalhos relacionados à ecologia e biologia das leveduras nos processos industriais alimentícios e de bebidas. Contudo, a localização das leveduras é extremamente diversificada, sendo encontrada em associações com animais (SATOH; MAKIMURA, 2008), insetos (RODRIGUES et. al., 2009; SUH; NGUYEN; BLACKWELL, 2005) e até em ambientes extremos (BUTINAR et. al., 2005; GADANHO; LIBKIND; SAMPAIO, 2006 VADKERTIOVÁ; SLAVIKOVÁ, 2006). Esta vasta ocorrência em diversos ambientes naturais é devido à sua seletividade nutricional, característica de cada espécie, que permite amplas especializações ecológicas e nichos distintos (SCHWAN; CAMPOS; DIAS, 2008).

No solo, inúmeras espécies são habitantes típicas, exercendo uma contribuição significativa para a biodiversidade, com funcionalidades específicas neste habitat, sendo sua capacidade de sobrevivência variável, podendo existir de nenhuma a milhares de leveduras por grama de solo (PHAFF; STARMER, 1987). Dentre os principais atributos para a manutenção da comunidade de leveduras no solo, estão: a) sua capacidade de multiplicação; b) suprimento regular de frutas, restos vegetais e animais em decomposição, c) interações com plantas e insetos e d) balanço entre as taxas de crescimento e morte das células (SCHWAN; CAMPOS; DIAS, 2008). Alguns gêneros como: *Kluyveromyces, Lipomyces, Schwanniomyces* e *Schizoblastosporium, Cryptococcus, Rhodotorula, Candida, Trichosporon* e *Sporobolomyces* são as leveduras mais encontradas no ambiente de solo (MAKSIMOVA; CHERNOV, 2004; SCHWAN; CAMPOS; DIAS, 2008).

A presença de leveduras em solos é extremamente diversificada estando: em florestas (MAKSIMOVA; CHERNOV, 2004; MOK et al., 1984; JENSEN, 1963 SLÁVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ, 2000; VITAL et al., 2002; WUCZKOWSHI et al., 2003), campos agrícolas (SLAVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ, 2003b), praias (VOGEL et al., 2007; LOUREIRO et al., 2005) e até mesmo, em solos da Antártica (BAUBLIS; WHARTON; VOLZ, 1991; VISHNIAC, 1996).

Em solos florestais Slaviková e Vadkertiová (2000) isolaram 181 linhagens de leveduras de 180 amostras de solos coletadas em uma floresta de coníferas e duas florestas decíduas. Dentre as espécies mais isoladas foram encontradas: *Cryptococcus laurentii, Rhodotorula aurantiaca* e *Trichosporon cutaneum* representando 89% do total de contagens de leveduras encontradas nas amostras de solo. Além disso, os resultados indicaram que algumas das espécies de leveduras isoladas possuíam habilidade para degradação de alguns compostos fenólicos e clorofenólicos e a maioria foi capaz de consumir uma ampla variedade de carboidratos, especialmente, os relacionados à degradação de derivados da hemicelulose, como celobiose, xilose e L-arabinose um açúcares com cinco carbonos.

Vital e colaboradores (2002) estudaram a ocorrência de leveduras com atividades micocinogênicas no solo da Amazônia. Um total de 240 linhagens de leveduras foram isoladas, de amostras de solo da Estação Ecológica de Maracá, estado de Roraima, Amazônia, Brasil e identificadas por análises moleculares de sequenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA . Dentre as espécies isoladas as mais comuns foram *Candida etchellsii, Candida famata, Candida robusta, Candida rugosa, Candida valida, Cryptococcus albidus, Cryptococcus laurentii, Debaryomyces hansenii, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula minuta* e

Rhodotorula mucilaginosa. De todos os isolados apenas seis linhagens, pertencentes às espécies *Williopsis saturnus* e *Issatchenkia* sp., foram capazes de produzir micotoxinas, O estudo demonstrou que leveduras micocinogênicas possuem uma ampla distribuição geográfica em diversos micro habitats, embora componham porções de comunidades de leveduras relativamente pequenas.

Slaviková e Vadkertiová (2003b) isolaram 111 leveduras (8 gêneros e 11 espécies) de solos agrícolas cultivados com batata, beterraba, milho e grãos, do sudoeste da Eslováquia. As leveduras mais frequentemente encontradas foram: *Cryptococcus laurentii, Cândida maltosa, Metschnikowia pulcherrima* e *Sporobolomyces salmonicolor*, representando 78 de 86% das contagens totais de leveduras nas amostras do solo. Este estudo revelou que estas espécies dominantes foram encontradas nas diferentes amostras dos solos estudados, com exceção da espécie *S. salmonicolor* para o campo de beterraba, mas a abundância das mesmas foi distinta. Em comparação com isolamento feito em solos de floresta (SLAVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ, 2000), a população de leveduras encontradas no solo com culturas agrícolas foi reduzida significativamente, sendo a aplicação de insumos agrícolas e o cultivo fatores preponderantes para esta diferença apresentada. Estudos com os efeitos de pesticidas e herbicidas, sobre diversas leveduras, demonstraram-se variáveis para cada espécie e dependentes da concentração adotada, sendo a sobrevivência afetada, para espécies como: *Candida maltosa, Cryptococcus laurentii, Pseudozyma aphidis, Trichosporon pullulans e Williopsis saturnus var saturnus* (SLAVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ, 2003a).

2.1.3 Taxonomia molecular de leveduras

No início, estudos com isolados de leveduras provenientes de habitats naturais, tinham suas identificações taxonômicas feitas por atributos morfológicos e fisiológicos. Contudo, essas técnicas são demoradas e apresentam dificuldades que podem conduzir a resultados incompletos ou errôneos (FELL et. al., 2000; VALENTE et al., 1999). Com o advento das técnicas moleculares, surgiram metodologias objetivando elucidar estas dificuldades, permitindo identificações constantes e precisas. Atualmente, a técnica mais utilizada é o sequenciamento das regiões D1/D2, do fragmento 26S do gene de rRNA. Este procedimento fornece resultados de forma rápida e simplificada sendo, tão eficiente quanto à metodologia de re-associação de DNA, muito utilizada nos últimos 35-40 anos (KURTZMAN, 2006).

Um importante momento para a taxonomia de leveduras foram os trabalhos elaborados por Kurtzman e Robnett (1998) e Fell et. al. (2000), os quais sequenciaram todas as espécies conhecidas de leveduras pertencentes aos filos dos Ascomicetos e Basidiomicetos, respectivamente, originando um robusto banco de dados público que permitiu posteriores comparações filogenéticas. Hoje, trabalhos que estudem a comunidade de leveduras no ambiente, apresentam como identificação das espécies, o uso e sequenciamento parcial do gene 26S de rRNA. Além disso, esta recente proposta taxonômica, baseada em metodologias moleculares, possibilitou a descoberta de novas espécies (CRESTANI et. al., 2009; HONG; LEE; BAE, 2002), seguidas de posteriores alterações e proposta de novos de gêneros (KURTZMAN; ROBNETT; BASEHOAR-POWERS, 2008). Recentemente Kurtzman e Suzuki (2010), analisaram filogeneticamente leveduras produtoras de coenzima Q-9 a partir do seqüenciamento das regiões D1/D2 da subunidade maior e a subunidade menor do rRNA, propondo diversas alterações de gêneros, uma nova família e concluindo que análises moleculares são melhores para estudos filogenéticos do que as fenotípicas.

Portanto, conhecer as características fenotípicas das espécies isoladas é fundamental e auxilia a correlacioná-las com suas funcionalidades no ambiente, mas o emprego de técnicas moleculares apresenta respostas mais adequadas para o estudo filogenético de leveduras.

2.1.4 Comunidade de leveduras e técnicas moleculares independentes de cultivo

Recentemente, com o advento de metodologias independentes de cultivo para o estudo da comunidade microbiana, o conhecimento sobre a diversidade em distintos ambientes tornou-se algo cada vez mais representativo da realidade. Técnicas de análises da estrutura da comunidade como DGGE (MUYZER; DEWAAL; UITTERLINDEN, 2003), T-RFLP (MARSH, 1999) e ARISA (FISCHER; TRIPLETT, 1999; RANJARD et al., 2001); e análises do seqüenciamento de amostras de DNA ambientais a partir de bibliotecas genômicas e, mais recentemente, de metodologias como o pirosequenciamento (ROESCH et al., 2007) permitiram comparar estruturas de comunidades em ambientes distintos, inferir funcionalidades e compreender os efeitos das ações do homem moderno.

Contudo, os trabalhos estão fundamentados, na sua maioria, em comparações com procariotos sendo, os estudos com leveduras ainda incipientes. Uma das maiores dificuldades em estudar as leveduras, a partir de técnicas independentes do cultivo, deve-se ao fato da dificuldade em amplificá-las em amostras ambientais. Isto ocorre, provavelmente, porque a comunidade de fungos filamentos é superior a de leveduras presentes nos solos e estes

apresentam menor abundância que outros microeucariotos (BOTHA, 2006; GADANHO; SAMPAIO, 2004), o que diminui a probabilidade de anelamento de leveduras com iniciadores específicos para fungos nas reações de polimerase em cadeia (PCR).

Inicialmente, os primeiros trabalhos com técnicas independentes do cultivo para leveduras, foram efetuados com a análise de DGGE (*Denaturing Gradiente Gel Eletrophoresis*), em estudos com fermentação de vinhos e leite, demonstrando que as metodologias dependentes de cultivo e independente são complementares e devem ser empregadas conjuntamente para obterem resultados mais conclusivos (COCOLIN et. al., 2000; 2002; PRAKITCHAIWATTANA; FLEET; HEARD, 2004). Estudando a comunidade de leveduras presentes na fermentação de cacau, Nielsen e colaboradores (2005), demonstraram que a eficiência da metodologia de DGGE pode amplificar os mesmos isolados presentes no isolamento de leveduras por cultivo, além de outras espécies anteriormente não detectadas. Contudo, Masoud et al. (2004), estudando a diversidade de leveduras presente na fermentação de café, demonstraram que a metodologia de isolamento foi capaz de detectar a espécie P*ichia anomala* a qual não esteve presente na análise de DGGE.

Em análises de amostras ambientais de água, Gadanho e Sampaio (2004), propuseram o uso da metodologia de TGGE (*Temperature Gradiente Gel Eletrophoresis*) a partir de uma amplificação inicial de fungos com os iniciadores *ITS1FD* e *LR6*, seguida de uma segunda amplificação com os primers *NL4*, com grampo *GC*, e *LS2F*, ambos universais de eucariotos, sendo seus resultados eficientes na amplificação da comunidade de leveduras. Nele os autores efetuaram a análise de TGGE a partir da extração de DNA total da água e dos microrganismos crescidos em meio líquido e sólido por 3, 6 e 9 dias, seguidos da re-amplificação e sequenciamento de algumas das bandas obtidas. Os resultados demonstraram um maior número de UTOs para as amostras que foram previamente enriquecidas. Contudo, as amostras sem enriquecimento indicaram a presença de uma espécie de levedura não cultivável, demonstrando que técnicas de análises com cultivo e independente deste, na estrutura de comunidades de leveduras a partir de amostras ambientais, podem apresentar resultados complementares.

2.2 Materiais e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, CENA/USP, Piracicaba-SP. Abaixo, na Figura 1, segue um fluxograma representativo das etapas de trabalho realizadas.

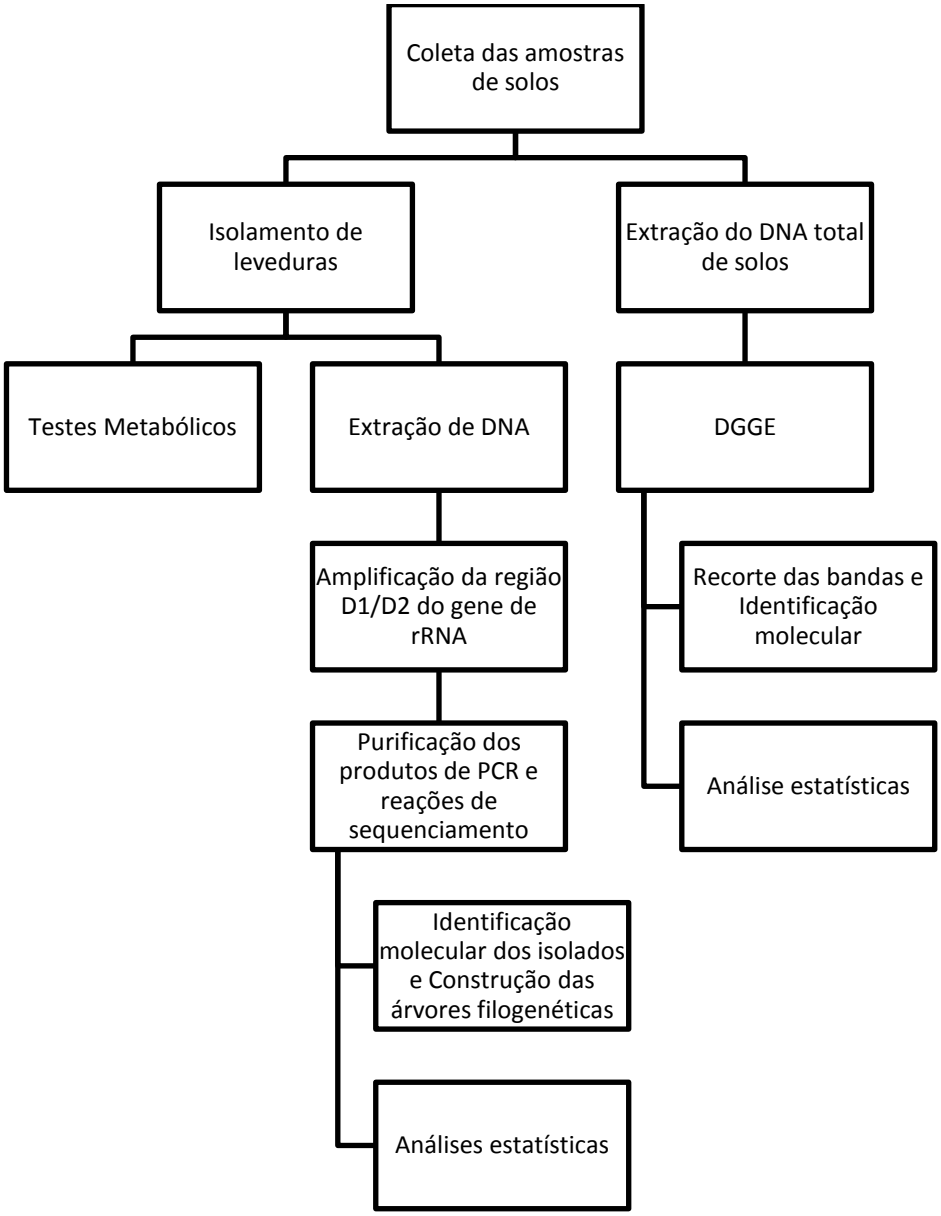


Figura 1 - Fluxograma das etapas do trabalho efetuadas no estudo

2.2.1 Área de estudo e amostragem

Foram estudados três sítios de TPA com seus respectivos solos adjacentes, totalizando 6 ambientes, localizados em 2 áreas de estudos distintas. A primeira área foi o sítio Hatahara no município de Iranduba (AM), o qual apresenta cultivos de banana e pastagem em seus solos de TPA e adjacência, respectivamente (Tabela 1). No segundo local de estudo, dois sítios foram alvos de estudo, nomeados de: Caldeirão Cultivado e Caldeirão Capoeira, ambos localizados no município de Iranduba (AM), pertencentes à EMBRAPA Ocidental e com suas coordenadas geográficas e características de cultivo e vegetação presentes na Tabela 1.

Tabela 1 – Localização e características da vegetação presentes em cada solo estudado

Ambiente	Coordenadas	Vegetação
TPA Hatahara	3º 16´ S- 60º 12´W	Banana
ADJ Hatahara	3º 16´S- 60º 11´W	Pastagem
TPA Caldeirão Cultivado	03º26´S - 60º23´W	Mandioca
ADJ Caldeirão Cultivado	03º26´S, 60º23´W	Mandioca
TPA Caldeirão Capoeira	03º26´S, 60º23´W	Floresta Secundária
ADJ Caldeirão Capoeira	03º26´S, 60º23´W	Floresta Secundária

Para a amostragem em cada um dos seis ambientes, triplicatas de tubos de PVC com 20 cm foram coletados em cinco pontos distintos, separados a uma distância de 1,5 metros, com uma distribuição radial (Figura 2). Em seguida, duas amostras de cada ponto foram armazenadas em gelo seco durante o transporte até Piracicaba-SP, sendo, acondicionadas a -20 ºC, no laboratório de Biologia Celular e Molecular, para posteriores análises químicas e extrações do DNA total. O terceiro conjunto de amostras foi armazenado em condições refrigeradas durante o transporte, evitando o seu congelamento. Este em seguida, foi utilizado para o isolamento de leveduras a partir de uma amostra composta dos cinco pontos coletados em cada ambiente.

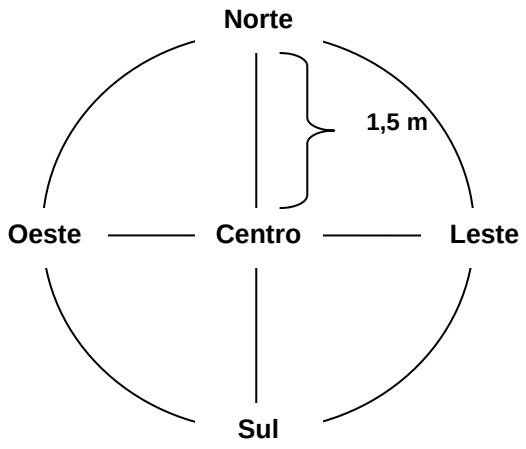


Figura 2 – Esquema representativo da amostragem dos solos em sítios de Terra Preta de Índio e adjacências ilustrando posicionamento geográfico dos pontos amostrais com uma distribuição radial

2.2.2 Análises dos Atributos químicos

Uma amostra, de cada um dos 5 pontos coletados, em cada ambiente, foi submetida a análises de seus atributos químicos pelo Laboratório de Análises Químicas, do Departamento de Ciência do Solo (ESALQ-USP). Posteriormente, seus resultados foram submetidos a cálculos de suas médias e desvios padrões.

2.2.3 Isoalmento de leveduras do solo

2.2.3.1 Metodologia de isolamento e purificação

Um total de 10 gramas de solo, provenientes de uma amostra composta dos 5 pontos coletados, foi adicionado em um volume final de 50 ml de YEPD líquido (2% Glicose, 1% Peptona, 1% Extrato de levedura, pH 4,8 e os antibióticos: 200 mg/L de Cloranfenicol e 100 mg/L de Estreptomicina) agitados vigorosamente por 5 minutos em *vortex* e mantidos a uma temperatura de 28 ºC, por 16 horas a 120 rpm. Posteriormente, a amostras foram diluídas até 10^{-5}, inoculados por espalhamento em triplicatas nas placas de Petri com meio YEPD sólido (2% Glicose, 1% Peptona, 1% Extrato de levedura, 2% Ágar, pH 4,8 e os antibióticos: 200

mg/L de Cloranfenicol e 100 mg/L de Estreptomicina) e mantidos a uma temperatura de 28 ºC por 4 dias.

Para a seleção dos isolados e posteriores purificações por estrias, aproximadamente 7 (sitio Caldeirão) e 8 (sítios Hatahara) colônias distantes entre si e diferentes na coloração, quando possível, de cada uma das triplicatas que apresentaram contagem de UFC entre 30 e 300, foram selecionadas. Além disso, colônias raras, com morfologias distintas das anteriormente escolhidas, foram selecionadas, objetivando-se o maior número de leveduras diferentes na sua aparência e um número total aproximado de 30 isolados por solo estudado.

Após a obtenção dos isolados purificados e confirmados como leveduras por microscopia óptica, estes foram crescidos em meio YEPD líquido (2% Glicose, 1% Peptona, 1% Extrato de levedura e pH 4,8), por aproximadamente 48 horas a uma rotação de 120 rpm e temperatura de 28 ºC. Uma alíquota, de 500 µL desta solução de células, foi misturada com o mesmo volume de glicerol 50% para confeccionar soluções estoques de glicerol 25% e armazená-los a uma temperatura de – 80 ºC.

2.2.3.2 Testes Metabólicos

Objetivando uma maior compreensão do metabolismo das principais espécies de leveduras, obtidas por isolamento, em diferentes ambientes, análises de consumos de alguns carboidratos, testes de antagonismos e fermentativos foram efetuados.

Para testar o consumo de carboidratos, as espécies de leveduras mais comuns, em cada um dos seis ambientes estudados, foram analisadas quanto ao seu consumo, utilizando como base o meio Bushnell-Haas (BH) difco, com pH ajustado para 5,0, seguida da adição de 2% dos seguintes carboidratos: amido, sacarose, arabinose, celobiose, galactose e glicose, como controle positivo. Para o controle negativo o mesmo meio sem adição de açúcares foi inoculado com as linhagens de levedura estudadas. Os testes foram efetuados em meio sólido, com adição de 2% de Ágar, e em meio líquido, sendo neste, aplicado 50 µL de inoculo com uma concentração de 10^6 células/ mL, previamente quantificados em uma câmara de Neubauer. As culturas foram mantidas por até 5 dias em uma incubadora a 28 ^oC, sendo as em meio líquido, sob agitação de 120 rpm. Posteriormente seu crescimento foi avaliado visualmente para as placas em meio sólido e por microscopia óptica para os meios líquidos. A escolha do meio mineral ocorreu devido a sua composição pobre em nutrientes, contendo

apenas alguns minerais, o que permitiu testar os consumos de alguns carboidratos em baixas concentrações nutricionais. Trabalhos anteriores também adotaram o uso de meios com composição mineral para analisar o consumo de carboidratos aromáticos em leveduras (YAN et al., 2005).

Nos testes de antagonismo, isolados do ambiente de TPA foram contrastados com os obtidos no ambiente do solo adjacente e vice e versa. O meio YEPD sólido com azul de metileno e tamponado a um pH 4,5 (meio YEPD + 0,003% de azul de metileno + Tampão citrato-fosfato pH 4,2) foi utilizado para a análise, sendo as espécies a serem testadas quanto a sua susceptibilidade, previamente crescidas em meio YEPD líquido, quantificadas a 10^6 células / ml em espectrofotômetro (A_{600}= 0,05) e 100 µL semeadas por espalhamento. Posteriormente, os possíveis isolados produtores de micotoxinas foram inoculados, na mesma placa, com o auxilio de uma alça de platina e seus resultados comparados após 7 dias, no qual, foi considerado como resultado positivo o crescimento do último isolado inoculado sobre o susceptível, com a formação de um halo azul ao seu redor.

As análises fermentativas foram efetuadas em triplicatas de tubos de Durhan, com o meio YEP pH 4,8 (1% Extrato de levedura e 2% Peptona), seguido da adição de 2% dos carboidratos: glicose, sacarose, galactose, arabinose, celobiose e amido, sendo inoculados 100 µL de uma solução de 10^6 células / ml, previamente quantificados em um espectrotômetro (A_{600} = 0,05) modelo NanoDrop, ND-2000 (NanoDrop Technologies), para cada um dos isolados testados.

2.2.3.3 Identificação Molecular do isolados de levedura

2.2.3.4 Extração de DNA de leveduras

Os isolados de leveduras, foram crescidos em meio YEPD líquido sob a temperatura de 28 ^{0}C, numa rotação de aproximadamente 120 rpm e um período de 24 à 48 horas. Posteriormente, 2 ml desta solução de células foram precipitadas por centrifugação a uma rotação de 6800 g por 10 minutos. Para a extração do DNA genômico total, foi adotado o protocolo de Stirling e Bartlett (2003), conforme a seguir: 200 µL de Solução A (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8), mais 200 µL fenol: clorofórmio: álcool isoamilico (25:24:1) e 200 mg de pérolas de vidro (0,1mm) foram

adicionadas as células precipitadas e agitados em um *vortex* por 3 minutos. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de TE e as amostras foram centrifugadas 15300 g por 5 minutos, sendo, aproximadamente 400 µL do sobrenadante transferidos para um novo tudo. Por último, o DNA foi precipitado com álcool absoluto, ressuspendido em 50 µL de Tris-RNAse (0,1 mg/ mL de RNAse e 10 mM de Tris-HCl pH 8,0) e tratado por 30 minutos a 37 ^{o}C. Para quantificação do DNA, estes foram analisados em espectrofotômetro modelo NanoDrop, ND-2000 (NanoDrop Technologies) seguido das devidas diluições para ajustar suas concentrações a 50 ng/ µL.

2.2.3.5 Amplificação do rDNA dos isolados

Para identificação molecular dos isolados foi adotada a metodologia de sequenciamento da região D1/D2 do gene de rRNA. Na amplificação foram utilizados os *primers* ou iniciadores NL1- (5'- GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG -3') e NlL4- (5'- GGTCCGTGTTTCAAGACGG -3') (FELL *et. al.*, 2000; KURTZMAN; ROBNETT, 1998) com a seguinte condição: 50 ng de DNA; 2,0 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de cada dNTP; 0,2 pmol/µL de cada um dos *primers*; 0,05 U/ µL de *Platinum*® *Taq Polimerase* 5 U (Invitrogen, Brasil) e água ultrapura (Mili-Q) esterilizada para completar o volume desejado. Por último, as reações de amplificação foram efetuadas em um termociclador, modelo *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 94 ^{o}C por 4 min; 35 ciclos de 94 ^{o}C por 30 s, 56 ^{o}C por 45 s e 72 ^{o}C por 1 min; seguido de uma extensão final a 72 ^{o}C por 10 min.

Para a confirmação o produto de amplificação foi analisado em gel de agarose 1,3% (p/v) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), corado com *GelRed* (Biotium Inc., Hayward, CA) (4 µL/ 100 ml de gel), utilizando como padrões moleculares: 2 µL de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen, Brasil) e 5 µL de 100bp *DNA* Ladder (Invitrogen, Brasil) para confirmar o tamanho aproximado de 600 pb do fragmento amplificado. O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e posteriormente foto documentado.

2.2.3.6 Purificação do produto de PCR

Estes produtos foram purificados com isopropanol 75%, na proporção isopropanol: produto PCR (3:1). Após este período, as amostras foram centrifugadas a 20800 g por 25 min e o sobrenadante descartado. As amostras foram ressuspendidas em etanol 70%, com um volume 5 vezes maior ao volume do produto; centrifugadas a 20800 g por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Por último, estas foram secas no concentrador de DNA por 10 min e os péletes ressuspendidos em 50 µL de água ultrapura (Mili-Q). Para quantificação do produto, estes foram analisados em espectrofotômetro modelo NanoDrop, ND-2000 (NanoDrop Technologies) e em gel de de agarose 1,3% (p/v), em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), corado com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA) (4 µL/ 100 ml de gel), utilizando como padrões moleculares: 2 µL de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen, Brasil) e submetido a um campo elétrico de 80V por aproximadamente 30 minutos.

2.2.3.7 Reação de sequenciamento e precipitação

Para o sequenciamento, foram efetuadas duas reações por produto de PCR obtidos, uma com cada *primer*, preparadas com *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham, Biosciences GE,*. A amplificação foi feita em solução contendo: 2,0 µL de DYEnamic; 4,0 µL de tampão para PCR 2,5X (400 mM Tris-HCl pH 9,0; 10 mM $MgCl_2$); 1,0 µL do *primer* a 5 pmol; 1 µL (aproximadamente 90 ng) do produto de amplificação da região do inserto; e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para volume final de 10 µL. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 30 ciclos com desnaturação de 95ºC por 20 s, anelamento a 56ºC por 15 s e extensão a 60ºC por 1 min. A precipitação foi efetuada com acetato de sódio 1,5M/ EDTA 0,25M e etanol absoluto, no qual, adicionou-se 2 µL de solução acetato de sódio/EDTA e 60 µL de etanol absoluto, agitou-se e centrifugou-se a 20.800 g por 25 minutos, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 150 µL de etanol 70%, centrifugou-se a 20.800 g por 5 min, descartou-se o sobrenadante e secou a 40 ^{o}C por 10 min. Por último, as amostras foram ressuspendidas em 10 µL de *Hi-Di Formamide* (Applied Biosystems) submetidos a um sequenciador automático *ABI Prism 3100 Genetic Analyser* (Applied Biosytems).

2.2.3.8 Análises das sequências e estatísticas

A partir dos resultados fornecidos pelo sequenciador, oriundos da amplificação da região D1/D2 do gene rRNA com os *primers* NL1 e NL4, sequências consenso foram criadas utilizando-se o software *Bionumerics 6.0* (Applied Maths NV, Bélgica). Estas foram submetidas a análises comparativas com sequências do banco de dados *GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI)* pelo programa de alinhamento local do *nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* (ALTSCHUL et. al., 1990), obtendo-se a identificação que apresentou melhores valores de *e-value*, similaridade.

Objetivando confirmar os resultados obtidos por *BLAST*, 13 árvores filogenéticas foram construídas, baseando-se em trabalhos anteriores de filogenia com leveduras para o filo dos Ascomicetos (KURTZMAN; SUZUKI, 2010; KURTZMAN; ROBNETT, 1998) e Basidiomicetos (FELL et. al., 2000; SAMPAIO et. al., 2001). As sequências obtidas foram previamente submetidas, ao alinhamento global pelo programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007), seguidas da construção das árvores pelo método *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987), adotando como estimativa de distância o modelo *Jukes-Cantor* (JUKES; CANTOR, 1969), sendo os níveis de confiança para os ramos individuais calculados pela análise de *Bootstrap* (FELSENTEIN, 1985), na qual, 1000 repetições foram geradas a partir dos dados.

Com os resultados obtidos pela identificação molecular dos isolados de leveduras, uma matriz de presença e ausência das espécies observadas em cada um dos seis solos estudados foi gerada e análises multivariadas executadas para avaliar as possíveis diferenças existentes entre eles, confirmando ou negando as hipóteses do estudo. Primeiramente, uma análise de *nMDS* (*non- metric Multidimensional Scaling)* foi realizada, pelo programa *Primer6* (Plymouth Marine Laboratory, Primer-e, Reino Unido), adotando como estimativa de similaridade o modelo *Jaccard,* para avaliar a distribuição no espaço dos diferentes solos estudados. Buscando compreender as relações entre os atributos químicos destes solos e a variabilidade das espécies de isolados encontradas uma análise de Mantel foi efetuada pelo programa *PAST* (disponível em: http://palaeo-electronica.org/2001–1/past/issue1–01.htm) (HAMMER et al., 2001).

2.2.4 DGGE de leveduras e fungos

2.2.4.1 Extração do DNA total de solo

Dos 5 pontos coletados (Item 2.1.1), em cada um dos seis solos estudados, um total de três amostras foram selecionadas ao acaso e seu DNA total do solo extraídos utilizando-se o Kit *Power Soil DNA* (MoBIO, Carlsbad, CA), de acordo comas instruções do fabricante e resumidas abaixo.

Uma amostra de 250 mg de solo foi pesada em uma balança analítica, adicionada ao tubo *PowerBead* de 2 ml, agitada levemente, acrescido 60 µl da solução C1 invertendo o tubo várias vezes agitado em um *vortex* na velocidade máxima por 10 min e centrifugado a 10.000 *g* por 30 s. O sobrenadante obtido (aprox. 450 µl) foi transferido para um novo tubo, adicionado 250 µl da solução C2, agitados por 5 s e incubado a 4ºC por 5 min. Após este período, centrifugou-se a 10.000 *g* por 1 min e então 600 µl do sobrenadante foi transferido para um novo tubo; adicionou-se 200 µl da solução C3 e agitou-se por 5 s e após essa etapa, incubou-se novamente a 4ºC por 5 min. Em seguida, centrifugou-se a 10.000 *g* por 1 min e transferiu-se 750 µl do sobrenadante a um novo tubo; adicionou-se 1200 µl da solução C4, agitou-se por 5 s, carregou-se 675 µl da solução no tubo contendo a coluna e então centrifugou-se por 1 min a 10.000 x *g*. A solução coletada no tubo foi descartada, mais 675 µl foi carregado na coluna e centrifugado por 1 min a 10.000 *g*. A solução coletada no tubo foi novamente descartada, o restante foi aplicado na coluna, centrifugado novamente nas condições anteriores. Após isto, adicionou-se 500 µl da solução C5 na coluna e centrifugou-se a 10.000 *g* por 30 s; descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente o tubo vazio por mais 1 min a 10.000 *g*; após essa etapa, a coluna foi transferida para um novo tubo e adicionou-se 100 µl da solução C6 no centro da coluna; centrifugou-se por 30 s a 10.000 *g* e obteve-se o DNA extraído das amostras.

Para a quantificação da extração, uma alíquota de 5 µl do DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) corado com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA) (4 µL/ 100 ml de gel) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004). Como padrão molecular foi utilizado 2 µl de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e então foto documentado.

2.2.4.2 Reação de amplificação

Para as reações de DGGE, foram adotadas metodologias semelhantes às propostas por outros autores que amplificaram DNA de leveduras a partir de amostras fermentativas e ambientais (COCOLIN, BISSON; MILLS, 2000; GADANHO; SAMPAIO, 2004). A amplificação ocorreu em duas etapas sendo a primeira efetuada com os primers ITS1FD-(5'-GGT CAT TTA GWG GAA STA A-3') e NL4-(5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G – 3') com as seguintes condições: 3 µL do DNA total extraído do solo, 2 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de cada dNTP, 0,25 pmol /µL de cada *primer*, 0,05 U/µL de *Platinum*® *Taq Polimerase* 5 U (Invitrogen, Brasil) e água ultra pura (Mili-Q) para completar o volume da reação. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 94 ^{o}C por 4 min; 38 ciclos de 94 ^{o}C por 30 s, 58 ^{o}C por 45 s e 72 ^{o}C por 1 min; seguido de uma extensão final a 72 ^{o}C por 10 min. Uma segunda reação (*nested)* foi efetuada, utilizando os *primers*, NL1-GC (5' -CGCCCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GC ATA TCAATA AGC GGA GGA AAA G– 3'€) e LS2(5' – ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC –3'), propostos por Coccolin et al. (2000), nas seguintes condições: 1µL do produto de PCR anterior diluído 50X, 1,5 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de cada dNTP, 0,20 pmol /µL de cada *primer*, 0,05 U/µL de *Platinum*® *Taq Polimerase* 5 U (Invitrogen, Brasil) e água ultra pura (Mili-Q) para completar o volume da reação. As reações de amplificação foram efetuadas em um termociclador, modelo *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 95 ^{o}C por 4 min; 30 ciclos de 95 ^{o}C por 30 s, 56 ^{o}C por 45 s e 72 ^{o}C por 1 min; seguido de uma extensão final a 72 ^{o}C por 10 min. A confirmação dos produtos de amplificação, de ambas as reações, foram analisados em géis de agarose 1,3% (p/v) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrões moleculares: 2 µL de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen, Brasil) e 5 µL de 100bp *DNA* Ladder (Invitrogen, Brasil). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e posteriormente foto documentado.

2.2.4.3 Preparo do gel e condições de corrida

As análises de DGGE foram efetuadas com o aparelho *phorU2* (Ingeny, Leiden, The Netherlands,) em um gel de poliacrilamida 8%, com um gradiente de desnaturação de 32-45% e um campo elétrico de 90V por 16 h. Para o preparo do gel os respectivos gradientes de 32% (*Low)* e 45% (*High*) foram realizados misturando-se as soluções A- (Acrilamida 8%) e B

(Acrilamida 8%, Uréia 5,6M e Formamida deionizada 32%) e adicionando 75 µL de APS 20% e 12 µL TEMED , em cada uma das soluções. Em seguida, as soluções foram misturadas em uma bomba misturadora; e, após 50 min., o *Stacking* foi confeccionado com: 7 ml de poliacrilamida da solução A, 45 µL de APS 20% e 10µL de TEMED, sendo aguardado 60 min., para a polimerização do mesmo. Aproximadamente, 3 µL do produto de PCR, juntamente com 2 µL de Tampão de carregamento foram aplicados no gel e então este submetido as condições de voltagem e tempo acima citadas.

Os géis foram corados com Nitrato de Prata 0,15%, no qual estes foram mantidos em uma Solução Fixadora (Etanol 10% e Acido Acético 0,5%) por 15 min., seguidos de uma coloração em solução de Nitrato de Prata 0,15% agitado gentilmente por 15 min. e revelados em uma solução Reveladora (400 µL de Formaldeído e 100 mL NaOH 1,5%) até a intensidade desejada. Para interromper o processo de revelação foi utilizado uma solução de Parada (Na_2CO_3 0,75%) por 10 min. e o gel foto documentado em um *Scanner HP G4050 (*HP Hewlett Packard*)*, sendo a imagem salva no formato *tif*.

2.2.4.4 Recorte, re-amplificação das bandas de DGGE

As bandas incisadas do gel foram eluídas em 20 µL de água ultrapura (Mili-Q) e 1 µL deste DNA difundido utilizado para reação de PCR com os *primers* NL1 e LS2 de acordo com as condições anteriormente citadas no item 2.1.5.2. Para confirmação, o produto de amplificação foi analisado em gel de agarose 1,3% (p/v) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrões moleculares: 2 µL de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen, Brasil) e 5 µL de 100bp *DNA* Ladder (Invitrogen, Brasil). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e posteriormente foto documentado.

2.2.4.5 Purificação do produto de PCR

Objetivando produtos de PCR com um maior grau de pureza as amostras de bandas re-amplificadas foram purificadas com o Kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com instruções do fabricante e resumidos em seguida. Ao produto de PCR, obtido na etapa 2.3, foi adicionado 100 µl de *Capture buffer type* e esta transferida para uma coluna GFX (com filtro), sendo centrifugada a 16.000 *g* por 30 s e o filtrado descartado.

Adicionou-se 500 µl de *Wash buffer type 1*, na coluna GFX, centrifugou-se a 16.000 g por 30s e o filtrado foi descartado. Por último, 20 µl do *Elution buffer type 4* foi adicionado ao filtro, mantido por 1 min a temperatura ambiente e centrifugado a 16.000 g por 1 min, para recolher o DNA. Para a quantificação do DNA purificado, estes foram analisados em espectrofotômetro modelo NanoDrop, ND-2000 (NanoDrop Technologies).

2.2.4.6 Clonagem dos produtos de PCR

Os produtos amplificados e purificados obtidos do recorte das bandas de DGGE foram clonados em um vetor *pGEM®-T Easy*, de acordo com as instruções do fabricante do Kit *pGEM®-T Easy Vector* (Promega). A reação de ligação do produto de PCR purificado ao vetor foi realizada da seguinte maneira: 0,5 µl de T4 DNA Ligase (3U/µl); 2,5 µl de tampão T4 Ligase 1X; 1µl do produto de PCR purificado (aproximadamente 20 ng) e 0,5µl do vetor pGEM®-T. Posteriormente, as misturas foram armazenadas a 4 ^{0}C por um período de aproximadamente 16 h. A quantidade necessária em ng do produto de PCR a ser utilizado na clonagem foi realizada considerando a fórmula a seguir:

$$\frac{\text{ng do vetor} \times \text{tamanho do inserto (Kb)}}{\text{Tamanho do vetor (Kb)}} \times \text{taxa molar inserto : vetor} \quad (*)$$

*A taxa molar inserto:vetor utilizada foi de 3:1.

2.2.4.7 Transformação das células competentes

Para a transformação das células competentes, 5 µL do produto de ligação foram misturados a 20 µL do tampão de transformação (TT) (0,1M KCM, 0,03 M $CaCl_2$, 0,05M $MgCl_2$, 1,5% PEG) e posteriormente, misturados suavemente as células competentes *E. coli* DH 10β , mantidas no gelo por 20 min., seguidos de 10 min. a temperatura ambiente. A este produto foi adicionado 400 µL de meio LB e mantidos a 37 ^{0}C por uma hora sob agitação de 80 rpm. Cerca de 150 µL destas células foram semeadas por espalhamento, com uma alça de *Drigalski*, em um meio LB ágar contendo para cada mililitro de meio 1 µL das seguintes

soluções: ampicilina (50 mg/ml) e X-gal (100 mg/ml). Por último, estas placas foram incubadas a uma temperatura de 37 ^{0}C por aproximadamente 16 horas. As unidades formadoras de colônias (UFC) crescidas, que apresentaram a coloração branca, as quais confirmam a inserção do fragmento de DNA desejado, foram coletadas com palitos estéreis, adicionados em placas com 50 µL de TE e submetidos à fervura por 10 min., para a extração de seu DNA. Para a amplificação do fragmento de DNA plasmidial com o inserto, uma reação de PCR com os primers M13r e M13f foi efetuada nas seguintes condições: 1 µL do DNA extraído por fervura, 3 mM de $MgCl_2$, 10X buffer, 200µM de dNTP, 200µM de cada primer e 0,03U/µL de Taq DNA polimerase complementada com água (Mili-Q) ultrapura esterilizada para um volume final de 30µL.

2.2.4.8 Reação de seqüenciamento dos clones

Para o seqüenciamento, foram efetuadas duas reações por produto de PCR obtidos, uma com cada *primer*, preparadas com *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham, Biosciences GE).* A amplificação foi feita em solução contendo: 2,0 µL de DYEnamic; 4,0 µL de tampão para PCR 2,5X (400 mM Tris-HCl pH 9,0; 10 mM $MgCl_2$); 1,0 µL do *primer* NL1 a 5 pmol; 1 µL (aproximadamente 90 ng) do produto de amplificação da região do inserto; e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para volume final de 10 µL. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 30 ciclos com desnaturação de 95ºC por 20 s, anelamento a 56ºC por 15 s e extensão a 60ºC por 1 min. A precipitação foi efetuada com acetato de sódio 1,5M/ EDTA e etanol absoluto, no qual, adicionou-se 2 µL de solução acetato de sódio/EDTA 0,5M e 60 µL de etanol absoluto, agitou-se e centrifugou-se a 14.000 rpm por 25 minutos, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 150 µL de etanol 70%, centrifugou a 20800 g por 5 min, descartou o sobrenadante e secou a 40 ^{o}C por 10 min. Por último, as amostras foram ressuspendidas em 10 µL de *Hi-Di Formamide* (Applied Biosystems) submetidos a um seqüenciador automático *ABI Prism 3100 Genetic Analyser* (Applied Biosytems).

2.2.4.9 Preparo de células competentes

Para o preparo de células de uma colônia isolada de *E. coli*, crescidas anteriormente em placa de Petri contendo meio Luria Bertani – LB (1% de Triptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,25% de NaCl; 2% de agar), foram inoculadas em 5 mL de meio TYM (2% Peptona, 0,5% Extrato de Levedura, 0,58% NaCl, 0,25% $MgSO_4$. 7 H_2O) e mantidas por 16 h a 300 rpm e uma temperatura de 37 ºC. Posteriormente, sucessivas etapas de crescimento e medições de sua absorbância foram efetuadas, até um valor final de igual a 0,6, quando mensurada em um comprimento de onda igual a 600 nm. Após esta etapa, as células foram mantidas em gelo por 5 min, centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos a 4 ºC e seu sobrenadante descartado. Em seguida, estas células foram ressuspendidas em 100 ml de solução TFB1 (0,29% KOAc, 0,97% $MnCl_2$. $4H_2O$, 0,74% KCl, 0,15% $CaCl_2$. H_2O, 15% Glicerol) geladas, centrifugadas a 3000 RPM por 8 minutos à 4 ºC e seu sobrenadante foi descartado. As células precipitadas foram ressuspendidas em 10 ml de solução TBF2 (0,01M MOPS pH 7,0; 1% $CaCl_2$. 2 H_2O, 0,067% KCl e 15% glicerol) previamente resfriada e alíquotas de 100 µL acondicionadas em tubos, sendo estas letamente resfriadas em gelo, gelo seco e armazenadas a uma temperatura de -80 ºC.

2.2.4.10 Análises estatísticas

Para as análises dos perfis de DGGE e criação de uma matriz de presença / ausência dos dados, o programa *BioNumerics 6.0* (Applied Maths NV, Bélgica) foi utilizado. Nele a imagem obtida no formato *tif* (Item 2.1.5.3) foi submetida ao tratamento, alinhamento, suas bandas atribuídas manualmente e a da tolerância com respeito ao posicionamento destas calculada automaticamente pelo programa, sendo definidos como 0,75% o seu valor. Análises de *Cluster* e *MDS (Multidimensional Scaling),* baseados no algoritmo *Single Linkage*, para o sítio Hatahra, e *Neighbor-Joining*, para os demias, com coeficiente de similaridade *Jaccard* foram efetuados no mesmo programa.

A partir da matriz de presença e ausência gerada, uma Análise de Similaridade (ANOSIM), com coeficiente de similaridade *Jaccard*, pelo programa *PAST (*HAMMER et al. 2001). Nela, resultados de $R < 0,5$ indicam que os grupos pré-estabelecidos são semelhantes; $0,5 < R < 0,75$ que os grupos são distintos com alguma semelhança e $R > 0,75$ são totalmente distintos (CLARKE; GORLEY, 2001). Ainda com as matizes de presença e ausência, índices

de riquezas como: média da UTO's encontradas em cada ambiente e CHAO2, seguido da sua variância (Figura 3), foram calculados pelo programa *PAST* (HAMMER et al., 2001). A partir de uma matriz da variabilidade genética baseada na abundância das UTOs presentes no gel, previamente gerada pelo programa *Bionumerics 6.0*, foram calculados os índices de diversidade Shannon (H') (Figura 4), pelo software *PAST* (HAMMER et. al., 2001) para cada uma das três amostras,sendo posteriormente, suas médias e desvios médios efetuados no *EXCEL*. Para obter a correlação entre a matriz de variabilidade genética, gerada pela análise de DGGE e a de atributos químicos, o Teste de Mantel foi efetuado pelo programa *PAST (*HAMMER et al. 2001). Além disso, uma análise de gradiente direto foi efetuada no programa *Canoco 4.5* (Biometris, Wageningen, Hoalanda), a qual buscou-se demonstrar a variabilidade na distribuição espacial das amostras e correlacioná-las, individualmente, com os atributos químicos (LEPS; SMILAUER, 2003). Para tal, primeiramente a distribuição dos dados foi testada por uma análise de *DCCA* (*Detrended Canonical Correspondence Analysis*), sendo o maior dos seus tamanhos de gradiente (*"Lengths of gradient")* inferior a 3 um indicativo de uma distribuição linear, e para superiores a 4 uma distribuição normal; sugerindo respectivamente, análises de *RDA* (*Redundancy Analysis)* e *CCA* (*Canonical Correspondece Analysis*) (ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009; RAMETTE, 2007). Após o teste de distribuição dos dados, análises de *RDA* com os atributos químicos foram geradas e então as relações entre os ambientes estudados e seus atributos químicos do solo comparados.

Índice CHAO2:

$$S_{Chao2} = S_{obs} + Q_1^2 / 2Q_2$$

onde: S_{obs} = número de espécies observadas; $Q_{1=}$ números de espécies únicas na amostra; $Q_{2=}$ números de espécies que ocorrem em duas amostras.

Figura 3 – Fórmula para o cálculo do índice CHAO2

Índice Shannon:

$$H' = -\Sigma (n/N) \log (n/N)$$

Onde : n= número de indivíduos de cada espécie; N= número total de indivíduos

Figura 4 - Fórmula para o cálculo do índice de Shannon

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Análise química dos solos

A análise química de 13 atributos dos solos estudados, seguidos dos seus respectivos desvios padrões e médias, estão representadas na tabela 2. Nela, concomitantemente com a análise de PCA (Figura 5), pode-se evidenciar uma diferença na composição química da TPA do sítio Hatahara para com os demais solos de TPA estudados, sendo a partir da análise das médias e desvios padrões, mais relevantes, os atributos químicos: P, Ca, K, H+Al, SB (Soma de Bases), Zn e Cu. Além disso, é clara a diferença na composição química entre a TPAs e seus respectivos solos adjacentes, nos quais, atributos químicos como: pH, P, K Ca, Mg, SB, Zn e Mn são determinantes nesta distinção.

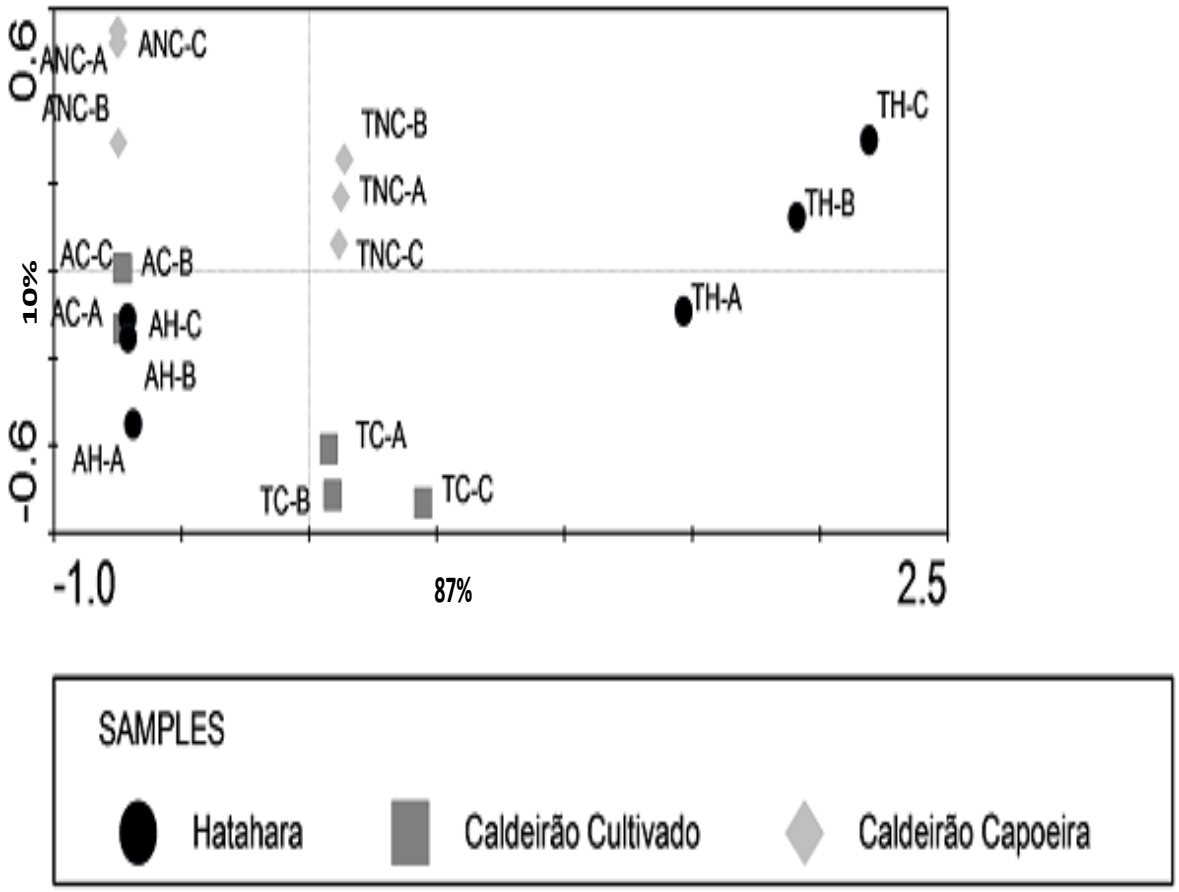


Figura 5 - Análise de PCA dos Atributos químicos dos solos

Tabela 2 - Análises Químicas dos solos estudados

Solos	pH	MO	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	Fe	Zn	Mn	Cu
	$CaCl_2$	g dm^{-3}	mg dm^{-3}			mmolc dm^{-3}					mg dm^{-3}		
ADJ Hatahara-A	3,80	34,00	8,00	0,60	7,00	1,00	15,00	98,00	8,60	151,00	0,30	0,50	0,10
ADJ Hatahara-B	3,80	34,00	8,00	0,70	7,00	1,00	15,00	109,00	8,70	202,00	0,40	0,50	0,10
ADJ Hatahara-C	3,60	32,00	6,00	0,70	5,00	1,00	12,00	80,00	6,70	194,00	0,20	0,20	0,10
Média	3,73	33,33	7,33	0,67	6,33	1,00	14,00	95,67	8,00	182,33	0,30	0,40	0,10
Desvio Padrão	0,12	1,15	1,15	0,06	1,15	0,00	1,73	14,64	1,13	27,43	0,10	0,17	0,00
TPA Hatahara-A	5,40	56,00	413,00	0,80	145,00	13,00	0,00	42,00	158,80	173,00	26,00	8,30	3,10
TPA Hatahara-B	5,20	52,00	525,00	1,10	130,00	17,00	0,00	52,00	148,10	213,00	31,10	14,00	2,70
TPA Hatahara-C	5,00	51,00	588,00	1,30	140,00	11,00	0,00	52,00	152,30	246,00	35,20	15,50	4,00
Média	5,20	53,00	508,67	1,07	138,33	13,67	0,00	48,67	153,07	210,67	30,77	12,60	3,27
Desvio Padrão	0,28	3,54	123,74	0,35	3,54	1,41	0,00	7,07	4,60	51,62	6,51	5,09	0,64
ADJ Capoeira-A	3,71	51,00	9,00	0,44	7,00	5,00	20,00	120,00	11,40	334,00	0,70	1,75	0,04
ADJ Capoeira-B	3,71	59,00	7,00	0,30	7,00	6,00	21,00	109,00	3,80	286,00	0,36	1,25	0,08
ADJ Capoeira-C	3,53	55,00	9,00	0,25	4,00	8,00	19,00	93,00	6,60	341,00	0,65	1,89	0,09
Média	3,65	55,00	8,33	0,33	6,00	6,33	20,00	107,33	7,27	320,33	0,57	1,63	0,07
Desvio Padrão	0,10	4,00	1,15	0,10	1,73	1,53	1,00	13,58	3,84	29,94	0,18	0,34	0,03
TPA Capoeira-A	5,57	59,00	135,00	0,70	104,00	14,00	4,00	78,00	130,00	246,00	15,98	9,80	1,57
TPA Capoeira-B	5,51	59,00	143,00	0,60	97,00	13,00	3,00	62,00	120,00	265,00	14,77	7,50	1,51
TPA Capoeira-C	5,13	55,00	101,00	0,60	85,00	14,00	0,00	83,00	112,00	224,00	10,03	10,50	1,09
Média	5,40	57,67	126,33	0,63	95,33	13,67	2,33	74,33	120,67	245,00	13,59	9,27	1,39
Desvio Padrão	0,24	2,31	22,30	0,06	9,61	0,58	2,08	10,97	9,02	20,52	3,14	1,57	0,26
ADJ Cultivado-A	3,75	34,00	4,00	0,25	3,00	6,00	15,00	98,00	4,70	198,00	0,30	1,00	0,08
ADJ Cultivado-B	3,74	33,00	6,00	0,44	4,00	8,00	16,00	98,00	6,40	227,00	0,40	2,46	1,10
ADJ Cultivado-C	3,56	30,00	5,00	0,46	4,00	3,00	15,00	88,00	3,70	228,00	0,20	2,73	0,09
Média	3,68	32,33	5,00	0,38	3,67	5,67	15,33	94,67	4,93	217,67	0,30	2,06	0,42
Desvio Padrão	0,11	2,08	1,00	0,12	0,58	2,52	0,58	5,77	1,37	17,04	0,10	0,93	0,59
TPA Cultivado-A	5,42	56,00	148,00	0,30	52,00	16,00	3,00	80,00	68,60	127,00	9,10	8,20	1,80
TPA Cultivado-B	5,41	49,00	144,00	0,60	60,00	18,00	0,00	72,00	78,50	105,00	9,50	6,50	2,40
TPA Cultivado-C	5,32	49,00	231,00	0,40	53,00	14,00	4,00	88,00	67,40	96,00	9,80	7,10	1,50
Média	5,38	51,33	174,33	0,43	55,00	16,00	2,33	80,00	71,50	109,33	9,47	7,27	1,90
Desvio Padrão	0,06	4,04	49,12	0,15	4,36	2,00	2,08	8,00	6,09	15,95	0,35	0,86	0,46

2.3.2 Isolamento

2.3.2.1 Isolamento e testes metabólicos

Apesar de o isolamento ter ocorrido de forma enriquecida, com o crescimento prévio dos isolados em meio líquido por aproximadamente 16 h, pode-se estimar que este apresentou para a Terra Preta, aproximadamente, 10^5 (Hatahara) e 10^6 (Caldeirão) unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de solo, sendo, dez a cem vezes maiores quando comparados aos solos adjacentes (Tabela 3). Estes resultados podem indicar que as espécies presentes na Terra Preta apresentam uma melhor taxa de crescimento sob estas condições. Além disso, Ruivo et al. (2009) apresentaram, a partir de um isolamento em condições não enriquecidas, resultados com os mesmos valores de UFC para leveduras em sítios de TPA de Caxiuanã (PA) e Santarém (PA), indicando talvez, que mesmo sob estas condições, os resultados do isolamento não estejam muito discrepantes.

Quanto à morfologia de coloração dos isolados esta foi restrita as cores: amarela, creme, branca e vermelha (Figura 6).

Figura 6- Imagem da morfologia de cores obtidas no isolamento

Tabela 3 - Unidades formadoras de colônias por grama de solo, obtidos no isolamento enriquecido

Sítio	média das estimativas UFC/g de solo*
TPA Hatahara	$3,28 \times 10^5$
ADJ Hatahara	5×10^4
TPA Caldeirão Cultivado	$1,44 \times 10^6$
ADJ Caldeirão Cultivado	$1,65 \times 10^4$
TPA Capoeira	$2,3 \times 10^6$
Adj Capoeira	$3,78 \times 10^4$

*Dados obtidos a partir da metodologia por enriquecimento

Os testes metabólicos para o consumo de carboidratos, sob condições aeróbias e anaeróbias, demonstraram que as espécies identificadas nos solos adjacentes apresentam uma maior diversidade metabólica no consumo de carboidratos distintos, do que quando comparadas com as leveduras isoladas da TPA (Tabela 4). No ambiente de Terra Preta, leveduras identificadas como: *Pichia rhodanensis*, *Saccharomycopsis sp.*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Williopsis saturnus var. subsufficiens* e *Issatchenkia terricola*, apresentaram a capacidade de consumir no máximo 3 carbonos distintos (Tabela 5). Uma das possibilidades que poderiam explicar estes resultados seria a menor fertilidade dos solos adjacentes, com valores inferiores a TPA de matéria orgânica, e que poderiam exercer uma pressão de seleção sobre as espécies de leveduras que apresentem uma maior variabilidade metabólica, quanto ao consumo de carboidratos para sobreviverem neste ambiente.

Para os testes de antagonismos as espécies da TPA foram contrastadas com as encontradas nos seus respectivos solos adjacentes. De forma geral, os resultados demonstraram morte generalizada das linhagens suscetíveis e não apenas, a formação de um halo azul ao redor da levedura testada como produtora de micotoxina. No sítio Hatahara a espécie *D. nepalensis*, da TPA, demonstrou-se capaz de impedir o crescimento da espécie *Rhodotorula mucilaginosa* (Figura 7). No sítio Caldeirão cultivado, a espécie *P. caribbica*, isolada do solo adjacente, teve seu crescimento inibido por: *Pichia spartinae* e *Williopsis saturnus var subsufficiens* (Figura 7). Vital e colaboradores (2002) demonstraram em seu trabalho, que *Williopsis saturnus* foi capaz de produzir micotoxinas contra outros isolados de solos Amazônicos, e que espécies normalmente produtoras como: *Cr. laurentii* e *R. mucilaginosa* não produziram micotoxinas, sendo estes resultados contatados no presente trabalho também. Estes resultados permitem compreender melhor o porquê algumas espécies

encontradas nos sítios de TPA, talvez não sejam encontradas em seu respectivo solo adjacentes, contudo esta não foi a principal característica para justificar tal discrepância.

D. nepalensis X *R. mucilaginosa* *P. Spartinae* X *P. caribbica* *Williopsis saturnus var subsufficiens* X *P. caribbica*

Figura 7 - Imagens dos testes de antagonismos positivos

Tabela 4 – Consumo de carboidratos de leveduras nos solos adjacentes. Nela, c = consumo em condições aeróbias e f = consumo em condições fermentativas

Espécie	Local	Isolado	Gligose		Sacarose		Galactose		Arabinose		Celobiose		Amido	
			c	f	c	f	c	f	c	f	c	f	c	f
Candida fluviatilis	Caldeirão Capoeira	BCM_ANC -6	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Candida parapsilosis	Caldeirão Capoeira	BCM_ANC -17	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Candida sp.	Caldeirão Capoeira	BCM_ANC -26	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Cryptococcus laurentii	CaldeirãoCultivado	BCM_AC -2	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Cryptococcus sp.	Hatahara	BCM_AH -1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Cryptococcus zeae	Caldeirão Cultivado	BCM_AC-10	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Debaryomyces polymorphus var. africanus	Caldeirão Capoeira	BCM_AND-20	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
Pichia caribbica	Hatahara	BCM_AH -9	+	+	+	+	+	+	±	-	+	-	-	-
Pseudozyma tsukubaensis	Caldeirão Cultivado	BCM_AC-26	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Rhodotorula mucilaginosa	Hatahara	BCM_AH -25	+	-	+	-	+	-	+	-	±	-	-	-

Tabela 5 – Consumo de carboidratos de leveduras nos solos de TPA. Nela, c = consumo em condições aeróbias e f = consumo em condições fermentativas

Espécie	Local	Isolado	Gligose		Sacarose		Galactose		Arabinose		Celobiose		Amido	
			c	f	c	f	c	f	c	f	c	f	c	f
Candida aaseri	Hatahara	BCM_TH-9	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Candida sp	Caldeirão Cultivado	BMC_TC -2	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Cryptococcus terrestris	Hatahara	BCM_TH - 4	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	±	-
Debaryomeces nepalensis	Hatahara	BCM_TH- 8	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
Hanseniaspora opuntiae	Caldeirão Capoeria	BCM_TNC-5	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Issatchenkia terricola	Hatahara	BCM_TH- 9	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pichia manshurica	Caldeirão Cultivado	BMC_TC -15	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pichia rhodanensis	Hatahara	BCM_TH - 30	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
Pichia spartinae	Caldeirão Cultivado	BMC_TC -18	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharomycopsis crataegensis	Hatahara	BCM_TH - 35	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sporidiobolus sp.	Hatahara	BCM_TH - 38	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Williopsis saturnus var subsufficiens	Caldeirão Cultivado	BMC_TC -30	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Pseudozyma hubeiensis	Caldeirão Cultivado	BCM_TC-21	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Rhodotorula dairenensis	Hatahara	BCM_TH34	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.3.2.2 Identificação molecular dos isolados

Os isolados foram seqüenciados nas suas regiões D1/D2 do fragmento 26S do rDNA e posteriormente comparados no *GenBank do National Center for Biotechnology Information* (*NCBI)* utilizando a análise de *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* (ALTSCHUL et al, 1990), sendo seus resultados de *e-value*, máxima identidade e número de bases distintas demonstrados no Apêndice A. A partir destes resultados e de recentes trabalhos de filogenia com leveduras (FELL *et al., 2000*; KUTZMAN; ROBNETT, 1998; KUTZMAN; SUZUKI, 2010), um total de 13 árvores filogenéticas foram construídas, permitindo a identificação das espécies presentes nos solos de TPA e adjacência dos sítios estudados.

No estudo filogenético do gênero *Saccharomycopsis*, foram obtidos 3 isolados, oriundos da Terra Preta do sítio Hatahara. Estes apresentaram uma separação confiável, com altos valores de repetição nos ramos da árvore proposta, quando comparadas a outras sequências de referência, obtidas nos bancos de dados (Figura 8). Além disso, na análise por *BLAST*, os isolados apresentaram uma similaridade de apenas 98% e um número mínimo de 9 bases distintas, sendo destas 4 *gaps* quando comparadas com a sequência referência *Saccharomycopsis crataegensis* (EU057555). Estes resultados sugerem a possibilidade de inferir a respeito de uma possível nova espécie, visto que diferenças superiores a 6 pb permitem propor estudos adicionais de bioquímica, morfologia e o sequênciamento de outras regiões se necessário (KURTZMAN, 2006; KURTZMAN; ROBNETT, 1999).

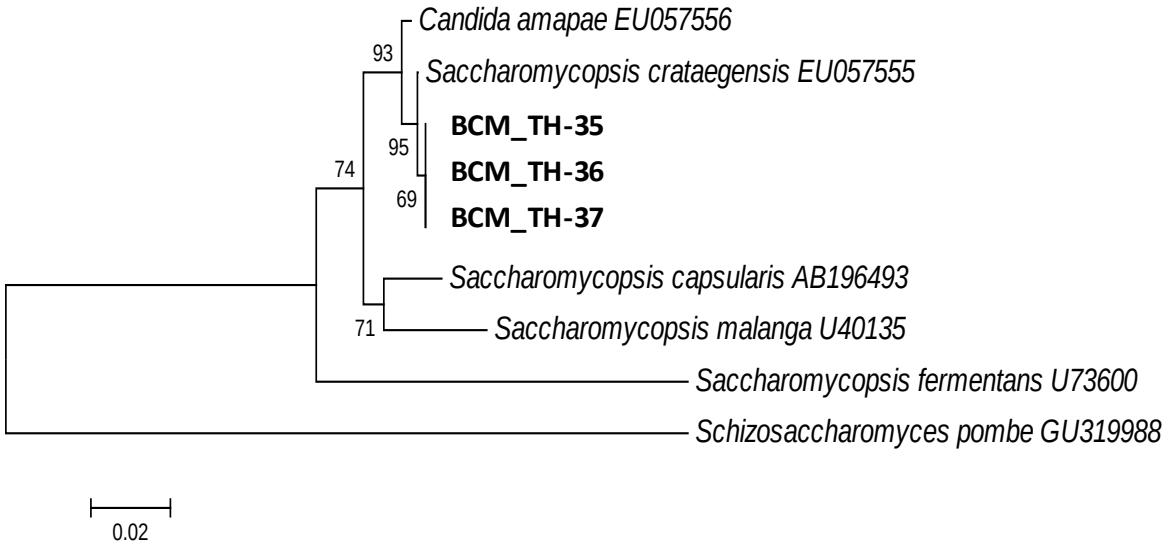


Figura 8 - Árvore filogenética do gênero *Saccharomycopsis* obtida a partir da análise de Neighbor-Joining, usando o método de Jukes-Cantor como matriz de distância evolucionária. A confiabilidade entre os ramos foi calculada pelo método de Bootstrap, num total de 1000 réplicas. A sequência de *Schizosaccharomyces pombe* foi adotada como grupo externo

Na análise do clado *Pichia anomala,* foram obtidos 6 isolados, oriundos do sítio Caldeirão cultivado do solo de Terra Preta, pertencentes a espécie *Williopsis saturnus var subsufficiens* (EF550318) com altos valores de confiança entre seus ramos da árvores filogenética (Figura 9), 99% de similaridade e uma diferença máxima de 2 bases, quando comparadas por *BLAST* com a sequência referência. Também, neste mesmo clado, um isolado oriundo do sítio Hatahara do solo de TPA, pertencente à espécie de *Pichia rhodanensis* EF550325 apresentou alta confiabilidade na sua árvore filogenética (Figura 9), uma similaridade de 99% e uma diferença máxima de 3 bases com a sua sequência referência.

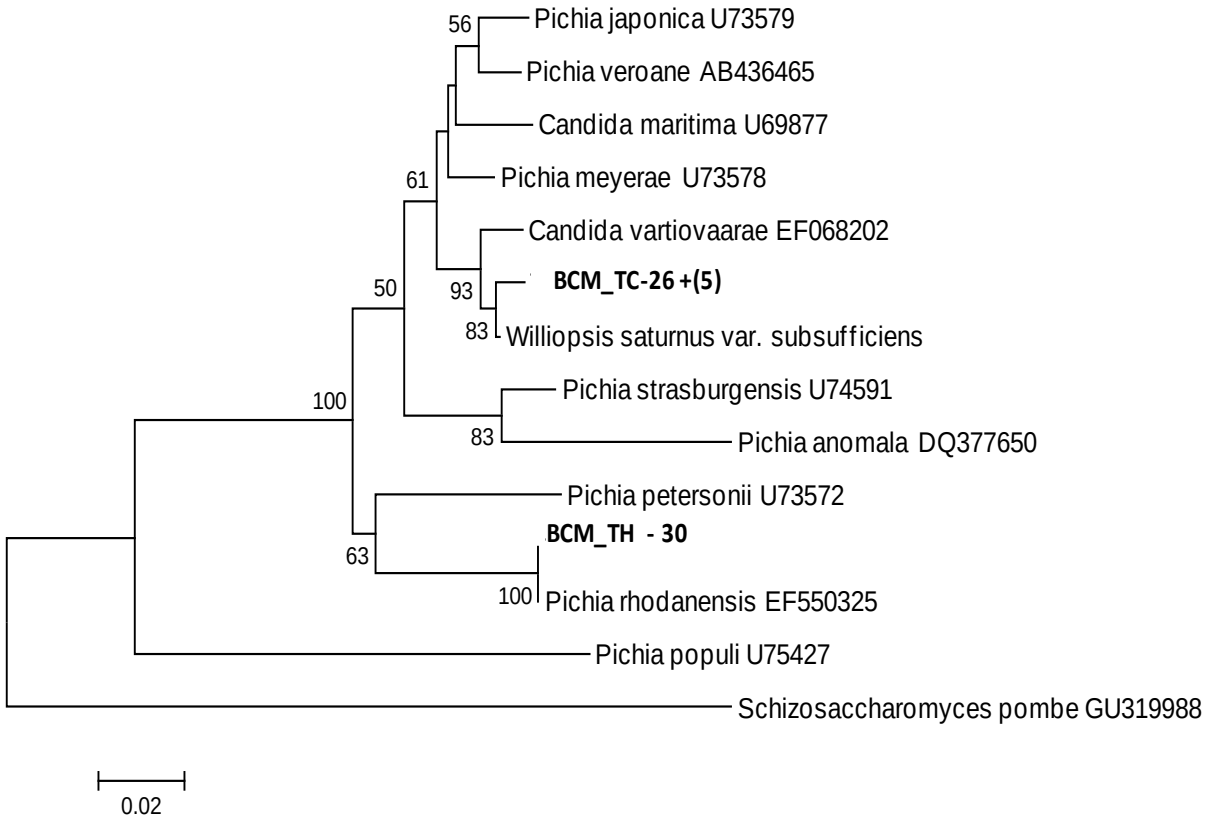


Figura 9 - Árvore filogenética do clado *Pichia anomala* obtida a partir da análise de Neighbor-Joining, usando o método de Jukes-Cantor como matriz de distância evolucionária. A confiabilidade entre os ramos foi calculada pelo método de Bootstrap, num total de 1000 réplicas. A sequência de *Schizosaccharomyces pombe* foi adotada como grupo externo

Um total de 14 isoaldos, originários do solo adjacente do sítio Caldeirão Capoeira, foram identificados como: *Candida fluviatilis* U45717, com uma alta confiança em seus ramos da árvore filogenética, uma similaridades de 99% e uma diferença máxima de 3 bases da sequência referência, sendo estes dados demonstrados na figura 10.

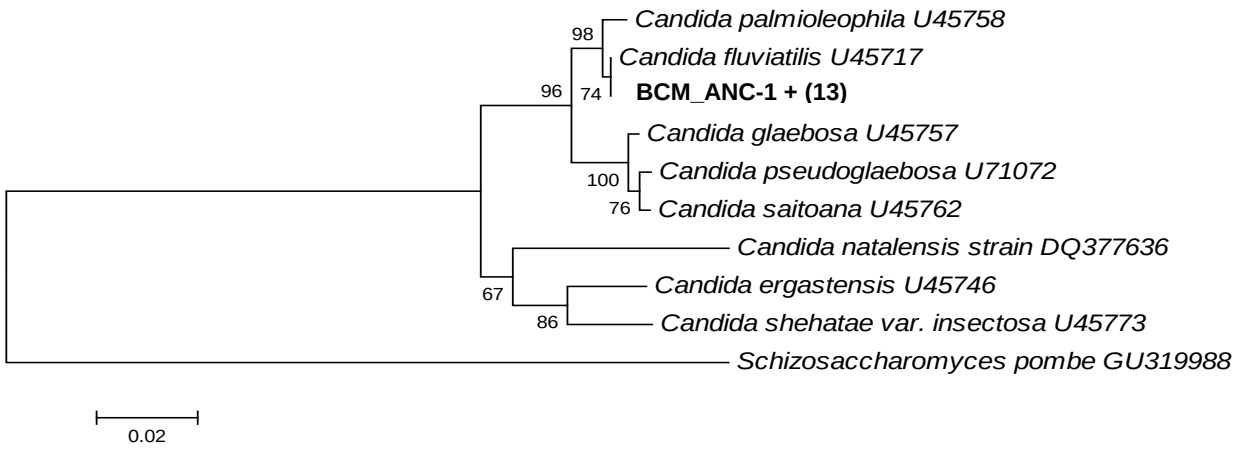


Figura 10 - Árvore filogenética da espécie *Candida fluviatilis* obtida a partir da análise de Neighbor-Joining, usando o método de Jukes-Cantor como matriz de distância evolucionária. A confiabilidade entre os ramos foi calculada pelo método de Bootstrap, num total de 1000 réplicas. A sequência de *Schizosaccharomyces pombe* foi adotada como grupo externo.

Recentemente, Kurtzman e Suzuki (2010) propuseram a incorporação de algumas espécies como: *Candida maltosa, C. parapsilosis, C. sojae, C. albicans* e *C. lodderae* ao gênero *Lodderomyces* a partir de resultados obtidos em análises filogenéticas combinando as regiões: D1/D2 da subunidade maior (*LSU*) e a subunidade menor (*SSU*) completa, ambos do gene rRNA. Dentre os isolados, dois deles provenientes do solo Adjacente do sítio Caldeirão não cultivado, foram identificados como a espécie *Candia parapsilosis (Lodderomyces parapsilosis)* U45754, tanto pela árvore filogenética apresentada (Figura 11), como na análise de *BLAST*, com uma similaridade de 99% e uma diferença máxima de 4 bases. O isolado BCM_ANC13, oriundo do solo Adjacente do sítio Caldeirão Capoeira, foi identificado como pertencente à espécie *Candida orthopsilosis* FJ432622, com altas similaridades na árvore filogenética (Figura 11), não ocorrendo nenhuma base distinta da sequência referência. Apesar de estar ausente no trabalho proposto por Kurtzman e Suzuki (2010), esta espécie apresentou-se no mesmo ramo de *C. parapsilosis* indicando a possibilidade de pertencer ao novo gênero proposto, necessitando de estudos adicionais com o seqüenciamento completo da subunidadde menor (SSU) do gene de rRNA. Outros dois isolados, oriundos da Terra Preta do sítio Caldeirão cultivado, apresentaram-se semelhantes à espécie *Candida maltosa (Lodderomyces maltosa)* U45745, com uma separação altamente significativa em seus ramos na árvore filogenética (Figura 11) e uma diferença mínima de 6 bases (2%), sendo destas 3 gaps, quando comparados a sequência referência. Estes resultados permitem propor

posteriores estudos moleculares, bioquímicos e morfológicos a respeito de uma possível nova espécie (KURTZMAN, 2006; KURTZMAN; ROBNETT, 1998).

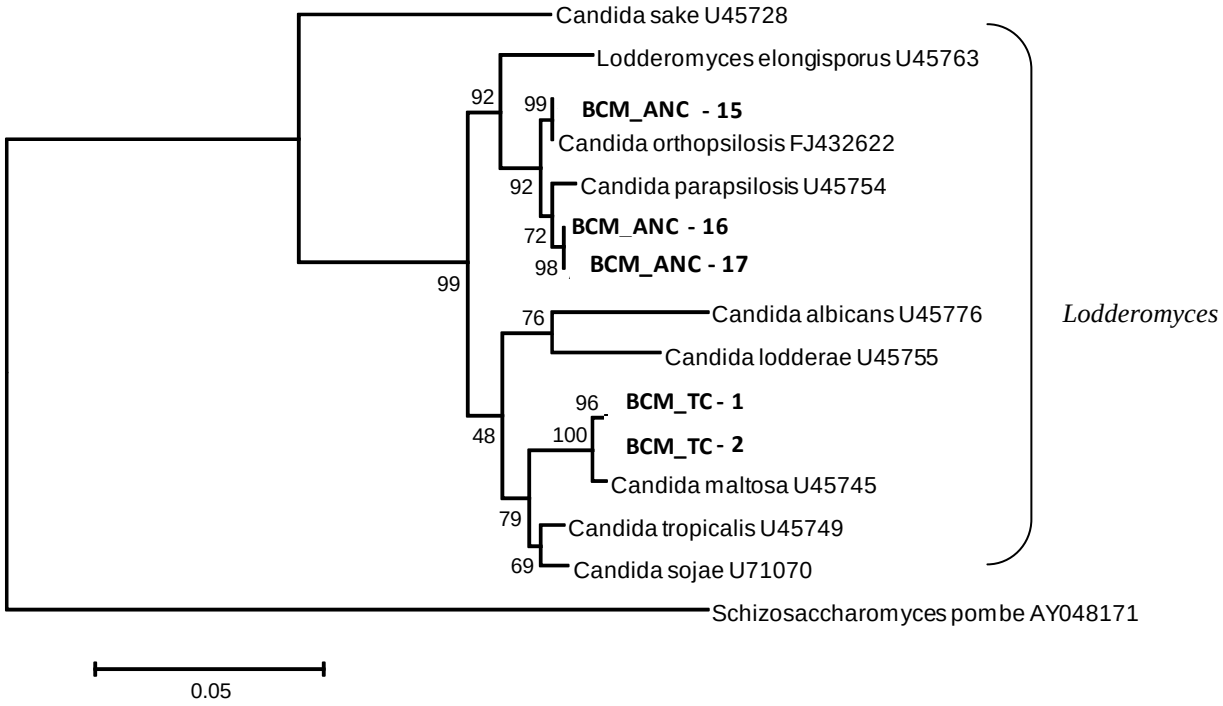


Figura 11 - Árvore filogenética do gênero *Lodderomyces* obtida a partir da análise de Neighbor-Joining, usando o método de Jukes-Cantor como matriz de distância evolucionária. A confiabilidade entre os ramos foi calculada pelo método de Bootstrap, num total de 1000 réplicas. A sequência de *Schizosaccharomyces pombe* foi adotada como grupo externo.

No estudo filogenético dos clados *Debaryomyces hansenii / D. polymorphus* (Figura 12), foram obtidos dois isolados, oriundos da TPA do sítio Hatahara, pertencentes à espécie *Debaryomyces nepalensis* FJ986612, com uma alta confiabilidade nos ramos da árvore filogenética, uma similaridade de 99% e diferença máxima de duas bases da sequência referência, na análise por *BLAST*. Outros 5 isolados, oriundos do sítio Caldeirão Capoeira do solo adjacente, apresentaram alta reprodutibilidade em seu ramo na árvore filogenética e uma similaridade de 100% com a espécie *D. polymorphus var africanus*, a qual foi proposta, recentemente, como pertencente ao gênero *Schwanniomyces* (KURTZMAN; SUZUKI, 2010).

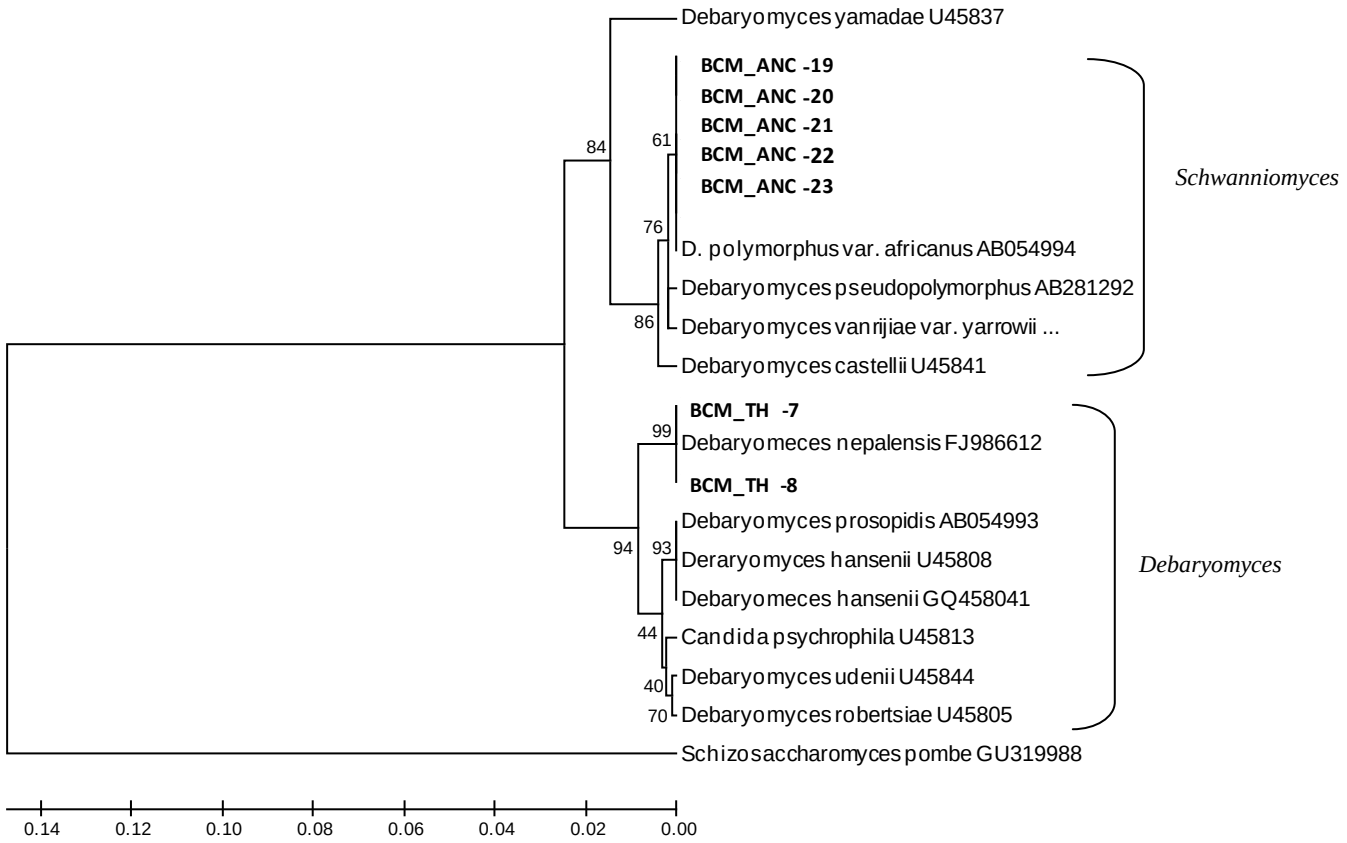


Figura 12 - Árvore filogenética das espécies *Debaryomyces hansenii / D. polymorphus* obtida a partir da análise de Neighbor-Joining, usando o método de Jukes-Cantor como matriz de distância evolucionária. A confiabilidade entre os ramos foi calculada pelo método de Bootstrap, num total de 1000 réplicas. A sequência de *Schizosaccharomyces pombe* foi adotada como grupo externo.

Um total 9 isolados, oriundos do Sítio Caldeirão Cultivado, foram identificados como pertencentes à espécie *Pichia spartinae* AB499025, com uma boa confiabilidade nos ramos de sua árvore filogenética (Figura 13) e uma similaridade de 100% com a sua sequência referência. Recentemente, esta espécie foi proposta como membro de um novo gênero chamado *Scheffersomyces* e apresentou maior confiabilidade nos ramos da sua árvore com as análises efetuadas conjuntamente com as regiões *LSU* e *SSU* do gene de rRNA (KURTZMAN; SUZUKI, 2010).

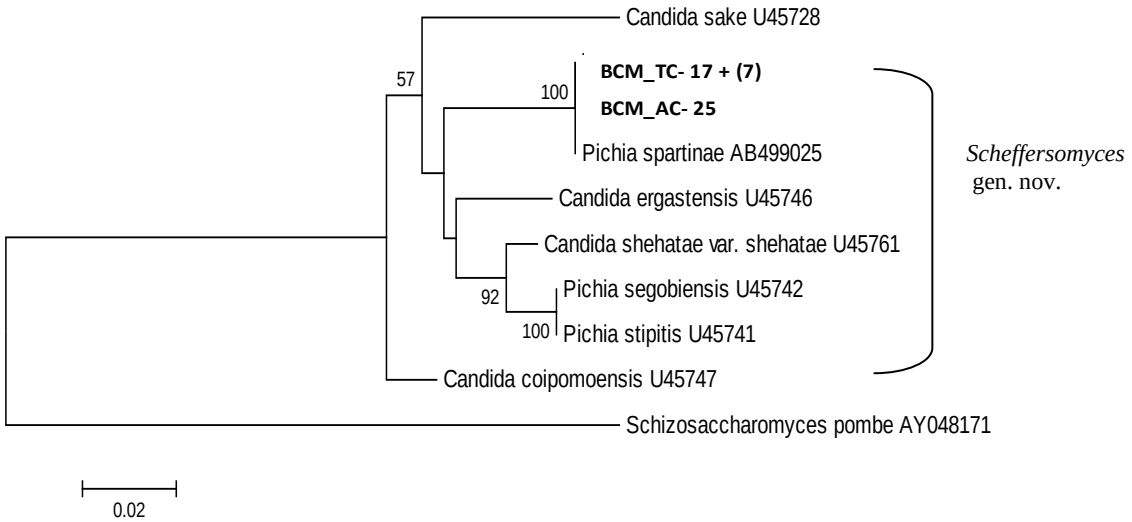


Figura 13- Árvore filogenética da espécie *Pichia spartinae* obtida a partir da análise de Neighbor-Joining, usando o método de Jukes-Cantor como matriz de distância evolucionária. A confiabilidade entre os ramos foi calculada pelo método de Bootstrap, num total de 1000 réplicas. A sequência de *Schizosaccharomyces pombe* foi adotada como grupo externo.

No estudo das espécies *Pichia guilliermondii / P. caribbica*, que recentemente foram propostas suas alterações para o novo gênero *Meyerozyma* (KURTZMAN; SUZUKI, 2010), um total de 17 isolados, oriundos do sítio de Hatahara e Caldeirão ambos do solo adjacente, apresentaram baixos valores de confiabilidade em seus ramos, o que inviabilizou a identificação (Figura 14). Comparando por *BLAST* as sequências dos isolados com *Pichia caribbica* EU348786, ocorreu uma similaridade de 100%. Contudo, a diferenciação destas duas espécies do gênero *Meyerozyma* não foi evidente, uma vez que, a comparação com *P. guilliermondii* U457009 apresentou uma similaridade de a 99% e 3 bases distintas, sendo os dados demonstrados na tabela 8. Dificuldades semelhantes também foram relatadas por Vaughan-Martini et al. (2005), quando descreveram a proposta da nova espécie *Pichia caribbica* e constataram uma diferença mínima, na sequência de 26S da região D1/D2, quando comparadas com *P. guilliermondii*, propondo a necessidade de estudos filogenéticos com mais de um gene para estas espécies.

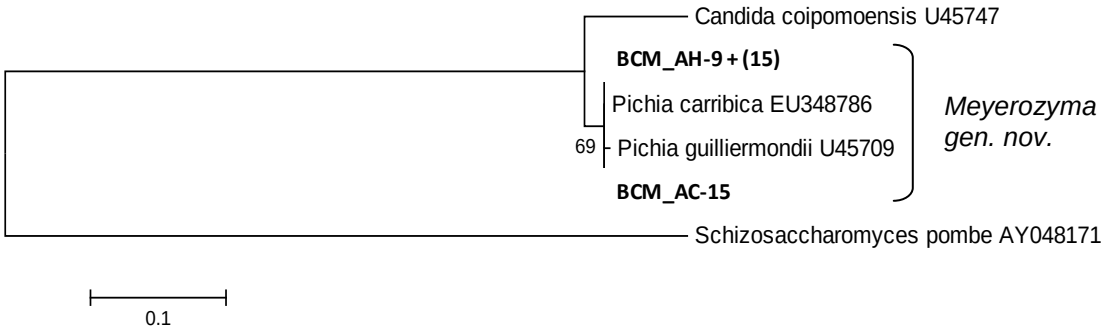


Figura 14 - Árvore filogenética das espécies *Pichia guilliermondii / Pichia caribbica* obtida a partir da análise de Neighbor-Joining, usando o método de Jukes-Cantor como matriz de distância evolucionária. A confiabilidade entre os ramos foi calculada pelo método de Bootstrap, num total de 1000 réplicas. A sequência de *Schizosaccharomyces pombe* foi adotada como grupo externo.

Na análise filogenética do gênero *Yamadazyma*, no qual recentemente foram inseridas novas espécies (KURTZMAN, SUZUKI, 2010), houve novas dificuldades em identificar 14 isolados, originários do sítio Caldeirão Capoeira e 2 isolados, oriundos ao sítio Hatahara, devido às baixas confiabilidades entre os ramos da árvore gerada (Figura 15). Analisando a mesma região do rDNA, Kurtzman e Robnett (1998), também, encontraram baixos valores de repetição entre os ramos da sua árvore proposta para o mesmo clado, especialmente, na separação das espécies de *Pichia mexicana, Candida aaserii* e *C. insectorium* (KURTZMAN; ROBNETT, 1998). Isto ocorreu, provavelmente, devido a alta similaridade na região D1/D2 para as espécies deste novo gênero, necessitando a construção de árvores com sequência de genes adicionais como a região *SSU* do rRNA. Quando comparadas por *BLAST*, ocorreu uma identificação dos dois da TPA como pertencentes a espécie de *C. aaserii*, com uma similaridade de 99% e 3 bases distintas. Além disso, os 14 isolados, do sítio Caldeirão, apresentaram uma similaridade inferior a 98% e um número mínimo de 8 bases diferentes, sendo destas 1 gap, quando comparadas à sequência de *Candida conglobata U45789*, indicando a necessidade de estudos adicionais: com outras regiões do genoma, bioquímicos e morfológicos, objetivando identificar a qual espécie pertencem estes isolados com uma maior confiabilidade (KURTZMAN, 2006; KURTZMAN; SUZUKI, 2010).

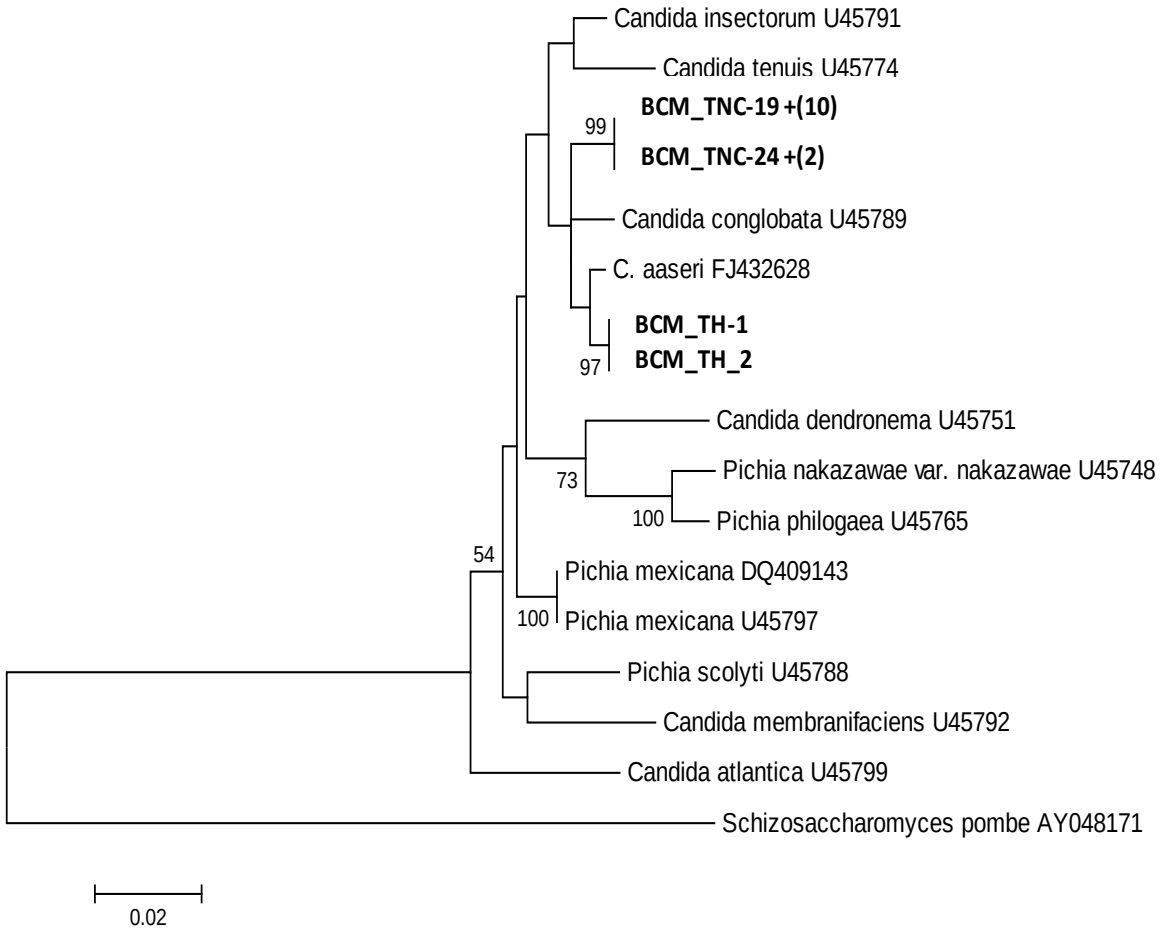


Figura 15 - Árvore filogenética do gênero *Yamadazyma* obtida a partir da análise de Neighbor-Joining, usando o método de Jukes-Cantor como matriz de distância evolucionária. A confiabilidade entre os ramos foi calculada pelo método de Bootstrap, num total de 1000 réplicas. . A sequência de *Schizosaccharomyces pombe* foi adotada como grupo externo.

No clado filogenético de *Saccharomyces*, 10 isolados, oriundos da Terra Preta do sítio Caldeirão, foram identificados com pertencentes à espécie *Hanseniaspora opuntiae* FM180536, com uma alta confiabilidade nos ramos de sua árvore filogenética (Figura 16) e uma similaridade de 100% com a sequência referência. Neste mesmo clado, 3 isolados, oriundos do sítio Caldeirão, foram identificados como a espécie *Hanseniaspora occidentalis* EU268638, apresentando altas taxas de repetições em seus ramos (Figura 16), uma similaridade mínima de 99% e um número máximo de 2 bases distintas.

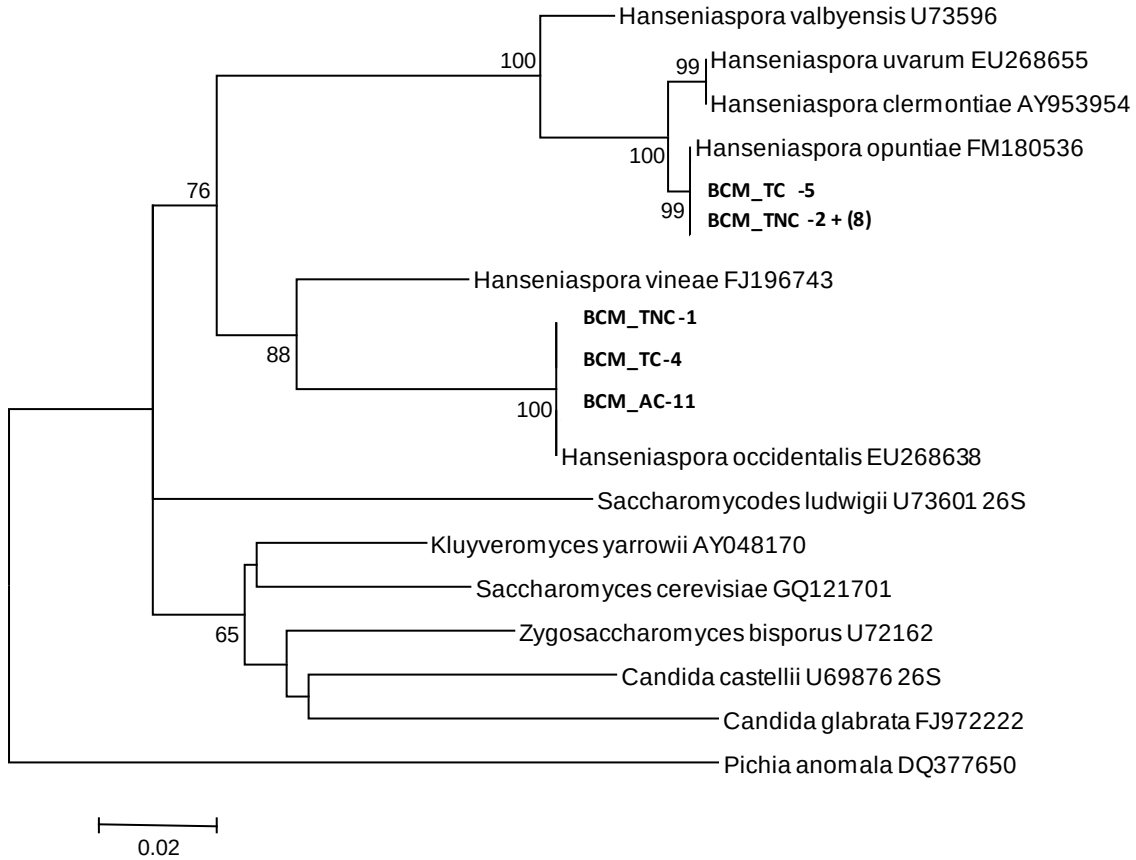


Figura 16 - Árvore filogenética do clado *Saccharomyces* obtida a partir da análise de Neighbor-Joining, usando o método de Jukes-Cantor como matriz de distância evolucionária. A confiabilidade entre os ramos foi calculada pelo método de Bootstrap, num total de 1000 réplicas. A sequência de *Schizosaccharomyces pombe* foi adotada como grupo externo.

No estudo dos gêneros *Pichia* / *Issatchenkia*, foram identificados 31 isolados, oriundos dos sítios Hatahara e Caldeirão, pertencentes à espécie *Issatchenkia terricola* EF550233, com uma alta confiabilidade dos seus ramos na sua árvore filogenética (Figura 17), uma similaridade mínima de 99% e um número máximo de 2 bases distintas da sequência referência, quando comparadas por análise de *BLAST*. Também, foram identificados 20 isolados provenientes do sítio Caldeirão cultivado como membros da espécie *Pichia manshurica* FM180542, sendo os dados confiáveis nos ramos de sua árvore (Figura 17) e uma similaridade mínima de 99% com uma diferença máxima de uma base da sequência referência.

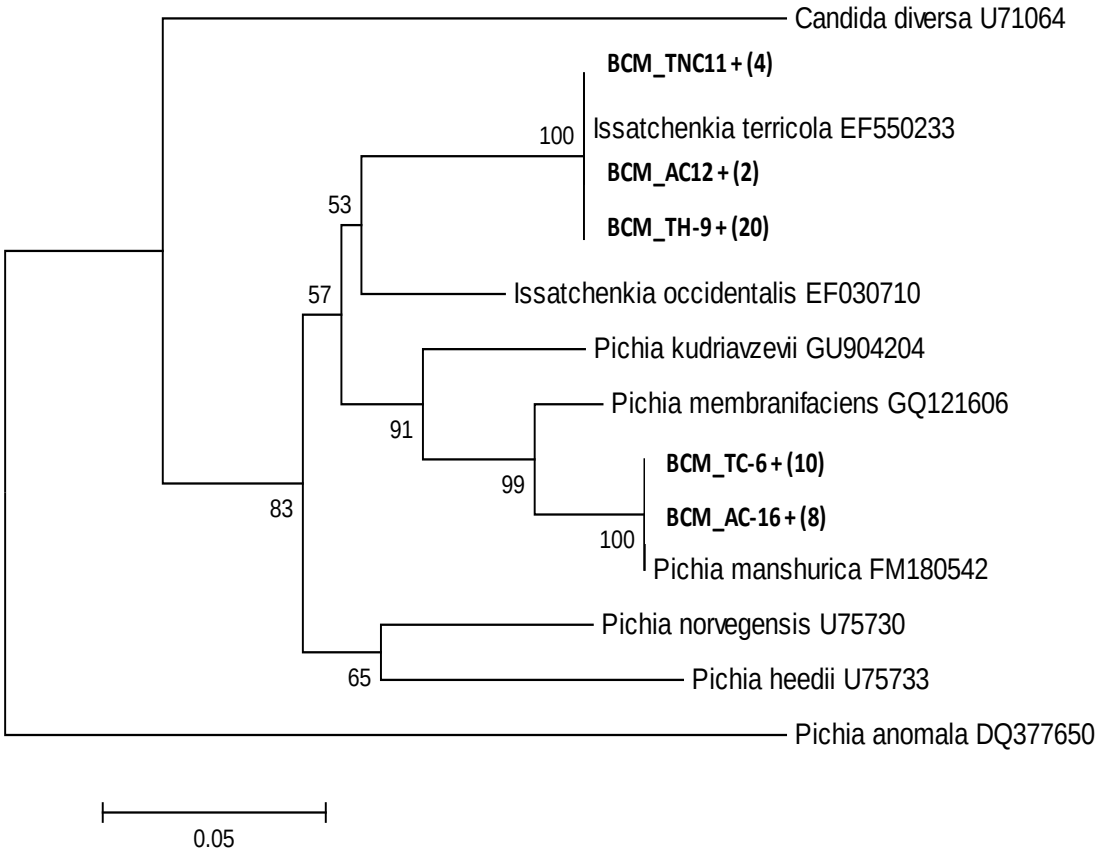


Figura 17 - Árvore filogenética dos gêneros *Pichia/ Issatchenkia* obtida a partir da análise de Neighbor-Joining, usando o método de Jukes-Cantor como matriz de distância evolucionária. A confiabilidade entre os ramos foi calculada pelo método de Bootstrap, num total de 1000 réplicas. A sequência de *Pichia anomala* foi adotada como grupo externo.

Dentre as leveduras isoladas do filo Basidiomicetos, a árvore filogenética do gênero *Cryptococcus* apresentou 17 isolados, provenientes dos dois sítios estudados, pertencentes à espécie *Cryptococcus laurentii* AY315663; 3 isolados, do sítio Hatahara, identificados como *C. terrestris* EF599104 e um isolados, do latossolo do sítio Caldeirão cultivado, pertencente a espécie *C. zeae* AM748533; todos com alta confiabilidade em seus ramos na árvore filogenética (Figura 18) e similaridades mínimas de 99%, com no máximo 2 bases diferentes da sequência referência. Além disso, foram encontrados 2 isolados, originários do sítio Hatahara, que apresentaram uma significativa separação com as espécies *C. cf. taibaiensis* FJ7443602 *e C. heveanensis* AF406890 em seus respectivos ramos da árvore filogenética (Figura 18). Na análise por *BLAST*, ambos os isolados foram confirmados com uma similaridade 87% e 96%, respectivamente, demonstrando a possibilidade de estes serem duas novas espécies e necessitando de estudos moleculares, fisiológicos e morfológicos mais detalhados para tal constatação (FELL et al., 2000; KURTZMAN, 2006).

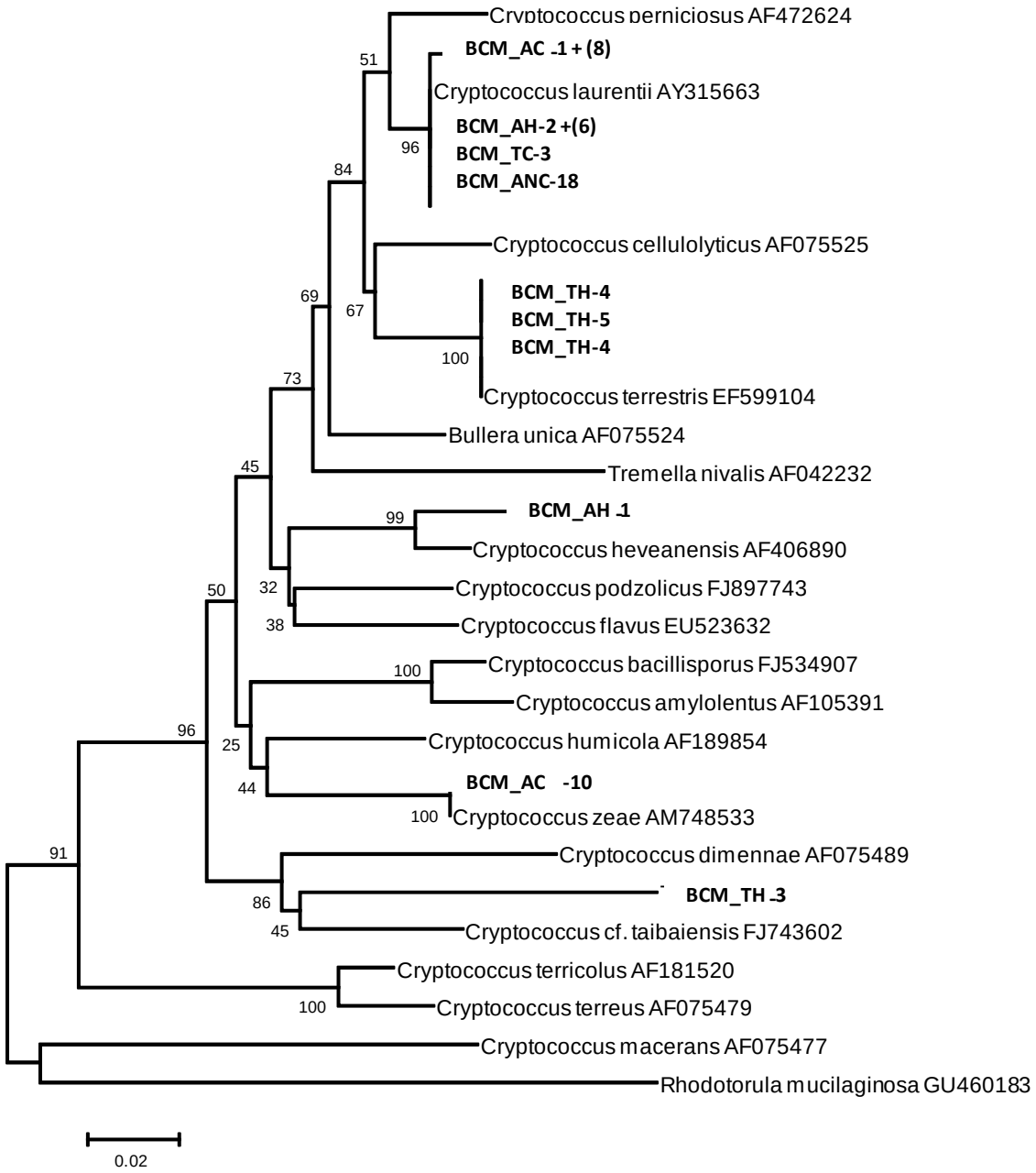


Figura 18 - Árvore filogenética do gênero *Cryptococcus* obtida a partir da análise de Neighbor-Joining, usando o método de Jukes-Cantor como matriz de distância evolucionária. A confiabilidade entre os ramos foi calculada pelo método de Bootstrap, num total de 1000 réplicas. A sequência de *Rhodotorula mucilaginosa* foi adotada como grupo externo.

No clado Sporidiobololus, 6 isolados, do sítio Hatahara, sendo 3 para cada uma das duas espécies, foram identificados como: *Rhodotorula mucilaginosa* EF174503 *e R. darienensis* FM212448, sendo, ambos com alta reprodutibilidade nos ramos de sua árvore filogenética (Figura 19), uma similaridade superior a 99% e um número máximo de 3 bases distintas a sua respectiva sequência referência. Demais, o isolado BCM_TH-30 apresentou

uma diferenciação da espécie *Sporidiobolus pararoseus* AM748549, no qual, separou-se pela árvore filogenética (Figura 19) e apresentou uma similaridade de 98% com 8 bases distintas, sendo destas 5 *gaps*. Estes resultados sugerem a possibilidade de uma nova espécie, necessitando de maiores estudos: moleculares, bioquímicos e morfológicos (FELL et. al., 2000; KURTZMAN, 2006).

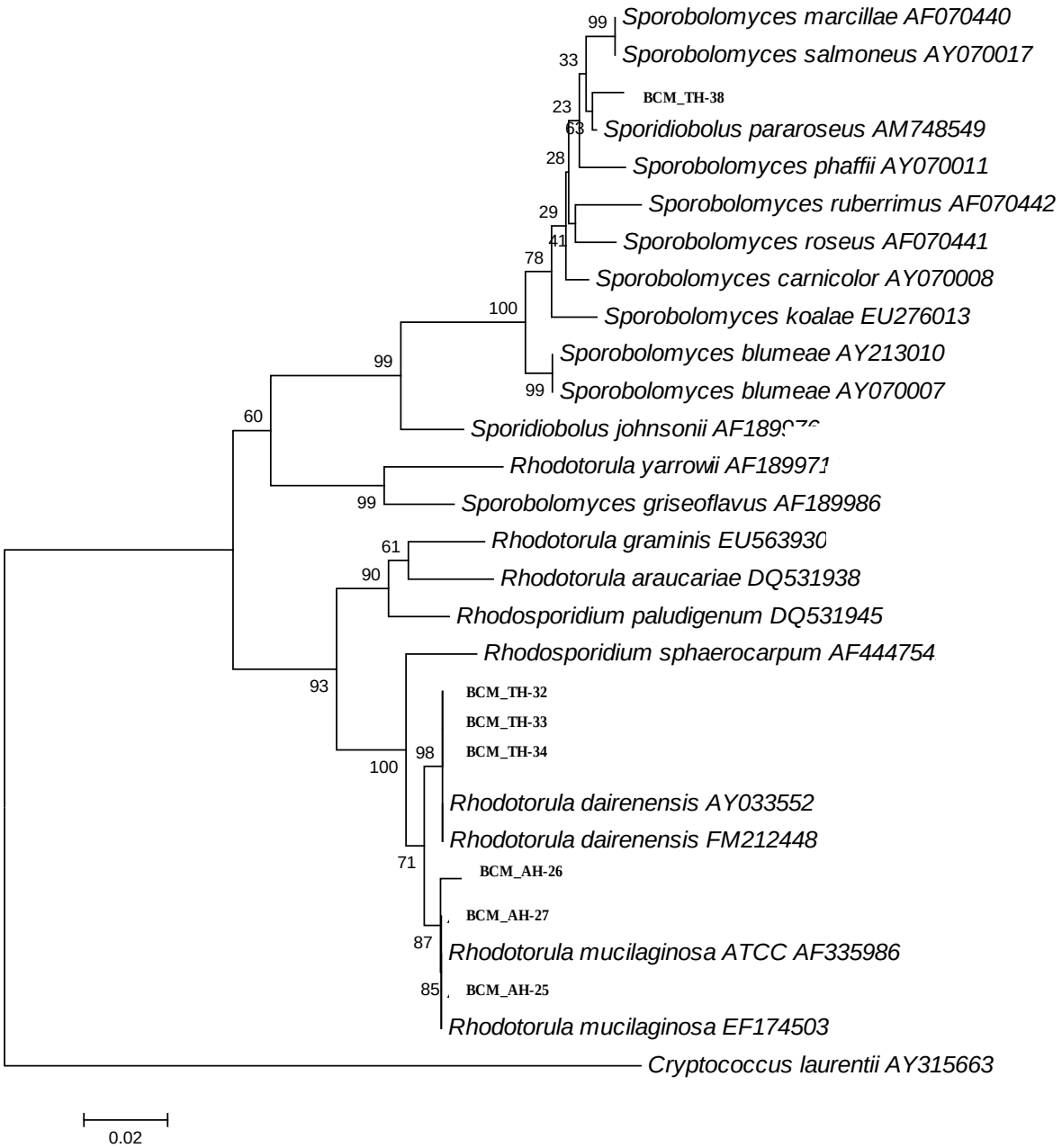


Figura 19 - Árvore filogenética do clado *Sporidiobolus* obtida a partir da análise de Neighbor-Joining, usando o método de Jukes-Cantor como matriz de distância evolucionária. A confiabilidade entre os ramos foi calculada pelo método de Bootstrap, num total de 1000 réplicas. . A sequência de *Cryptococcus laurentii* foi adotada como grupo externo.

Por último, a árvore filogenética do gênero *Pseudozyma*, apresentou 3 isolados, originários do sítio Hatahara e Caldeirão Cultivado, como pertencentes as espécies: *Pseudozyma aphidis* AJ235303, *P. tsukubaensis* AJ235297 e *P. hubeiensis* DQ008953, com uma similaridade mínima de 99% e uma confiabilidade razoável nos ramos de sua árvore filogenética (Figura 20). Outros trabalhos, com o gênero *Pseudozyma*, demonstraram a necessidade do sequenciamento da região ITS do rRNA, seguido da construção de uma árvore com ambas as sequências a fim de se obter resultados com maiores confiabilidades (WANG; JIA; BAI, 2006).

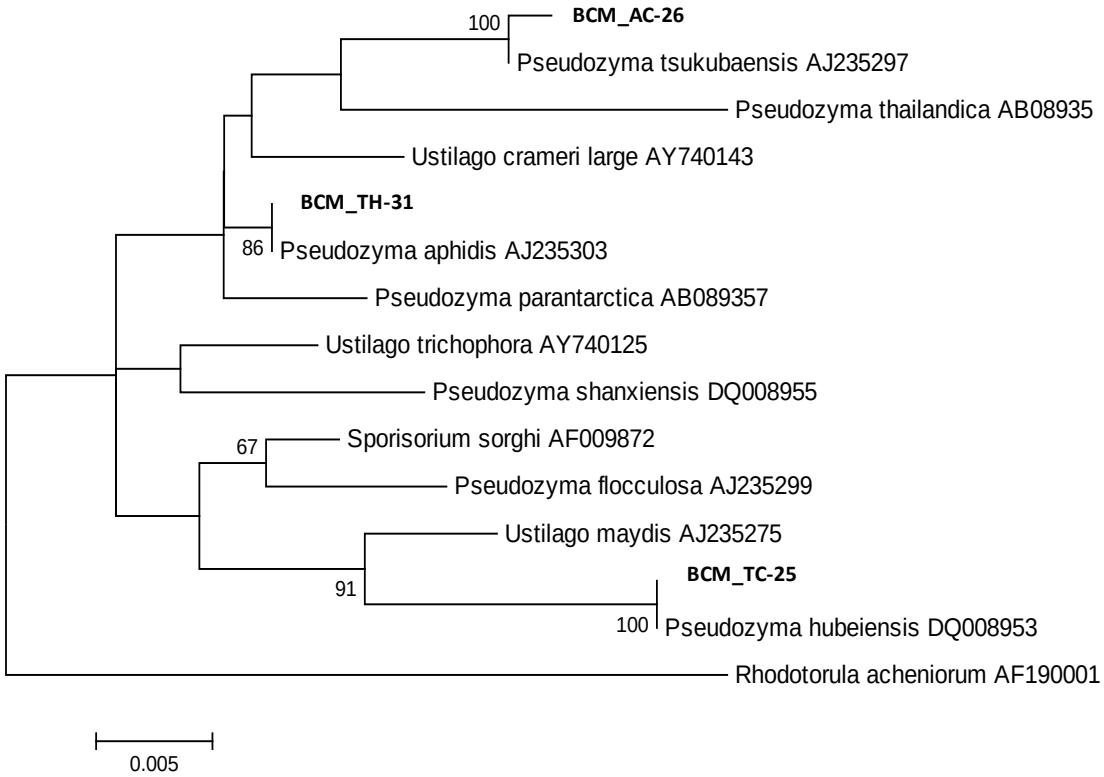


Figura 20 - Árvore filogenética do gênero *Pseudozyma* obtida a partir da análise de Neighbor-Joining, usando o método de Jukes-Cantor como matriz de distância evolucionária. A confiabilidade entre os ramos foi calculada pelo método de Bootstrap, num total de 1000 réplicas. . A sequência de *Rhodotorula acheniorum* foi adotada como grupo externo.

A proposta de definição de novas espécies embasou-se em uma variação superior a seis nucleotídeos não contíguos do espaço D1/D2 da região 26S do gene de rRNA. Esta metodologia obteve resultados similares a re-associação de DNA, apresentando como vantagens a rapidez e a simplicidade na sua elaboração (KURTZMAN, 2006). Esta metodologia conjuntamente com a elaboração de bancos de dados, com sequências desta, para

leveduras pertencentes aos filos dos Ascomicetos (KURTZMAN; ROBNETT, 1998) e Basidiomicetos (FELL et al., 2000), permitiram Kurtzman (2006, p. 67) afirmar: “estes trabalhos promoveram a disponibilização de um banco de dados universal para a rápida identificação de espécies conhecidas, a descoberta de novas espécies, e uma colocação filogenética inicial de novas espécies.” Contudo, o mesmo autor afirma que são necessários cuidados com estudos de uma única região de rDNA, e que para afirmações conclusivas a respeito de novas espécies devem se seguidas do sequenciamento de regiões adicionais como SSU completa do rRNA, para Ascomicetos (KURTZMAN, 2010), e ITS1 e ITS4 para Basidiomicetos (SCORZETTI et al., 2002; WANG; JIA; BAI, 2006).

Estas análises demonstraram a existência de 28 espécies distintas de um total de 172 isolados. Destas, seis delas são, possivelmente, leveduras cultiváveis de ambiente amazônico desconhecidas, sendo: quatro do solo de TPA, um do solo adjacente e uma comum aos dois locais. Estudos anteriores com bactérias comparando outros sítios de Terra Preta com seus solos adjacentes, pelas metodologias de isolamento e bibliotecas do gene 16S de rRNA, demonstram um maior número de espécies desconhecidas nos solos de TPA, caracterizando sua particularidade microbiológica quando comparada aos demais solos amazônicos (KIM et. al., 2007; O´NEILL et. al., 2009).

2.3.2.3 Estrutura da comunidade de leveduras cultiváveis

Com os resultados obtidos pelas identificações moleculares dos isolados, duas tabelas, uma com o sítio Hatahara e outra com o sítio Caldeirão, foram elaboradas com o número de isolados, nas respectivas espécies encontradas, em cada solo de TPA e seu relativo adjacente (Tabela 6 e 7). Posteriormente, análises multivariadas de *nMDS* e *Cluster*, baseados na presença e ausência destas espécies nos diferentes ambientes, foram efetuadas para elucidar possíveis diferenças na composição da comunidade de leveduras cultiváveis entre a TPA e seu solo adjacente.

Tabela 6 – Números de isolados, divididos por espécies, encontrados em cada um dos solos estudados do Sítio Hatahara.

Espécies	SOLOS	
	TPA Hatahara	**ADJ Hatahara**
Sporidiobolus pararoseus	1	0
Rhodotorula mucilaginosa	0	3
Rhodotorula dairenensis	3	0
Cryptococcus laurentii	0	6
Cryptococcus terrestris	3	0
Cryptococcus sp. (1)	0	1
Cryptococcus sp (2)	1	0
Pseudozyma aphidis	1	0
Debaryomyces nepalensis	2	0
Pichia caribbica	0	16
Candida aaserii	2	0
Pichia rhodanensis	1	0
Issatchenkia terricola	21	0
Saccharomycopsis crataegensis	3	0
Total de Isolados	38	26
Total de espécies distintas	10	4

Tabela 7 – Números de isolados, divididos por espécies, encontrados em cada um dos solos estudados dos Sítios Caldeirão Capoeira e Caldeirão Cultivado

Espécies	SOLOS			
	TPA Caldeirão Capoeira	**ADJ Caldeirão Capoeira**	**TPA Caldeirão Cultivado**	**ADJ Caldeirão Cultivado**
Cryptococcus laurentii	0	1	1	10
Cryptococcus zeae	0	0	0	1
Pseudozyma tsukubaensis	0	0	0	1
Pseudozyma hubeiensis	0	0	1	0
Candida fluviatilis	0	14	0	0
Candida parapsilosis	0	2	0	0
Candida orthopsilosis	0	1	0	0
Candida sp 1	0	0	2	0
Debaryomyces polymorphus	0	5	0	0
Pichia spartinae	0	0	8	1
Pichia caribbica	0	0	0	1
Yamadazyma sp.	11	3	0	0
Williopsis saturnus	0	0	6	0
Hanseniaspora opuntiae	9	0	1	0
Hanseniaspora occidentalis	1	0	1	1
Pichia manshurica	0	0	11	9
Issatchenkia terricola	5	0	0	3
Total de Isolados	26	26	31	27
Total de espécies distintas	4	6	8	8

Para o sítio Hatahara, o número de espécies presentes no solo de TPA foi superior e nenhuma espécie comum ao solo adjacente foi identificada (Tabela 6 e 7). Resultado semelhante também foi constatado em um estudo da comunidade de bactérias cultiváveis dos sítios Hatahara, Açutuba e Lago grande, no qual a Terra Preta apresentou maiores valores para: o índice de riqueza *CHAO2* e número de famílias distintas quando comparado ao solo adjacente (O´NEILL et al., 2009). Além disso, as análises de *nMDS e Cluster* (Figura 21) demonstraram a separação entre as comunidades de leveduras isoladas da TPA e seu solo adjacente. Estes resultados, possivelmente, podem estar correlacionados as diferenças químicas apresentadas anteriormente, visto que, as mesmas condições de isolamento foram submetidas para todos os solos estudados e não poderiam ocasionar tal discrepância entre as espécies presentes na TPA e em seu solo adjacente.

No sítio Caldeirão Cultivado, ambos os solos apresentaram 8 espécies identificadas (Tabela 6 e 7), sendo 4 destas (*Pichia manshurica, Cryptococcus laurentii, Pichia spartinae* e *Hanseniaspora occidentalis)* comuns. Para a Capoeira, a TPA e seu solo adjacente apresentaram praticamente o mesmo número de espécies (Tabela 6 e 7) e, apenas, uma possível nova espécie do gênero *Yamadazyma* esteve presente em ambos os locais. As análises de *nMDS e Cluster*, juntamente com os outros resultados anteriormente apresentados, corroboraram e demonstram uma maior semelhança, na comunidade de leveduras isoladas, entre a Terra Preta do sítio Caldeirão Cultivado e seu respectivo solo adjacente. No sítio Caldeirão Capoeira, a TPA apresentou-se distinta do seu solo ADJ (Figura 21).

A correlação entre as matrizes dos isolados e da média dos atributos químicos dos solos, obtida a partir do Teste de Mantel, foi de 56,05%, sendo o valor encontrado significativo a 5%. Isto indica que mesmo a partir da metodologia de isolamento seletivo, a qual pode representar baixa resolução da comunidade total de leveduras presentes no solo, os resultados demonstraram possíveis alterações nas estruturas das comunidades entre os solos de Terra Preta e suas adjacências, tendo como exceção, o sítio Caldeirão Cultivado. Contudo, estudos adicionais a partir de técnicas independentes do cultivo podem demonstrar e esclarecer, de forma robusta, a hipótese gerada pela metodologia de isolamento.

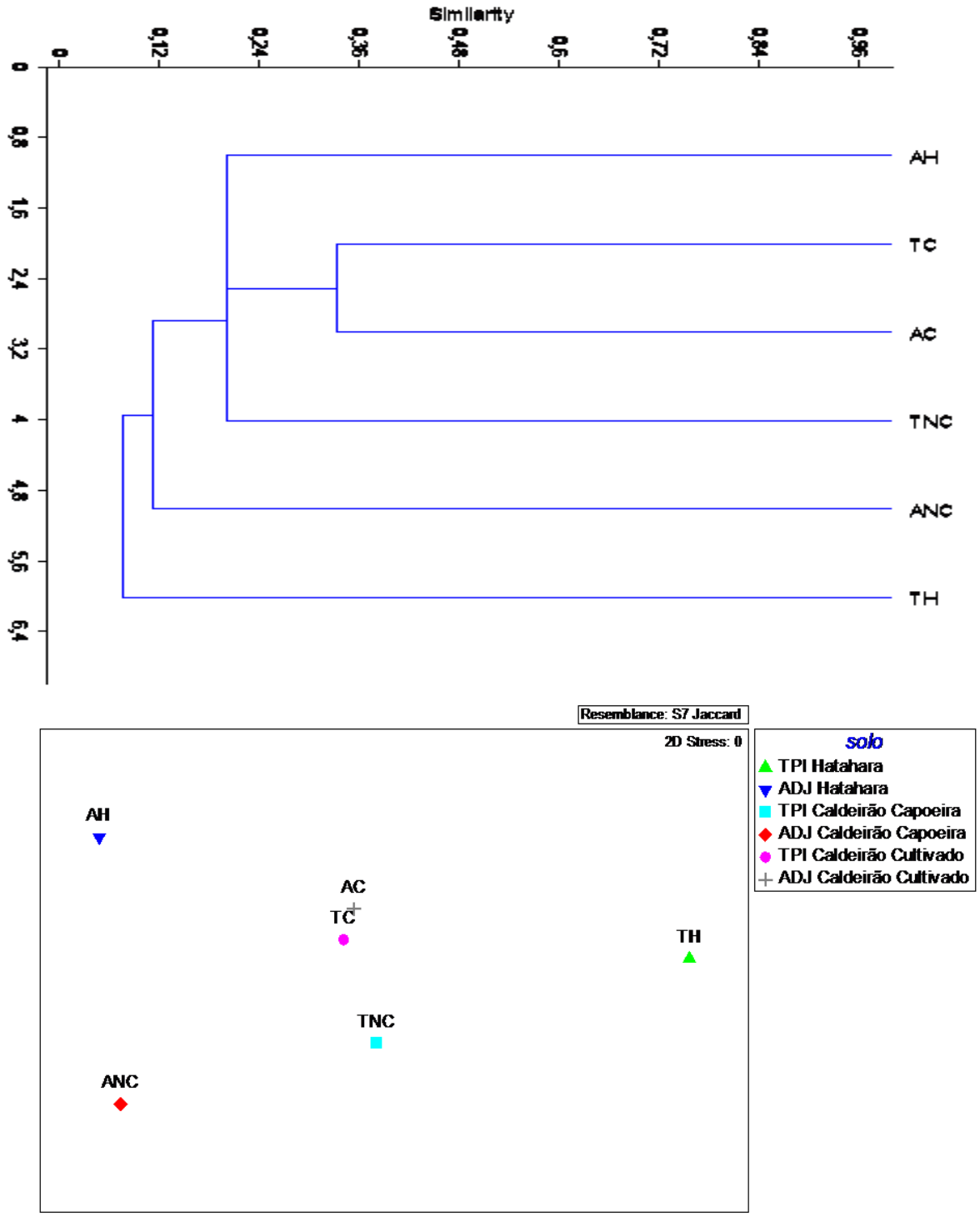


Figura 21 – Análises de *Cluster* e *nMDS* a partir da matriz de presença e ausência das espécies de isolados encontradas em cada ambiente. Os símbolos indicam: TC- TPA do sítio Caldeirão Cultivado, AC- ADJ do sítio Caldeirão Cultivado, TNC – TPA do sítio Caldeirão Capoeira, ANC – ADJ do sítio Caldeirão Capoeira, TH – TPA do sítio Hatahara e AH- ADJ do sítio Hatahara.

Quanto a possíveis funcionalidades das espécies encontradas nos solos adjacentes estudados, *Cryptococcus laurentii* e *Rhodotorula mucilaginosa* foram anteriormente relatadas: em solos amazônicos (VITAL et. al.; 2002), agrícolas (SLÁVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ; 2003b) e de florestas temperadas (SLÁVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ, 2000), caracterizando-as como típicas do ambiente. Suas funcionalidades estão correlacionadas com diversos benefícios para plantas que se apresentem associadas a estas leveduras. Estudos com *C. laurentii* relatam a capacidade de controle biológico de alguns patógenos (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; ZHANG; ZHENG; YU, 2007), aumento na colonização ou no crescimento de hifas de fungos micorrízicos (BOBY; BALAKRISHNA; BAGYARAJ, 2008; SAMPEDRO et. al., 2004) e promoção do crescimento das raízes de *Agathosma betulina* (Berg.) Pillans (CLOETE, et. al. 2009). A espécie *R. mucilaginosa* também apresentou benefícios para as associações com fungos micorrízicos *Glomus mosseae* e *Gigaspora rosae* (BOBY; BALAKRISHNA; BAGYARAJ, 2008; SAMPEDRO et. al., 2004) e demonstrou-se capaz de produzir micotoxinas contra leveduras patogênicas do gênero *Candida*, dentre elas a espécie *Candida parapsilosis*, também encontrada no solo adjacente do sítio Caldeirão (VADKERTIOVÁ; SLÁVIKOVÁ, 2003) .

Para os solos de Terra Preta, a espécie *Issatchenkia terricola*, foi relatada como pertencente à comunidade de leveduras de processos fermentativos para produção: de vinhos (DUARTE et. al., 2009) e polvilho azedo a partir da mandioca (LACERDA et al., 2005). Esta pode estar presente nos solos do sítio Caldeirão cultivado, devido ao plantio da cultura de mandioca, e em solos de TPA do sítio Hatahara, devido à grande quantidade de restos alimentares indígenas provenientes de origem vegetal e ricos em amido. Além disso, um isolado anteriormente identificado como *Issatchenkia sp.*, oriundo de solos amazônicos, demonstrou-se capaz de produzir toxinas contra diversas espécies do gênero *Candida* (VITAL et al., 2002).

No sítio Caldeirão Cultivado, a TPA apresentou a espécie *Williopsis saturnus*, a qual, Nassar et al.(2005) identificaram-na como um endofítico de raiz de milho, capaz de produzir auxinas tanto em condições *in vitro*, como em testes na casa de vegetação. A mesma espécie foi isolada anteriormente em solos amazônicos e apresentou a produção de micotoxinas contra diversas outras leveduras testadas (VITAL et al., 2002).

Espécies do gênero *Pichia* (*P. spartinae*, *P. rhodanensis*), pertencentes na sua maioria ao solo de Terra Preta, demonstraram a capacidade de degradar fitato (NAKAMURA; FUKUHARA; SANO, 2000), provenientes de restos vegetais vegetal, disponibilizando

fósforo (P) para os seres vivos novamente no ambiente. Gummadi e Kumar (2006) demonstraram que *Debaryomyces nepalensis*, isolado de frutos de maçãs podres, apresentou a capacidade degradar pectina e pectato, importantes constituintes de tecidos vegetais. O gênero *Saccharomycopsis* demonstrou ser predador de outras leveduras, principalmente quando associado a altas concentrações de enxofre (LACHANCE et. al., 2000) o qual em ambientes de TPA apresenta,-se elevados.

2.3.3 Estrutura da comunidade de leveduras e fungos filamentosos não cultiváveis

Os resultados obtidos pelos géis de DGGE, a partir da extração do DNA total do solo, demonstraram que a metodologia proposta foi eficiente na amplificação da estrutura de comunidade de leveduras cultiváveis e não cultiváveis. De um total de 17 bandas seqüenciadas, 12 (70,6%) foram identificadas como leveduras e demonstraram uma similaridade superior a 90% com a sequência referência (Tabela 8 e Figura 22). Amplificações de fungos filamentosos em propostas de estudos com leveduras não cultiváveis a partir de amostras ambientais, também foram relatados em um estudo a partir de amostras de água, entre duas comunidades de estuários (GADANHO; SAMPAIO, 2004).

A confirmação de que as metodologias de isolamento e DGGE corroboram na obtenção de dados a respeito da estrutura de comunidades destes solos, foi evidenciada pelas imagens de géis confrontando as amostras ambientais com as principais espécies de isolados obtidas (Figuras 23 e 24), nas quais a presença de alturas similares entre as bandas demonstraram a existência destas leveduras nos diversos ambientes estudados de TPA e solos adjacentes. Além disso, a identificação de algumas *UTOs* como pertencentes às mesmas espécies encontradas pelo isolamento, como: *Issatchenkia terrícola* e *Saccharomycopsis crataegensis*, encontradas nas amostras dos solos de TPAs e *Cryptococcus laurentii* presente no solo adjacente do sítio Caldeirão Cultivado (Figura 22), também auxiliaram na obtenção desta confirmação.

Também a análise de DGGE permitiu identificar a presença, no ambiente de Terra Preta a partir do seqüenciamento de suas bandas, espécies do gênero *Trichosporum* que não foram obtidas no isolamento. Estas estão intimamente relacionadas à degradação de lignina (SLÁVICOVÁ; KOSICOVÁ; MICOLÁSOVÁ; 2002) e outros compostos tóxicos como: óleo diesel, fenol e metanol (DERITO; MADSEN, 2009; KASZYCKI et. al., 2006), o que demonstra a importância funcional deste gênero nos solos.

Tabela 8 – Identificação das bandas de DGGE clonadas, sequenciadas e analisadas por *BLAST*. Valores em brancos de Similaridade / *e-value* e Nº de referência indicam que a sequência apresentou similaridade com mais de uma espécie do mesmo gênero.

Banda	**Espécie**	**Similaridade/e-value**	**Nº de referência**
1	*Glomus sp*	89% / 1E-62	AJ271925
2	*Umbelopsis gibbrerispora*	81% /5E-25	AB090297
3	*Candida zeylanoides*	94% / 4E-41	EU327106
4	*Saccharomycopsis crataegensis*	91% / 5E-49	EU057555
5	*Aplosporella sp*	86% / 8E-16	EU931110
6	*Cryptococcus cf. podzolicus*	99% 8E-65	FJ743620
7	*Pichia anomala*	93% / 7,00E-71	FJ435228
8	*Trichosporum porosum*	99% / 9,00E-96	AF308656
9	*Trichosporum sp*	-	-
10	*Rhadosporidium paudigenum*	96% / 2E-96	AF514863
11	*Cryptococcus cf. podzolicus*	97% / 2,00E-82	FJ743620
12	*Issatchenkia terricola*	98% / 6E-93	EU441898
13	*Mortierella globalpina*	99% / 6e-88	AB517932
14	*Trichosporon lignicola*	99% / 7E-88	EU194447
15	*Trichosporon weringae*	100% / 1E-58	EU289367
16	*Cryptococcus laurentii*	94% / 4E-80	DQ377662
17a	*Phoma sojicola*	98% / 4E-62	EU167568
17b	*Acaulospora paulinae*	91% / 5E-62	AY639265

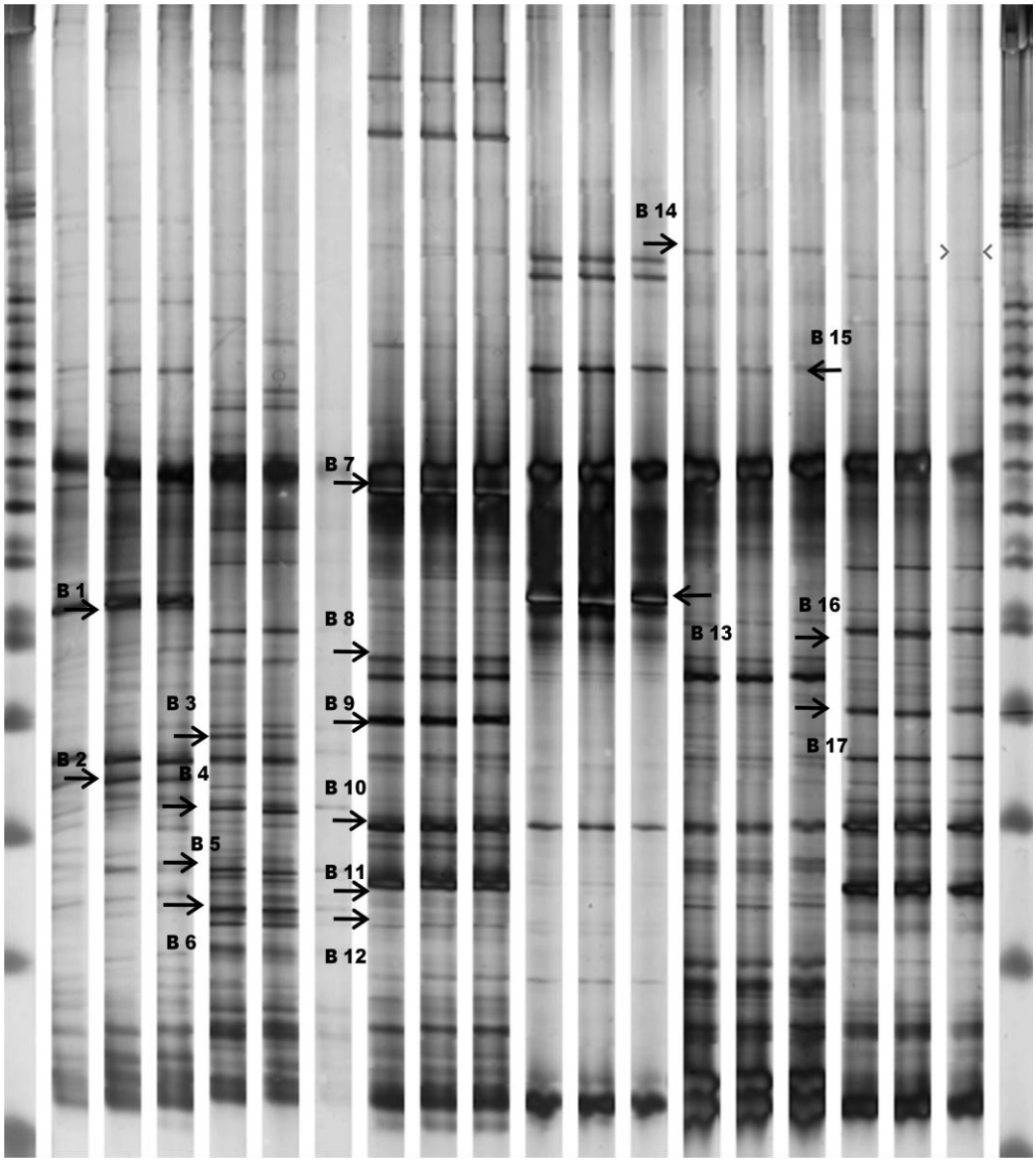
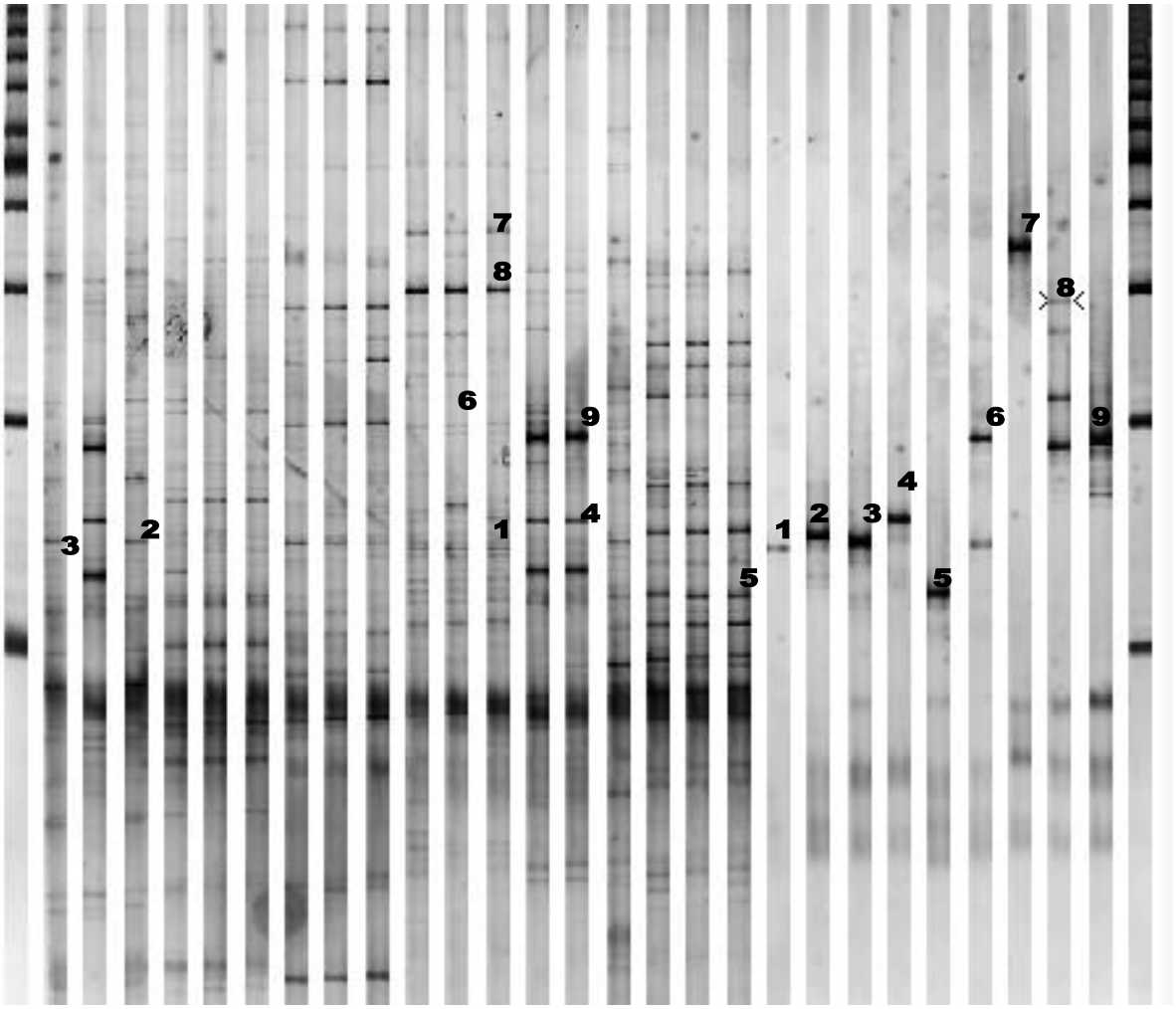


Figura 22 – Imagem do gel de DGGE demonstrando a localização das bandas recortadas, clonadas, seqüenciadas, e identificadas por *BLAST*. Na foto, a ordem das amostras em triplicatas são: ADJ Hatahara, TPA Hatahara, TPA Capoeira, ADJ Capoeira, TPA cultivado, ADJ Cultivado



nº Banda	Espécies	Ambiente
1	*C. fluviatilis*	ADJ Capoeira
2	*C. maltosa*	TPI Cultivado
3	*P. spartinae*	TPI Cultivado
4	*D. nepalensis*	TPI Hatahara
5	*P. caribbica*	ADJ Hatahara
6	*P. mexicana*	ADJ Capoeira
7	*H. opuntiae*	TPI Capoeira
8	*H. occidentalis*	TPI Capoeira

Legenda:

TH- TPI Hatahara

TNC- TPI Caldeirão Capoeira

TC- TPI Caldeirão Cultivado

AH – Latossolo Hatahara

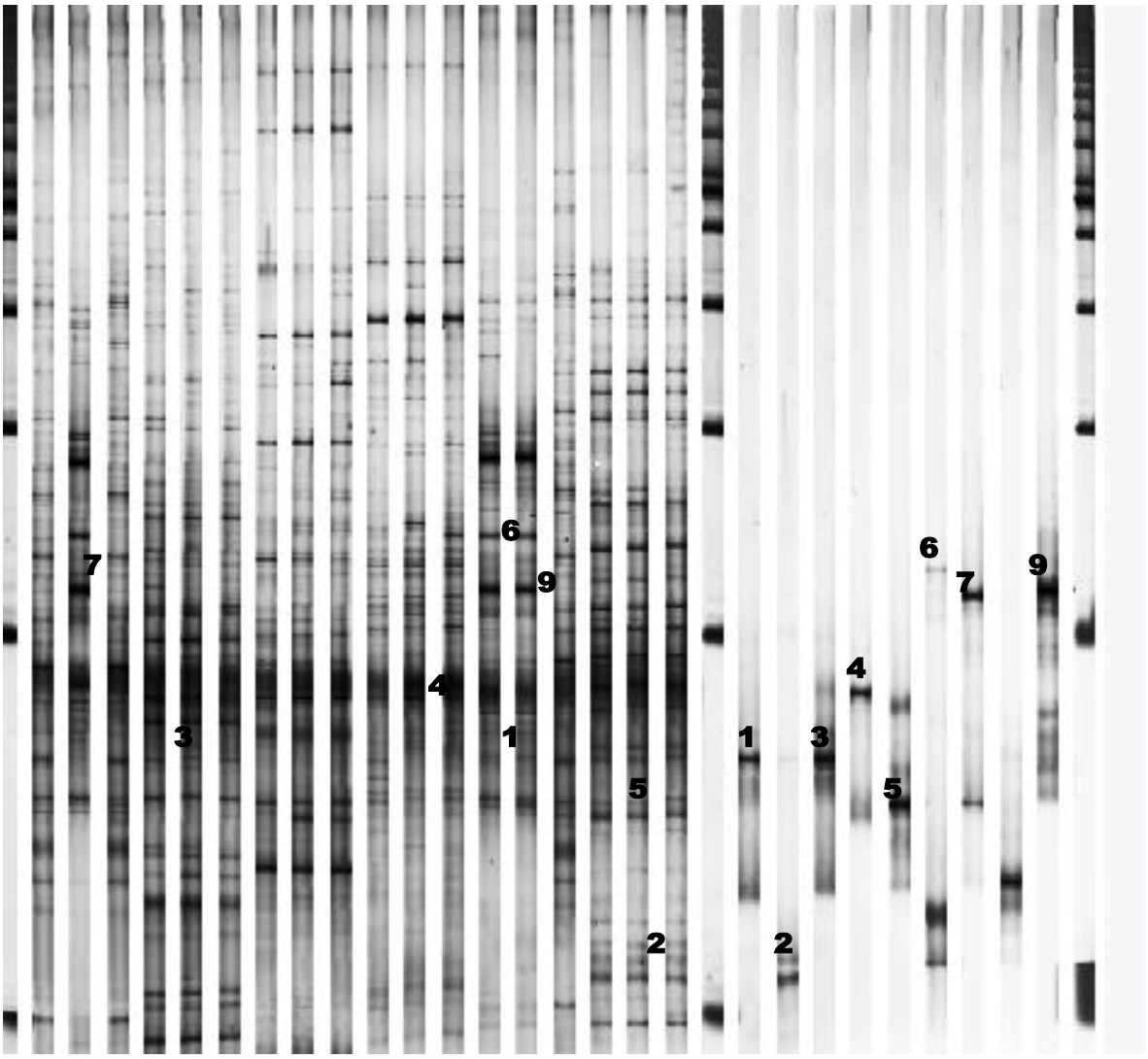
ANC- Latossolo Caldeirão Capoeira

AC- Latossolo Caldeirão Cultivado

Sequência das amostras ambientais:

TCa-THc-TCc-ACa-ACb-ACc-TNCa-TNCb-TNCc-ANCa-ANCb-ANCc-THa-THb- TCb-AHa-AHb-AHc.

Figura 23 – Primeiro gel de DGGE comparando com os isolados.



nº Banda	Espécies	Ambiente
1	*I. terricola*	TPI hatahara
2	*Cr. heveanensis*	ADJ Hatahara
3	*C. laurentii*	ADJ Cultivado
4	*Cr. Zaea*	ADJ Cultivado
5	*R. mucilaginosa*	ADJ Hatahara
6	*Cr. Taibarensis*	TPI Hatahara
7	*Cr. Terrestris*	TPI Hatahara
9	*C. aaseri*	TPI Hatahara

Legenda:

TH-TPI Hatahara

TNC-TPI Caldeirão Capoeira

TC-TPI Caldeirão Cultivado

AH – Latossolo Hatahara

ANC-Latossolo Caldeirão Capoeira

AC-Latossolo Caldeirão Cultivado

Sequência das amostras ambientais:

TCa-THc-TCc-ACa-ACb-ACc-TNCa-TNCb-TNCc-ANCa-ANCb-ANCc-THa-THb-TCb-AHa-AHb-AHc.

Figura 24 – Segundo gel de DGGE comparando com os isolados.

Analisando todos os sítios conjuntamente, foi evidenciada, pelas análises de *MDS* e *Cluster*, uma diferenciação na estrutura de comunidades de leveduras e fungos filamentosos dos solos de TPA, quando comparados as suas respectivas adjacências (Figura 25.). Na análise de ANOSIM, os agrupamentos estabelecidos confirmaram as diferenças na comunidade de leveduras entre os solos adjacentes e de TPA, sendo estas, distintas, porém com algumas semelhanças entre as leveduras dos dois solos ($0,5 < R < 0,75$) para a maioria das comparações. Ocorreram exceções como a TPA do sítio Caldeirão, a qual foi totalmente distinta do solo adjacente do sítio Hatahara, e a TPA do sítio Hatahara, que foi distinta de sua adjacência, porem apresentando valores de *p* superiores a 5 %, o que inviabilizou conclusões mais exatas (Tabela 9). Além disso, os solos do Sítio Hatahara foram diferentes com algumas semelhanças, quando comparados ao solo de mesma composição do sítio Caldeirão (Tabela 9). Buscando-se obter informações a respeito das correlações existentes entre a matriz de atributos químicos e a de UTOs, geradas pela análise de DGGE, o Teste de Mantel foi efetuado apresentando uma correlação de 64,64% entre estas, com valores significativos de p inferiores a 5%. Para inferir quais destes atributos químicos dos solos podem estar individualmente relacionados com as diferenças nas estruturas hierárquicas das comunidades apresentadas e para demonstrar a distribuição destas no espaço, uma análise de RDA e o teste de Monte Carlo (499 permutações) foram efetuados (Figura 26), sendo, os atributos químicos: P ($\lambda = 0,22$ e $p = 0,002$), MO ($\lambda = 0,16$ e $p = 0,002$), Al ($\lambda = 0,16$ e $p = 0,012$), SB ($\lambda = 0,14$ e $p = 0,002$), K ($\lambda = 0,09$ e $p = 0,004$), Fe ($\lambda = 0,05$ e $p = 0,008$) e Mg ($\lambda = 0,03$ e $p = 0,032$), significativos para o Teste de Monte Carlo, e os que apresentaram melhor explicabilidade na diferenciação entre os solos estudados, a partir das projeções perpendiculares das amostras sobre os eixos de cada um desses fatores químicos. Para a diferenciação dos solos do sítio Hatahara com os do sítio Caldeirão os atributos químicos P, K e SB foram os mais relevantes. Diferenças nas concentrações de K, Mg para o solo adjacente e a TPA, e MO e P, para a Terra Preta, também foram encontradas nas análises químicas dos solos anteriormente efetuadas. Moreira (2007) estudando a composição química de diversos sítios da Terra Preta, obteve na profundidade de 0-20 cm, no sítio Hatahara, medições de P e K equivalentes a 1093,2 e 183 mg dm^{-3} e no sítio Caldeirão suas concentrações foram 339, 4 e 38 mg dm^{-3}, respectivamente. Estas diferenças entre a composição química dos solos podem ser uma das principais justificativas que contribuam para as distintas composições nas estruturas das comunidades de TPA e adjacência, assim como, entre os sítios Caldeirão e Hatahara. Além disso, a distância geográfica entre os sítios, o tempo e o cultivo praticado nestes locais, podem ter contribuído para estas diferenças apresentadas, visto que, alterações na comunidade de fungos de

rizosfera, devido à agricultura de culturas distintas já foram relatadas anteriormente (COSTA et. al., 2006).

Tabela 9 - Análise de ANOSIM efetuada com o coeficiente de similaridade *Jaccard*. Valores p< 0,05 indicam que a análise é significativa. Os agrupamentos foram estabelecidos da seguinte forma: 1- TPA sítio Hatahara, 2- ADJ do sítio Hatahara, 3- TPAs dos sítios Caldeirão e 4 ADJs dos sítios Caldeirão

Tratamento	ADJ Caldeirão	ADJ Hatahara	TPA Caldeirão	TPA Hatahara
ADJ Caldeirão	-	r= 0,6049 (p=0,02)	r= 0,54 p= (0.002)	r= 0,59 (p=0,02)
ADJ Hatahara	-	-	r= 0,83 (p=0,01)	r= 0,56 (p=0,09)
TPA Caldeirão	-	-	-	r= 0,73 (p=0,01)
TPA Hatahara	-	-	-	-

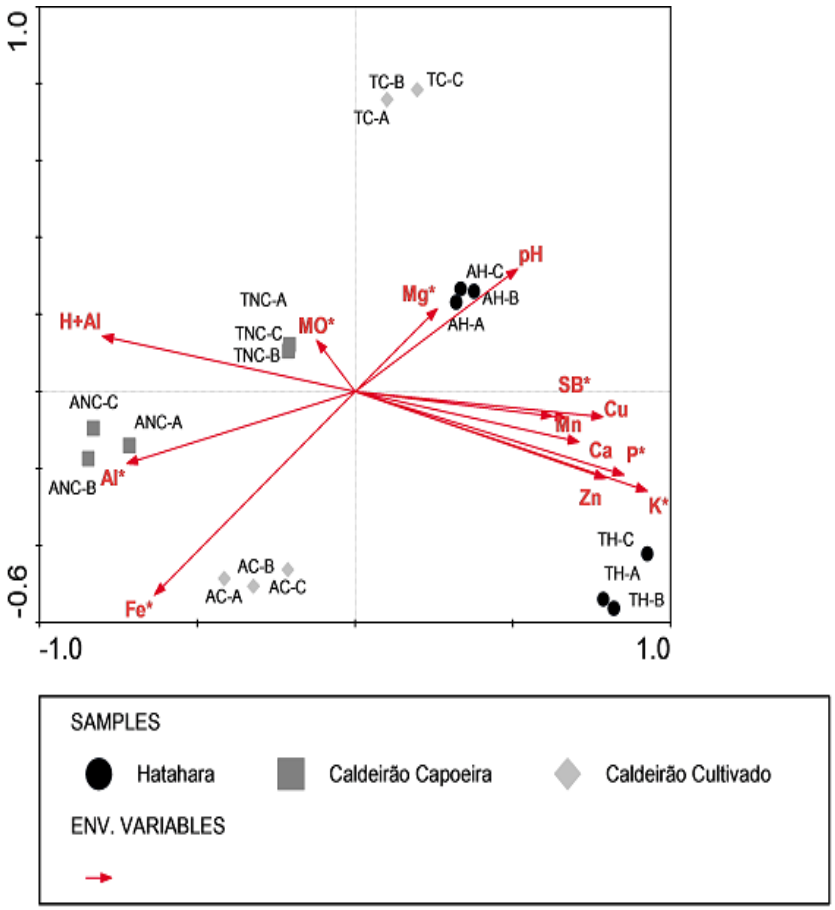


Figura 26 - Análise de Redundância (RDA), com Teste de Monte Carlo efetuando 499 permutações. Os símbolos indicam: TC- TPA do sítio Caldeirão Cultivado, AC- ADJ do sítio Caldeirão Cultivado, TNC – TPA do sítio Caldeirão Capoeira, ANC – ADJ do sítio Caldeirão Capoeira, TH – TPA do sítio Hatahara e AH- ADJ do sítio Hatahara

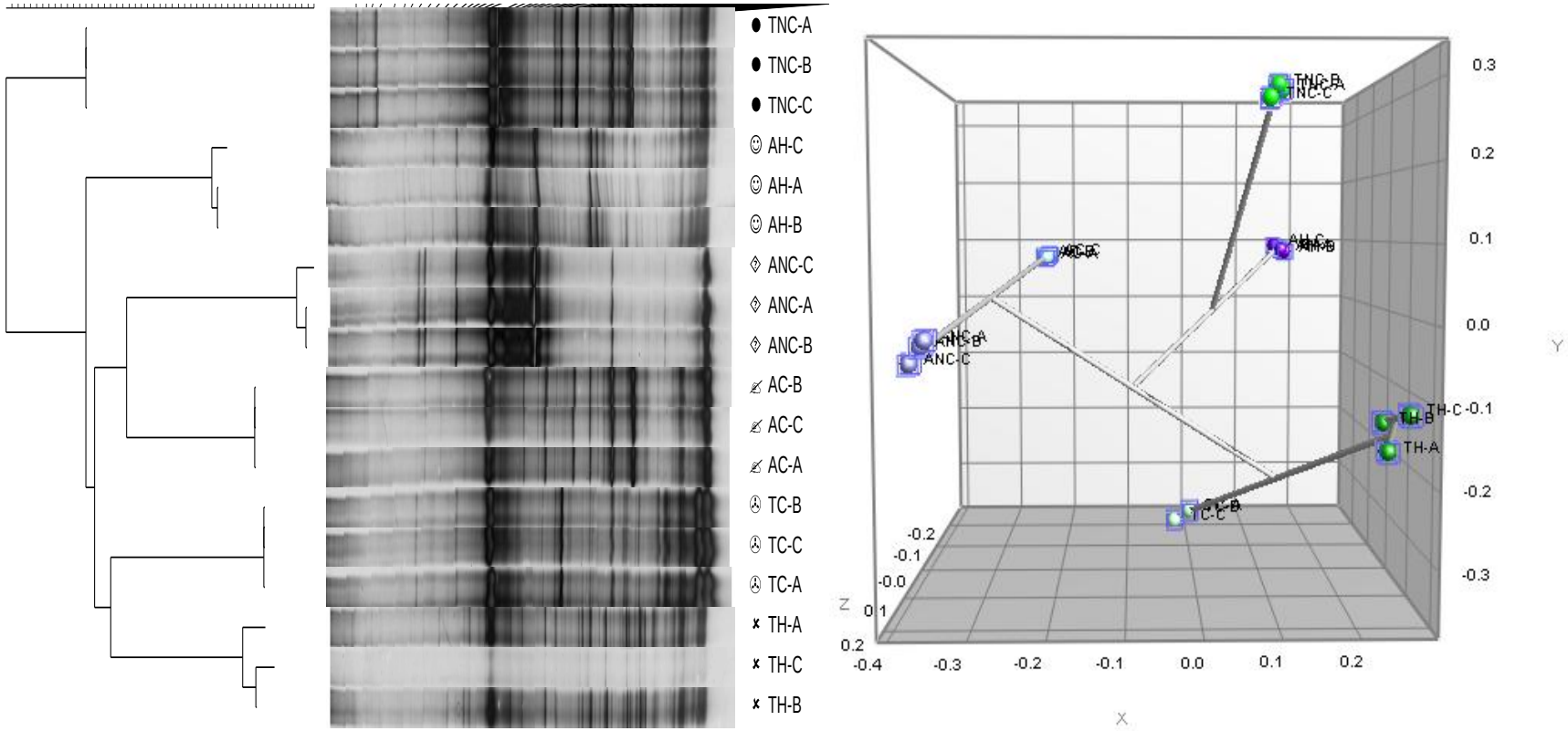


Figura 25- Análise de *Cluster* e de *MDS*, pelo algorítimo *Single Linkage*,. O coefieciente de similaridade para ambas foi o *Jaccard.* Os símbolos indicam: TC- TPA do sítio Caldeirão Cultivado, AC- ADJ do sítio Caldeirão Cultivado, TNC – TPA do sítio Caldeirão Capoeira, ANC – ADJ do sítio Caldeirão Capoeira, TH – TPA do sítio Hatahara e AH- ADJ do sítio Hatahara

Objetivando uma compreensão detalhada entre as diferenças apresentadas em cada um dos locais estudados, estes foram analisados separadamente, e pode-se perceber no sítio Hatahara, pela análise de *Cluster* e *MDS*, diferenças na estrutura de comunidade de leveduras e fungos filamentosos não cultiváveis (Figura 27). Além disso, a TPA apresentou maiores valores, que seu solo adjacente, para: as unidades taxonômicas operacionais (*UTOs*) e os índices: de riqueza *CHAO2* e diversidade *Shannon´s H´* (Tabela 10). Buscando-se obter informações a respeito das correlações existentes entre a matriz de atributos químicos e a de UTOs, geradas pela análise de DGGE, o Teste de Mantel apresentou uma correlação de 99,25%, sendo os valores p significativos e inferiores a 5%. A análise de RDA e o teste de Monte Carlo (499 permutações) foram efetuados, sendo, a variável química SB (λ= 0,83; p<0,002) o fator preponderante para a diferença apresenta ente a Terra Preta e sua adjacência (Figura 28). Recentemente, estudos sobre as comunidade de *Achaea* e bactérias da TPA e solos adjacentes do sítio Hatahara, a partir da metodologia *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP), obtiveram uma maior diversidade para o ambiente de TPA e estruturas diferentes entre as comunidade, sendo pH, Ca e S, para *Archaea*, e MO e P, para bactérias, os principais atributos que justificaram a separação.(NAVARRETE et. al.; 2010; TAKETANI; TSAI, 2010). Estes resultados demonstram diferenças evidentes nas comunidades microbianas de TPA e que estas são influenciadas pelas diferenças nas composições químicas destes solos.

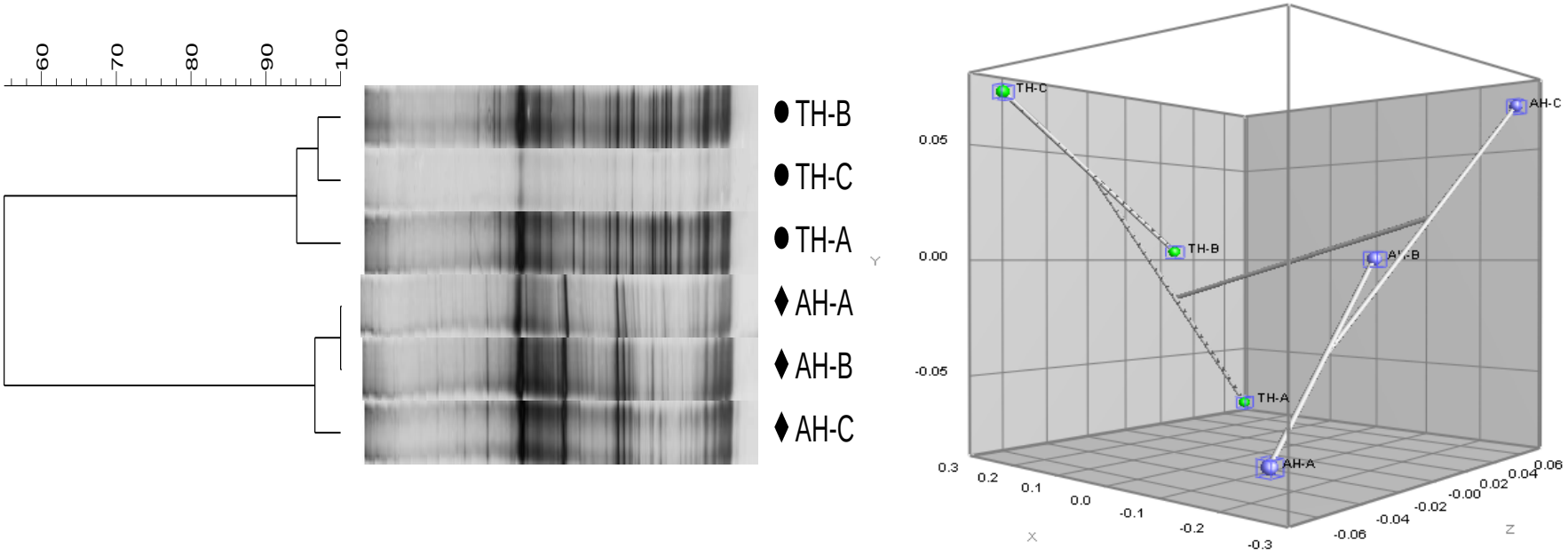


Figura 27 - Análise de Cluster pela metodologia de *Single Linkage*, efetuadas com o coeficiente de similaridade *Jaccard*. Os símbolos indicam: TH- Terra Preta do sítio Hatahara; AH= Solo Adjacente do sítio Hatahara

Tabela 10 - Indices de riquezas e diversidade obtidos a partir da análise de DGGE, para o sítio Hatahara

Solo	***UTOs***	***Shannon´s H´***	***CHAO2***
TPA Hatahara	32 ± 1,33	3,21 ± 0,05	36,6 ± 0,75
ADJ Hatahara	28,33 ± 0,89	2,97 ± 0,04	31,31 ± 0,67

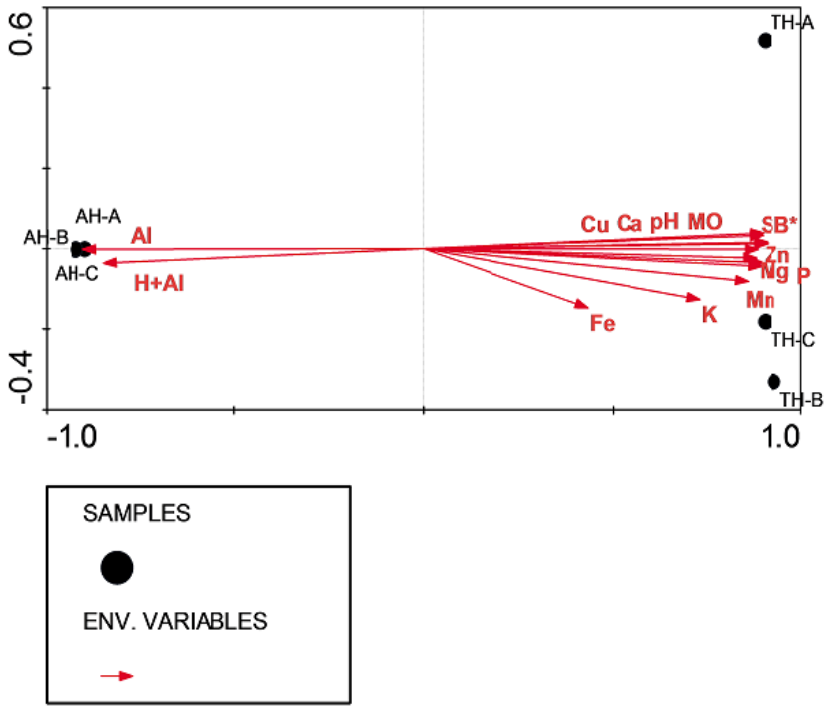


Figura 28 - Análise de Redundância (RDA), com Teste de Monte Carlo efetuando 499 permutações. Os símbolos indicam: TH- Terra Preta do sítio Hatahara; AH= Solo Adjacente do sítio Hatahara

No estudo do sítio Caldeirão, pode-se visualizar, pelas análises de *Cluster* e *MDS*, uma diferença entre as estruturas dos dois solos de TPA e seus respectivos solos adjacentes, seguidas; de uma distinção entre a TPA dos tratamentos Cultivado e Capoeira e dentre seus respectivos solos adjacentes (Figura 29). O número de UTOs e os índices de riqueza e diversidade das TPAs foram superiores aos solos adjacentes, e quando comparados os diferentes tratamentos deste sítio, solos Cultivados obtiveram, valores inferiores para a TPA e superiores na riqueza para os solos adjacentes (Tabela 11). O Teste de Mantel apresentou uma correlação de 58,76% entre a matriz de atributos químicos e a de UTOs, geradas pela análise de DGGE, sendo os valores de p significativos e inferiores a 5%. A partir da análise de RDA e o teste de Monte Carlo, evidenciou-se que os atributos químicos: pH (λ= 0,35; p= 0,004) Ca (λ= 0,32; p= 0,002) e MO (λ= 0,19; p= 0,002) foram preponderantes para determinarem as variabilidades espaciais nas estruturas hierárquicas das comunidades, diferenciando os solos de TPA e adjacência, assim como, entre os tratamentos Capoeira e Cultivado do solo de Terra Preta (Figura 30).

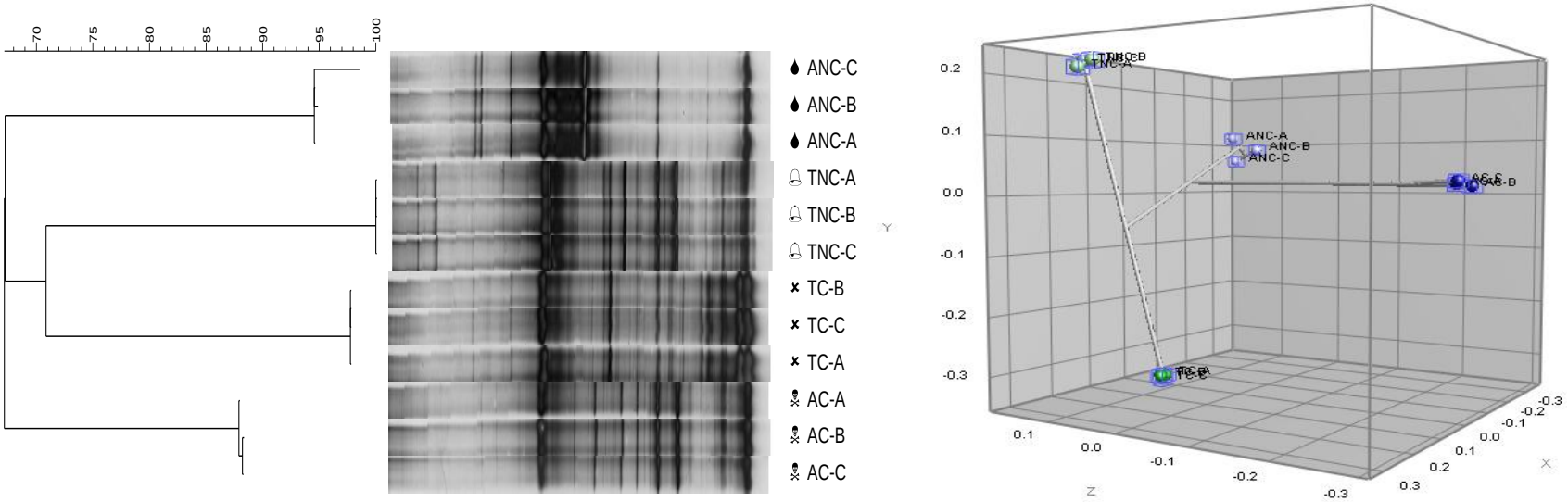


Figura 29 - Análise de Cluster, pela metodologia de *Neighbor-Joining*, e MDS, ambos efetuados com o coeficiente de similaridade *Jaccard*. Os símbolos indicam: TC- Terra Preta do sítio Caldeirão cultivado; AC- Solo Adjacente do sítio Caldeirão cultivado; TNC- Terra Preta do sítio Caldeirão capoeira; ANC- Solo Adjacente do sítio Caldeirão capoeira

Tabela 11 - Indices de riquezas e diversidade obtidos a partir da análise de DGGE, para o sítio Caldeirão

Solo	***UTOs***	***Shannon´s H´***	***CHAO2***
TPA Caldeirão Cultivado	27 ± 0	3,08 ± 0,03	30,31 ± 1,0
ADJ Caldeirão Cultivado	28 ± 0	2,71 ± 0,06	29,02 ± 1,0
TPA Caldeirão Capoeira	31,67 ± 0,44	3,25 ± 0,02	33,12 ± 1
ADJ Caldeirão Capoeira	22,67 ± 0,44	2,70 ± 0,06	26,66 ± 0,75

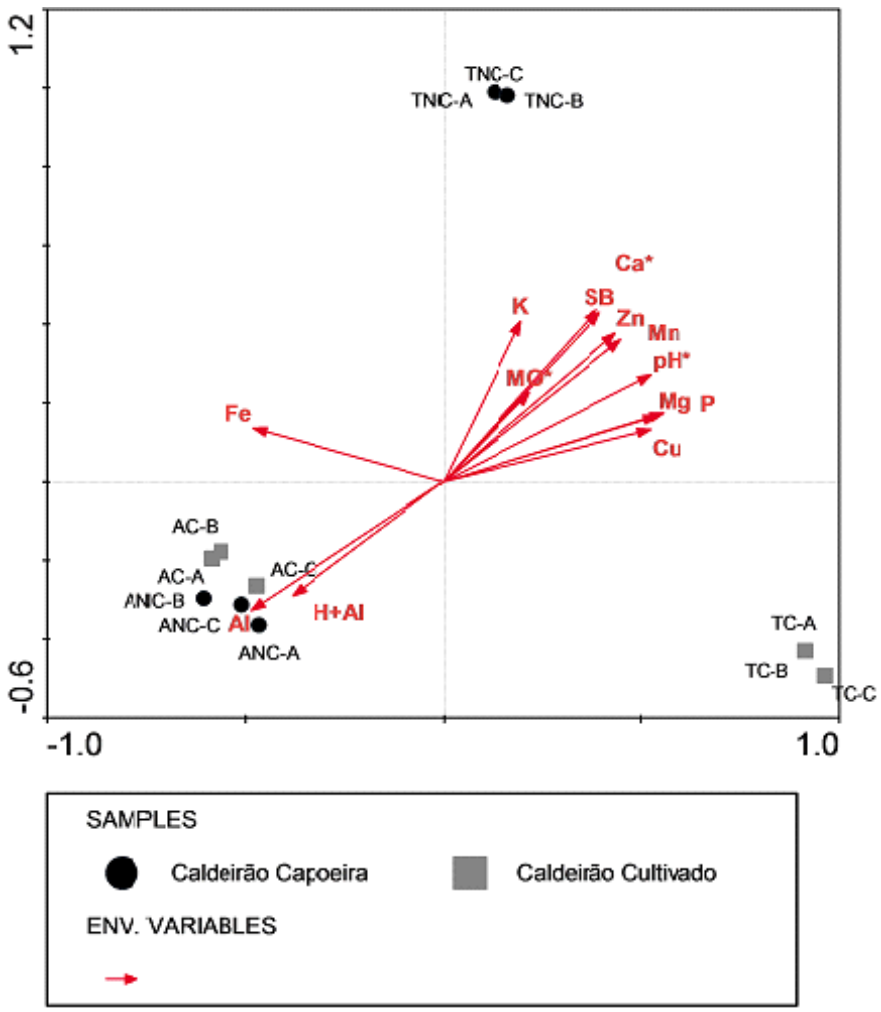


Figura 30 – Análise de Redundância (RDA), com Teste de Monte Carlo efetuando 499 permutações. Os símbolos indicam: TC- Terra Preta do sítio Caldeirão cultivado; AC- Solo Adjacente do sítio Caldeirão cultivado; TNC- Terra Preta do sítio Caldeirão capoeira; ANC- Solo Adjacente do sítio Caldeirão capoeira

Estes resultados demonstraram que a TPA e seus solos adjacentes apresentam-se distintos não apenas nas suas composições químicas (MOREIRA, 2007), e sim, significativas diferenças na sua estrutura de comunidade de leveduras e fungos não cultiváveis. Dentre as variáveis químicas, estudos anteriores constataram o pH como um fator de maior relevância que conduz a alterações na comunidade microbiológica do solo (FIERER; JACKSON, 2006). Vreulink e colaboradores (2007) relataram que menores valores de pH foram preponderantes na quantificação de UFC de levedura em diversos solos porém, o estudo não discutiu o número de espécies distintas presentes no ambiente. No presente trabalho, o pH também foi um dos atributos que diferenciou as comunidades de leveduras estudadas no sítio Caldeirão,

contudo, a TPA não apenas apresentou uma maior riqueza de leveduras, mas também possui valores elevados de pH quando comparados ao solo adjacente. Uma possível explicação para estes resultados deve-se que a TPA, a qual apresenta uma quantidade de restos vegetais e animais que a tornam fértil e elevam os teores de outros atributos como: Ca, P, K, Mg, SB e principalmente matéria orgânica foram também significativos para diferenciar a estrutura de comunidade. Fatores químicos do solo como carbono e nitrogênio orgânico, P, K, Na, NO_3 e Mg já foram relacionados como fatores químicos do solo que podem impactar as populações de leveduras presentes no solo (BOTHA, 2003).

Diferenças nas comunidades de leveduras isoladas em ambientes agrícolas e de floresta, também já foram constatadas anteriormente em outros trabalhos (SLÁVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ, 2000; 2003b). Isto pode ser justificado por fatores como: a morte de algumas espécies com o uso de fungicidas e herbicidas (SLÁVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ, 2003a), presença de distintas espécies intimamente relacionadas a associações com a rizosfera de diversas plantas (GOLUBTSOVA; GLUSHAKOVA; CHERNOV, 2007; SAMPEDRO et. al., 2004) e/ou pelas práticas agrícolas modernas como a adição de fertilizantes que alteram as composições químicas do solo. Contudo, o conhecimento sobre esta dinâmica na estrutura da comunidade de leveduras ocasionado pelo cultivo agrícola ainda é desconhecido, necessitando de maiores estudos que confirmem e esclareçam os verdadeiros fatores que influenciam estas diferenças.

3 CONCLUSÕES

O emprego de metodologias de isolamento, DGGE e análises químicas dos solos, demonstraram que a comunidade de leveduras presentes nos diferentes sítios de TPA e adjacência são diferentes na sua estrutura, estando isto correlacionado as distintas propriedades químicas dos solos estudados. Práticas agrícolas intensivas parecem afetar a comunidade de leveduras em solos de TPA do sítio Caldeirão, de forma mais intensa do que em seus solos adjacentes, indicando que as espécies presentes neste ambiente podem estar correlacionadas a funcionalidades específicas, onde pequenas alterações ambientais, como o uso de insumos agrícolas, podem levar a morte algumas espécies. Também, a existência de uma maior riqueza de leveduras encontradas no ambiente de TPA demonstrou que algumas espécies são capazes de sobrevirem em ambientes ricos em nutrientes e férteis e que estas podem ser boas indicadoras da fertilidade do solo.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o emprego de técnicas moleculares independentes do cultivo, DGGE, conjuntamente a metodologia de isolamento, fornecem resultados complementares a respeito da comunidade de leveduras em ambientes de solo. Além disso, obter espécies isoladas de ambientes desconhecidos permite melhor compreensão a respeito da taxonomia deste grupo, descobrindo-se novas espécies, e estudos detalhados, mesmo que em condições laboratoriais controladas, da fisiologia destes, auxiliando a inferir suas possíveis funcionalidades no ambiente.

Enfim, este trabalho apresentou uma melhor compreensão da diversidade de leveduras presentes no ambiente de solos, sendo, um dos primeiros a identificar estes organismos em solos de TPA, encontrando, possivelmente, espécies anteriormente não identificadas que podem desempenhar funcionalidades características neste ambiente.

REFERÊNCIAS

AIDOO, K. E.; NOUT, M. J. R.; SARKAR, P. K. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.6, p. 30-39, 2006.

ALTSCHUL S F, GISH W, MILLER W, MYERS E W, LIPMAN D L. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam.; v. 215, p. 403-410,1990.

ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÜJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brasilian Journal of Microbioloy**, São Paulo, v.40, p.417-432.

BASÍLIO, A. C. M.; ARAÚJO, P. R. L.; MORAIS, J. O. F.; FILHO, E. A. S.; MORAIS, M. A.; SIMÕES, D. A. Detection and Identification of Wild Yeast Contaminats of the Industrial Fuel Ethanol Fermentation Process. **Current Microbiology**, New York, v.56, p. 322-326, 2008.

BASTOS, A. E. R.; MOON, D. H.; ROSSI, A.; TREVORS, J. T.; TSAI, S. M. Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 174, p. 346-352, 2000.

BAUBLIS, J. A.; WHARTON, JR. R. A. e VOLZ, P. A. Diversity of microfungi in na Antarctic dry valley. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 31, p. 3-12, 1991.

BOBY, V. U.; BALAKRISHANA, A. N.; BAGYARAJ, D. J. Interaction between *Glomus mosseae* and soil yeasts on growth and nutrion of cowpea. **Microbiological research**, Jena, v. 163, p. 693-700, 2008.

BOOTHE, D. D.; SMITH, M. C.; GATTIE, D. K.; DAS, K. C. Characterization of microbial populations in landfill leachate and bulk samples during aerobic bioreduction. **Advances in Enviromental Research,** New York, v. 5, p. 285-294, 2001.

BOTHA, A. Yeasts in soil. *In*: ROSA, C. A.; GÁBOR, P. (Eds). **Biodiversity and Ecophysiology of yeasts.** Berlin: Springer, v. 1, p. 221-240, 2006.

BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: Atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, New York, v. 36, p. 214-216, 2004.

BUTINAR, L.; SANTOS, S.; SPENCER-MARTINS, I.; OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeast diversity in hypersaline habitats. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 244, p. 229-234, 2005.

BUZZINI, P.; INNOCENTI, M.; TURCHETTI, B.; LIBKID, D.; BROOCK, M.; MULINACCI, N. Carotenoid profiles of yeasts belongning to the genera *Rhodotorula, Rhodosporidim, Sporobolomyces,* and *Sporidiobolus.* **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, p. 1024-1031, 2007.

CANNAVAN, F.S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de terra preta antropogênica da Amazônia Central e Oriental**. 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CARMO-SOUSA, L. Distribution of Yeasts in Nature. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J. S. (Eds.), The Yeasts. London and New York: **Academic Press**, New York, v.1, p. 79-102, 1969.

CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. **Primer 5:0 User Manual/Tutorial.** PRIMER-E, Plymouth, 2001

CLOETE, K. J.; VALENTINE, A. J.; STANDER, M. A.; BLOMERUS, L. M.; BOTHA, A. Evidence of Symbiosis Between the Soil Yeast *Cryptococcus laurentii* and a Sclerophyllous Medicinal Shrub, *Agathosma betulina* (Berg.) Pillans. **Microbial Ecology**, New York, v. 27, p. 624-632, 2009.

COCOLIN, L.; AGGIO, D.; MANZANO, M.; CANTONI, C.; COMI, G. Na application of PCR-DGGE analysis to profile the yest population in raw Milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, p. 407-411, 2002.

COCOLIN, L.; BISSON, L. F.; MILLS, D. A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters,** Amsterdam, v. 189, p. 81-87, 2000.

COSTA R, GOTZ M, MROTZEK N, LOTTMANN J, BERG G, SMALLA K. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. **FEMS Microbiol Ecolology,** Amsterdam, v. 56, p. 236–249, 2006.

CRESTANI, J.; LANDEL, M. F.; FAGANELLO, J.; VAINSTEIN, M. H.; VISHNIAC, H. S.; VALENTE, P. *Cryptococcus terrestris* sp. nov., a tremellaceous, anamorphic yeast phylogenetically related to *Cryptococcus flavescens.* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p.631–636, 2009.

DERITO, C.M.; MADSEN, E.L. Stable isotope probing reveals Trichosporon yeast to be active in situ in soil phenol metabolism. **The ISME Journal**, New York, v. 3, p. 477-485, 2009.

DIMITRIEV, V. V; GILICHINSKII, D. A.; FAIZUTDINOVA, R. N.; SHERSHUNOV, I. N.; GOLUBEV, V. I. e DUDA, V. I. Detection of viable yeast in 3-million-year-old permafrost soils of Siberia. **Microbiology**, Reading, v. 66, p. 546-550, 1997.

DUARTE, F. W.; DIAS, D. R.; PEREIRA, G. V. M.; GERVASIO, I. M.; SCHWAN, R. F. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabiroba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v.36, p. 557-569, 2009.

EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Potencial of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant grawth promoters. **Mycoscience**, Tokyo, v.47, p. 25-35, 2006.

EL-TARABILY, K.A.; SIVASITHAMPARAM, K. Potencial of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Mycoscience**, Tokyo, v. 47, p. 25-35, 2006.

FALESI, I.C. O estado atual dos conhecimentos sobre os solos da Amazônia brasileira. In Zoneamento agrícola da Amazônia. Boletim Técnico do Instituto de Pesquisa Agropecuária do Norte (IPEAN), p. 33-64. Belém: **IPEAN**. (1st reprint: Embrapa CPATU in 1980), 1972.

FELL, J.W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by largesubunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic Evolution and Microbiology**, Reading, v. 50, p. 1351-1371, 2000.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Lancaster; v.39, p. 783-791, 1985.

FERNADES, A. P. F. V. **Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudo sobre a H^+ ATPase da membrana plasmática**. 2008. 177f. Dissertação (Doutorado em Biologia) – Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2008

FIERER, N.; JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 103, n. 3, p.626-631, 2006.

FISCHER, M.M.; TRIPLETT, E. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 4630-4636, 1999.

FLEET, G. H. Yeasts in foods and beverages: impacto n product quality and safety. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 18, p. 170-175, 2007.

GADANHO, M.; LIBKIND, D.; SAMPAIO, J . P. Yeast Diversity in the Extreme Acidic Enviroments of the Iberian Pyrite Belt. **Microbial Ecology**, New York, v.52, p. 552-563, 2006.

GADANHO, M; SAMPAIO, J. P. Application of temperature gradient gel electrophoresis to the study of yeast diversity in estuary of the Targus river, Portugual. **FEMS Yeast Research.**, Amsterdam, v. 5, p. 253-261, 2004.

GLASER, B.; GUGGENBENBERGER, G.; ZECH, W. Organic chemistry studies in Amazonian Darck Earths. In: LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GLASER, B.; WOODS, W. I. (eds.) **Amazonian dark earths: Origin, properties, management.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v. 1, p. 227-242, 2003.

GLASER, B.; GUGGENBERGER, G.; HAUMAIER, L.; ZECH, W. Persistence of soil organic matter in archaeological soils (terra preta) of the Brazilian Amazon region. In: REES, R.M.; BALL B.C.; CAMPBELL, C.D.; WATSON, C.A. (Eds.), **Sustainable management of soil organic matter.** Wallingford: CABI Publishing, p.190-194, 2001.

GOLUBTSOVA, YU. V.; GLUSHAKOVA, A. M.; CHERNOV, I. YU. The Seasonal Dynamics of Yeast Communities in the Rhizosphere of Soddy-Podzolic Soils. **Eurasian Soil Science,** Moscow, v. 40, n. 8, p. 875-879, 2007.

GUMMADI, S. N.; KUMAR, D. S. Pectin Lyase and Pectate Lyase from *Debaryomeyces nepalensis* Isolated from Apple. **Researsh Journal of Microbiology**, Faisalabad, v. 1, n. 2, p. 152-159, 2006.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistical software package for education and data analysis. **Paleontological eletronica**, v. 4, p. 1-9, 2001.

HIERRO, N.; GONSALVÉZ, A.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M. Diversity and evolution of non- *Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration. **FEMS Yeast Research,** Amsterdam, v. 6, p. 102-111, 2006.

HONG, S. G.; LEE, K. H.; BAE, K. S. Diversity of Yeasts Associeted with Natural Environments in Korea. **The Journal of Microbiology**, v.40, n.1, p. 55-62, 2002.

JANISIEWICZ, W. Ecological Diversity, Niche Overlap, and Coexistence of Antagonists Used in Developing Mixtures for Biocontrol of Postharvest Diseases of Apples. **Biological Control**, San Diego, n. 5, p. 473-479, 1996.

JANISIEWICZ, W.; KURZTMAN, C. P.; BUYER, J. S. Yeast associated with nectarines and their potencial for biological control of brown rot. **Yeast**, Chichester, 2010 In press: Disponível em: http://www.interscience.wiley.com. Acesso em 2 abril 2010.

JENSEN, V. Studies on the microflora of Danish beech soils. IV. Yeast and yeast-like fungi. Zentralbl. Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankheitenu. **Hygiene**, v. 117, p. 41-65, 1963.

JUKES, TH; CANTOR, CR. Evolution of protein molecules. In MUNRO, HN, editor, **Mammalian Protein Metabolism**, New York : Academic Press, pp. 21-132., 1969.

KÄMPF, N.; WOODS, W.I.; SOMBROEK, W.; KERN, D.C.; CUNHA, T.J.F.. Classification of Amazonian Dark Earths and other ancient anthropic soils. In: LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GLASER, B.; WOODS, W. I. (eds.) **Amazonian dark earths: Origin, properties, management.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v. 1, p. 77-105, 2003.

KASZYCKI, P.; CZECHOWSKA, K.; PETRYSZAK, P.; MIĘDZOBRODZKI, J.,PAWLIK, B.; KOŁOCZEK, H. Methylotrophic extremophilic yeast *Trichosporon* sp.: a soil-derived isolate with potential applications in environmental biotechnology. **Acta Bioquimica Polonica**,Warsaw, v. 56, n.3, p. 463-473, 2006.

KERN, D.C. **Caracterização de solos com Terra Preta Arqueológica na região de Oriximiná, Pará**. Porto Alegre, UFRGS, Faculdade de Agronomia, 232 p, 1988. Tese (Mestrado).

KERN, D.C.; D' AQUINO, G.; RODRIGUES, T.E.; FRANZÃO, F.J.L.; SOMBROEK, W.; MYERS, T.P.; & NEVES, E.G. Distribution of Amazonian Dark Earths in the Brazilian Amazon. In: LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GLASER, B.; WOODS, W. I. (eds.) **Amazonian dark earths: Origin, properties, management.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v. 1, p. 51-75, 2003.

KERN, D.C.; KÄMPF, N. Antigos assentamentos indígenas na formação de solos com Terra Preta Arqueológica na região de Oriximiná, Pará. **R. Bras. Ci. Solo**, Viçosa,v. 13, p. 219-225, 1989.

KIM, J. S.; SPAROVEK, G.; LONGO, R. M.; MELO, W. J.; CROWELY, D. Bacterial diversity of terra preta and pristine florest soil from the Western Amazon. **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, p. 684-690, 2007.

KUMAR, S.; KAMURA, K.; NEI,M. Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, London, v. 5, p. 150-163, 2004.

KURTZMAN, C. P. Yeast species recognition from gene sequence analyses and other molecular methods. **Mycoscience**, Tokyo, v.47, p. 65-71, 2006.

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

KURTZMAN, C. P.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomecete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella, Meyerozyma, Millerozyma, Priceomyces,* and *Scheffersomyces.*Mycoscience, Tokyo, v. 51, p. 2-14, 2010.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The yeasts: a taxonomyc study**. 4 ed. Amsterdam: Elseviers Science, 1998, 1055p.

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, p. 331-371, 1998.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification of clinically important yeasts based on nucleotide divergence in the 5′ end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. **Journal of Clinical. Microbiology**, Washington, v. 35, n. 5, p. 1216–1223, 1997.

LACERDA, I. C. A.; MIRANDA, R. L.; BORELLI, B. M.; NUNES, A. C.; NARDI, R. M. D.; LACHANCÉ, M. A.; ROSA, C. A. Lactic acid bactéria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. **International journal of food microbiology**, Amesterdam, v. 105, p. 231-219, 2005.

LACHANCE, M. A.; VELIKONJA, A. P.; NATARAJAN, S.; EDLER, B. S. Nutrion and phylogeny of predacious yeasts. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.46, p. 495-505, 2000.

LACHANCE, M. Yeast Biodiversity: How many and How much?. *In*: ROSA, C. A.; GÁBOR, P. (Eds). **Biodiversity and Ecophysiology of yeasts.** Berlin: Springer, v. 1, p. 1-10, 2006.

LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GERMAN, L. A.; MCCANN, J.; MARTINS, G. C.; MOREIRA, A. Soil fertility and production potential. In: LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GLASER, B.; WOODS, W. I. (eds.) **Amazonian dark earths: Origin, properties, management.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v. 1, p. 105-124, 2003.

LANGE, J.; HAMMER, E.; SPECHT, M.; FRANCKE, W.; SCHAUER, F. Biodegradetion of biphenyl by the ascomycetous yeasts *Debaryomyces varijiae*. **Applied Microbiology and Biothecnology**, Berlin, v.50, p. 364-368, 1998.

LEPS, J.; SMILAUER, P. **Multivariate analysis of ecological data using CANOCO**. Uniterd Kingdom: Cambrige University Press, v. 1, 2003

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOLOMON, D.; KINYANGI, J.; GROSSMAN, J.; O'NEILL, B.; SKJEMSTED, J. E.;THIES, J.; LUIZÃO, F. J.; PETERSEN, J.; NEVES, E. G. Black carbon increase cation exchance capcity in soils. **Soil Science Society of America Journal.**, Madson, v. 70, p. 1719–1730, 2006.

LIMA, H. N.; SHAEFER, C.E.R.; MMELLO, J.W.V.; GILKES, R.J.; KER, J.C. Pedogenesis and pré-Colombian land use of "Terra Preta Anthrosolos"("Indian black earth") os Westerms Amazonia. **Geoderma**, Netherlands, v. 110, p. 1-17, 2002.

LODDER, J.(ED). **The Yeasts, a Taxonomic study.** 2 Ed. Amsterdam: NorthHolland Publishing, 1970.

LOPES, M. B.; SODEN, A.; MARTENS, A. L.; HENSCHKE, P. A.; e LANGRIDGE, P. Differentiaton and species identification of yesats using PCR. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 279-286, 1998.

LOUREIRO, S. T. A.; CAVALCANTI, M. A. Q.; NEVES, R. P.; PASSAVANTE, J. Z. O. Yeast isolated from sand and sea water in beaches of Olinda, Pernambuco State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Ames, v. 36, p. 333-337, 2005.

MADARI, B. E.; CUNHA, T. J. F.; NOVOTNY, E. H.; MILORI, D. M. B. P.; MARTIN NETO, L.; BENITES, V. M.; COELHO, M. R.; SANTOS, G. A. Matéria Orgânica dos Solos Antrópicos da Amazônia (Terra Preta de Índio): Suas Características e Papel na Sustentabilidade da Fertilidade do Solo. In: TEIXEIRA, W.G.; KERN, D.C.; MADARI, B.E.; LIMA, H.N.; WOODS, W.. (Org.). **As Terras Pretas de Índio da Amazônia: Sua Caracterização e Uso deste Conhecimento na Criação de Novas Áreas.** 1 ed. Manaus, AM: Embrapa Amazônia Ocidental, v. 1, p. 172-188,2009.

MAKSIMOVA, I. A.; CHERNOV, I. YU. Community structure of Yeast Fungi in Forest Biogeonoses. **Microbiology**, Reading,v. 73, p. 474-481, 2004**.**

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, A. R. P. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. **Food Chemistry**, Barking, v. 107, p 145-150, 2008.

MANKOWSKI, M. E.; MORREL, J. J. Yeast associated the infrabuccal pocket and colonies of carpenter and *Camponotus vicinus.* **Mycologia,** New York, v. 96, n. 2, p. 226-231, 2004.

MANKOWSKI, M. E.; MORREL, J. J. Yeast associated the infrabuccal pocket and colonies of carpenter and *Camponotus vicinus.* **Mycologia,** New York, v. 96, n. 2, p. 226-231, 2004.

MARSH, T.L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplifications products. **Current Opinion in Microbiology,** London, v. 2, p. 323-327, 1999.

MASOUD, W.; CESAR, L. B.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Yeast involved in the fermentation of *Coffea Arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis, **Yeast**, Chichester, v,21, p. 549-556, 2004.

MOK, W. I.; LUIZÁO, R. C. C.; DO SOCORRO BARRETO DA SILVA, M.; TEIXEIRA, M. F. S.; e MUNITZ, E. G. Ecology of pathogenic yeasts in Amazonian soil. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, p. 390-394, 1984.

MOREIRA, A. Fertilidade, Matéria orgânica e substâncias húmicas de solos antropogênicos da Amazônia ocidental. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.2, p.307-315, 2007

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** Lavras: UFLA, 626p.,2002.

MUYZER, G.; DEWAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S ribosomal RNA. **Applied Environmental. Microbiology,** Washington, v.59, n.3, p. 695-700, 1993.

NAKAMURA, Y.; FUKUHARA, H.; SANO, K. Secreted phytase activities of yeasts. **Bioscience, Biotechnology and Biochemstry**, Yokyo, v. 64, n.4, p. 841-844, 2000.

NASSAR, A. H.; EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast Williopsis saturnus endophytic in maize (Zea mays L.) roots. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v.42, p. 97-108, 2005.

NAVARRETE, A.A.; CANNAVAN, F.S.; TAKETANI, R.G.; TSAI,S.M. A Molecular Survey of the Diversity of Microbial Communities in Different Amazonian Agricultural Model Systems.**Diversity**, Basel, v.2, p.787-809, 2010.

NEVES, E.G.; PETERSEN, J.B; BARTONE, R.N.; SILVA, C.A.D.. Historical and socio-cultural origins of Amazonian Dark Earths, p. 29–50. In: LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GLASER, B.; WOODS, W. I. (eds.) **Amazonian dark earths: Origin, properties, management.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v. 1, p. 29-50, 2003

NIELSEN, D. S.; HONHOLT, S. TANO-DEBRAH, K; JESPERSEN, L. Yeast population associated with Ghanaian cocoa fermentations analaysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Yeast**, Chichester,v. 22; p.271-284, 2005..

NIELSEN, D. S.; JACOBESEN, T.; JESPERSEN, L.; KOCH, A. G.; ARNEBORG, N. Occurrence and growth of yeasts in processed meat products – Implications for potencial spoilage. **Meat Science**, New York, v.80, p. 919-926, 2008.

NOVOTNY, E. H.; HAYES, M. H. B.; MADARI, B. E.; BONAGAMBA, T. J.; AZEVEDO, E. R.; SOUZA, A. A.; SONG, G.; NOGUEIRA, C. M.; MANGRICH, A. S. Lessons from the Terra Preta de Índios of the Amazon Region for the Utilisation of Charcoal for Soil Amendment, **Journal of Brazilian Chemistry Society**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 1003-1010, 2009.

O'NEILL, B. GROSSMAN, J.; TSAI, S. M.; GOMES, J. E., LEHMANN, J.; PETERSON, J.; NEVES, E.; THIES, J. E. Bacterial Community Composition in Brazilian Anthrosols and Adjacent Soils Characterized Using Culturing and Molecular Identification. **Microbial Ecology.**, New York, v. 58, p. 23-35, 2009.

PAJOT, H. F.; FIGUEROA, L.I.C. FARIÑA, J. I. Dye-decoloring activity in isolated yeasts from the ecoregion of Las Yungas (Tucumán, Argentina). **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.40, p. 1503-1511, 2007.

PETER, G.; TORNAI-LEHOCZKI,J; SHIN, K.; DLAUCHY, D. Ogataea thermophila sp.nov., the teleomorph ofCandida thermophila. **FEMS Yeast Research**, Amesterdam, v. 7, p. 494-496, 2007.

PHAFF, H. J.; STARMER, W. T. **Yeast associated with plants, insects and soi**l. The Yeast, v 1, pp. 123-180, 1987.

PRAHALAND, A. K. e SEENAYYA, G. Bioavailability of zinc and cadmium and their effect on microbial growth and metal uptake. **Bulletin of Environmental. Contamination. Toxicology**., New York, v. 41, p. 921-927, 1988.

PRAKITCHAIWATTANA, C. J.; FLEET, G. H.; HEARD, G. M. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. **FEMS Yest Research**, Amsterdam, v. 4, p. 865-877, 2004.

PUNJA, Z. K., UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **TRENDS in Biotechnology**, Amsterdam, v. 21, n. 9, p. 400-407, 2003.

PUNJA, Z. K., UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **TRENDS in Biotechnology**, Amsterdam, v. 21, n. 9, p. 400-407, 2003.

RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 62, p. 142-160, 2007.

RANJARD, L.; POLY, F.; LATA, J.C.; MOUGUEL, C.; THIOLOUSE, J.; NAZARET, S. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribossomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4479-4487, 2001.

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

ROESH, L. F. W.; FULTHORPE, R. R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A. K. M.; KENT, A. D.; DAROUB, S.H.; CAMARGO, F. A. O.; FARMERIE, W. G.; TRIPLETT, E. W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, New York, v. 1, p. 283-290, 2007.

ROMERO, M. C.; REINOSO, E. H.; KIERNAN, A. M.; URRUTIA, M. I. Chlorinated biphenyl degradation by wild yeasts pre-cultured in biphasic systems. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v.9, n.3, 2006.

RUIVO, M.L.P.; AMARANTE, C.B.; OLIVEIRA, M.L.S.; MUNIZ, I.C.M., SANTOS, D.A.M. Microbial population and biodiversity in amazonian dark earth soils. In: WOODS, W. I.; TEIXEIRA, W. G.; LEHMANN, J.; STEINER, C.; WINKLERPRINS, A. M. G. A.; REBELLATO, L. (Eds). **Amazonian Darck Earths: Wim Sombroek's Vision.** Springer, v.1, p. 351-362, 2009.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAMPAIO, J. P.; GADANHO, M.; SANTOS, S.; DUARTE, F. L.; PAIS, C.; FONSECA, C.; FELL, J. W. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. **Iternational Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencer woods,V.51, P. 687-697, 2001.

SAMPEDRO, I.; ARANDA, E.; SEERVINO, J. M.; FRACCHIA, S.; ROMERA, I. G.; OCAMPO, J. A.; GODEAS, A. Improvement by soil yeasts of arbuscular mycorrhizal symbiosis of soybean (*Glycine max*) colonized by *Glomus mosseae*. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 14, p. 229-234, 2004.

SATOH, K.; MAKIMURA, K. *Sporobolomyces koalae* sp. nov., a basideomycetous yeast isolated from nasal smears of Queensland koalas kept in a Japanese zoological park. **Iternational Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**,Spencer Woods, v.58, p. 2983-2986, 2008.

SCHAWAN, R. F.; CAMPOS, C. R.; DIAS, D. R. Diversidade de leveduras em ecossitemas brasileiros. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUERA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiverssidade do solo em ecossitemas brasileiros.** Lavras: UFLA, v.1, p. 585-620, 2008.

SCORZETTI, G., FELL, J.W.; FONSECA, A.; STATZELL-TALLMAN, A. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 2, p. 495-517, 2002.

SILVA-FILHO, E. A.; SANTOS, S. K. B.; RESENDE, A. M.; MORAIS, MORAIS, M A JR., SIMÕES, D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek,** Amsterdam, v. 88, p. 13-23, 2005.

SLÁVIKOVÁ E; KOSÍKOVÁ B; MIKULÁSOVÁ M. Biotransformation of waste lignin products by the soil-inhabiting yeast Trichosporon pullulans.**Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, n.3, p. 200-2003, 2002.

SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R. Effects of Pesticides on yeasts isolated from agricultural soil. **Zeitschrift fur Naturforschung**, Tubingen, v. 58, p. 855-859, 2003a

SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R. The diversity of yeast in the agricultural soil. **Jounal of Basic Microbiology**, Berlin, 43, 430-436, 2003b.

SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R. The occurrence of yeast in the forest soils. **Jounal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 40, p. 207-212, 2000.

SMITH, N.J.H. Anthrosols and human carrying capacity in Amazonia. **Annals of the Association of American Geographers**, Washington, v. 70, p. 553-566, 1980.

SOMBROEK, W. G. AMAZON SOILS: **A Reconnaissance of the Soils of the Brazilian Amazon Region.** Wageningen, Center for Agricultural Publications and Documentation. 1966. 292 P.

STIRLING D. DNA extraction from Fungi, Yeast and Bacteria. . In: BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. [Eds]. PCR Protocols. 2 ed. Humana Press, v. 226, p.53-54,.2003.

SUH, S. O. NGUYEN, N. H.; BLACKWELL, M. Nine new *Candida* species near *C. membranifaciens* isolated from insects. **Mycological Research**, Cambridge, v.109, p. 1045-1056, 2005.

TAKETANI, R. G.; TSAI, S. M. The Influence of Different Land Uses on the Structure of Archaeal Communities in Amazonian Anthrosols Based on 16S rRNA and amoA Genes. **Microbial Ecology.**,New York, n. 58, p. 734-743, 2010.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TSAI, S. M.; O'NEILL, B. O.; CANNAVAN, F. S.; SAITO, D.; FALCÃO, N. P. S.; KERN, D.; GROSSMAN, J.; THIES, J. The microbial world of Terra Preta. In: WOODS, W. I.; TEIXEIRA, W. G.; LEHMANN, J.; STEINER, C.; WINKLERPRINS, A. M. G. A.; REBELLATO, L. (Eds). **Amazonian Darck Earths: Wim Sombroek's Vision.** Springer, p. 299-308, 2009.

VADKERTIÒVA, R. SLÀVIKOVÁ, E. Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil, plant environments. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v.46, p. 145-152, 2006.

VALENTE, P.; RAMOS, J. P.; LEONCINI, O. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, p. 949-958, 1999.

VAUGHAN-MARTINI; KURTZMAN, C. P.; MEYER, S. A.; O'NEILL, E. B. Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica sp. nov.*, the ascosporic state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila sp. nov.* **FEMS Yeast Research**, v.5, p. 463-469, 2005.

VISHNIAC, H. S. Biodiversity of yeast and filamentous microfungi in terrestrial Antarctic ecosystems. **Biodiversity Conservation**, London, v. 5, p. 1365-1378, 1996.

VITAL, M. J. S.; ABRANCHES, J.; HAGLER, A. N.; HAGLER, L. C. M. Mycocinogenic yeast isolated from Amazon soils of the Maracá ecological station, Roraima – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p. 230-235, 2002.

VOGEL, C.; ROGERSON, A.; SCHATZ, S.; LAUBACH, H.; TALLMAN, A.; FELL, J. Prevalence of yeast in beach sand at three bathing beaches in South Florida. **Water Research**, Oxford, v. 41, p. 1915-1920, 2007.

VREULINK, JO. M.; ESTERHUSE, A.; JACOBS, K.; BOTHA, A. Soil properties that impact yeast and actinomycete numbers in sandy low nutrient soils. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, p. 1369-1374, 2007.

WACHÉ, Y.; HUSSON, F.; FERON, F.; BELIN, G. Yeasts as an efficient biocatalyst for the production of lipid-derived flavours and fragrances. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 89, p. 405-416, 2006.

WANG, K. JIA, F.; BAI, F. *Pseudozyma hubeiensis* sp. nov. and *Pseudozyma shanxiensis* sp. nov., novel ustilaginomycetous anamorphic yeast species from plant leaves. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**,Spencer Woods, v. 56, p. 289-293, 2006

WOODS, W.I.; MCCANN, J.M. El origen y persistencia de las tierras negras de la Amazonía. In: HIRAOKA, M.; MORA, S (Ed.), **Desarrollo Sostentible en la Amazonía**. p. 23-30, 2001.

WOODS, W.I.; MCCANN, J.M. The anthropogenic origin and persistence of Amazonian Dark Earths. Yearbook, **Conference of Latin American Geographers**, v. 25, p. 7-14, 1999.

WUCZKOWSKI, M.; STERFLINGER, K.; KRAUS, G.F.; KLUG, B.; PRILLINGER, H. Diversity of microfungi and yeasts in soils of the alluvial zone national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria ("Nationalpark Donauauen").**Die Bodenkultur**, Vienna, v. 54, p. 109-117, 2003.

ZHANG, H.; ZHENG, X.; YU, T. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. **Food Control**, Vurrey,v. 18, p. 287-291, 2007.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Isolado	Espécie	Número de acesso	*e-value*	Máxima identidade %	Bases diferentes / Total	*Gaps* entre as bases diferentes
BCM_TH-35	*Saccharomycopsis crataegensis*	U40079	0	98	10/590	5
BCM_TH-36	*Saccharomycopsis crataegensis*	U40079	0	98	9/576	4
BCM_TH-37	*Saccharomycopsis crataegensis*	U40079	0	98	9/582	4
BCM_TC-26	*Williopsis saturnus var subsufficiens*	EF550318	0	99	1/592	0
BCM_TC-27	*Williopsis saturnus var subsufficiens*	EF550318	0	99	1/579	0
BCM_TC-28	*Williopsis saturnus var subsufficiens*	EF550318	0	99	1/576	0
BCM_TC-29	*Williopsis saturnus var subsufficiens*	EF550318	0	99	2/593	1
BCM_TC-30	*Williopsis saturnus var subsufficiens*	EF550318	0	99	2/594	1
BCM_TC-31	*Williopsis saturnus var subsufficiens*	EF550318	0	99	1/617	0
BCM_TH-30	*Pichia rhodanensis*	EF550325	0	99	3/604	0
BCM_ANC-1	*Candida fluviatilis*	U45717	0	99	3/605	0
BCM_ANC-2	*Candida fluviatilis*	U45717	0	99	3/600	0
BCM_ANC-3	*Candida fluviatilis*	U45717	0	99	3/601	0
BCM_ANC-4	*Candida fluviatilis*	U45717	0	99	3/602	0
BCM_ANC-5	*Candida fluviatilis*	U45717	0	99	3/610	0
BCM_ANC-6	*Candida fluviatilis*	U45717	0	99	3/614	0
BCM_ANC-7	*Candida fluviatilis*	U45717	0	99	3/612	0
BCM_ANC-8	*Candida fluviatilis*	U45717	0	99	3/592	0
BCM_ANC-9	*Candida fluviatilis*	U45717	0	99	3/588	0
BCM_ANC-10	*Candida fluviatilis*	U45717	0	99	3/612	0
BCM_ANC-11	*Candida fluviatilis*	U45717	0	99	3/610	0
BCM_ANC-12	*Candida fluviatilis*	U45717	0	99	3/610	0
BCM_ANC-13	*Candida fluviatilis*	U45717	0	99	3/601	0
BCM_ANC-14	*Candida fluviatilis*	U45717	0	99	3/601	0
BCM_ANC-15	*Candida orthopsilosis*	FJ432622	0	100	0/602	0
BCM_ANC-16	*Candida parapsilosis*	U45754	0	99	3/586	0
BCM_ANC-17	*Candida parapsilosis*	U45754	0	99	3/605	0
BCM_TC-1	*Candida maltosa*	U45745	0	99	6/570	3
BCM_TC-2	*Candida maltosa*	U45745	0	99	6/592	3
BCM_ANC-19	*Debaryomyces polymorphus var. africanus*	AB054994	0	100	0/596	0
BCM_ANC-20	*Debaryomyces polymorphus var. africanus*	AB054994	0	100	0/610	0
BCM_ANC-21	*Debaryomyces polymorphus var. africanus*	AB054994	0	100	0/611	0
BCM_ANC-22	*Debaryomyces polymorphus var. africanus*	AB054994	0	100	0/604	0
BCM_ANC-23	*Debaryomyces polymorphus var. africanus*	AB054994	0	100	0/604	0
BCM_TH-7	*Debaryomeces nepalensis*	U45938	0	99	2/611	0
BCM_TH-8	*Debaryomeces nepalensis*	U45839	0	99	2/610	0
BCM_AC-25	*Pichia spartinae*	AB499025	0	100	0/567	0
BMC_TC -17	*Pichia spartinae*	AB499025	0	100	0/591	0
BMC_TC -18	*Pichia spartinae*	AB499025	0	100	0/583	0
BMC_TC -19	*Pichia spartinae*	AB499025	0	100	0/594	0

(continuação)

Isolado	Espécie	Número de acesso	*e-value*	Máxima identidade %	Bases diferentes / Total	*Gaps* entre as bases diferentes
BMC_TC -20	*Pichia spartinae*	AB499025	0	100	0/580	0
BMC_TC -21	*Pichia spartinae*	AB499025	0	100	0/600	0
BMC_TC -22	*Pichia spartinae*	AB499025	0	100	0/590	0
BMC_TC -23	*Pichia spartinae*	AB499025	0	100	0/593	0
BMC_TC -24	*Pichia spartinae*	AB499025	0	100	0/588	0
BCM_AH -9	*Pichia caribbica*	EU348786	0	100	0/563	0
BCM_AH -10	*Pichia caribbica*	EU348786	0	100	0/567	0
BCM_AH -11	*Pichia caribbica*	EU348786	0	100	0/585	0
BCM_AH -12	*Pichia caribbica*	EU348786	0	100	0/541	0
BCM_AH -13	*Pichia caribbica*	EU348786	0	100	0/566	0
BCM_AH -14	*Pichia caribbica*	EU348786	0	100	0/556	0
BCM_AH -15	*Pichia caribbica*	EU348786	0	100	0/596	0
BCM_AH -16	*Pichia caribbica*	EU348786	0	100	0/575	0
BCM_AH -17	*Pichia caribbica*	EU348786	0	100	0/563	0
BCM_AH -18	*Pichia caribbica*	EU348786	0	100	0/585	0
BCM_AH -19	*Pichia caribbica*	EU348786	0	100	0/546	0
BCM_AH -20	*Pichia caribbica*	EU348786	0	100	0/586	0
BCM_AH -21	*Pichia caribbica*	EU348786	0	100	0/580	0
BCM_AH -22	*Pichia caribbica*	EU348786	0	100	0/586	0
BCM_AH -23	*Pichia caribbica*	EU348786	0	100	0/553	0
BCM_AH -24	*Pichia caribbica*	EU348786	0	100	0/533	0
BCM_AC-15	*Pichia caribbica*	EU348786	0	100	0/588	0
BCM_TH-1	*Candida aaseri*	FJ432328	0	99	3/550	0
BCM_TH-2	*Candida aaseri*	FJ432328	0	99	3/555	0
BCM_ANC-24	*Candida conglobata*	U45789	0	98	9/607	2
BCM_ANC-25	*Candida conglobata*	U45789	0	98	8/601	1
BCM_ANC-26	*Candida conglobata*	U45789	0	98	8/601	1
BCM_TNC -17	*Candida conglobata*	U45789	0	98	8/586	1
BCM_TNC -18	*Candida conglobata*	U45789	0	98	8/601	1
BCM_TNC -19	*Candida conglobata*	U45789	0	98	9/606	2
BCM_TNC -20	*Candida conglobata*	U45789	0	98	9/600	2
BCM_TNC -21	*Candida conglobata*	U45789	0	98	9/614	2
BCM_TNC -22	*Candida conglobata*	U45789	0	98	9/601	2
BCM_TNC -23	*Candida conglobata*	U45789	0	98	9/604	2
BCM_TNC -24	*Candida conglobata*	U45789	0	98	9/619	2
BCM_TNC -25	*Candida conglobata*	U45789	0	98	9/584	2
BCM_TNC -26	*Candida conglobata*	U45789	0	98	9/608	2
BCM_TNC -27	*Candida conglobata*	U45789	0	98	9/587	2
BCM_TNC -2	*Hanseniaspora opuntiae*	FM180536	0	100	0/604	0
BCM_TNC -3	*Hanseniaspora opuntiae*	FM180536	0	100	0/616	0
BCM_TNC -4	*Hanseniaspora opuntiae*	FM180536	0	100	0/599	0
BCM_TNC -5	*Hanseniaspora opuntiae*	FM180536	0	100	0/609	0
BCM_TNC -6	*Hanseniaspora opuntiae*	FM180536	0	100	0/602	0

(continuação)

Isolado	Espécie	Número de acesso	*e-value*	Máxima identidade %	Bases diferentes / Total	*Gaps* entre as bases diferentes
BCM_TNC -7	*Hanseniaspora opuntiae*	FM180536	0	100	0/608	0
BCM_TNC -8	*Hanseniaspora opuntiae*	FM180536	0	100	0/607	0
BCM_TNC -9	*Hanseniaspora opuntiae*	FM180536	0	100	0/606	0
BCM_TNC -10	*Hanseniaspora opuntiae*	FM180536	0	100	0/601	0
BCM_TC-4	*Hanseniaspora ocidentalis*	EU268638	0	99	1/598	0
BCM_AC-11	*Hanseniaspora ocidentalis*	EU268638	0	99	2/600	0
BCM_TNC-1	*Hanseniaspora occidentalis*	EU268638	0	99	2/606	0
BCM_AC -12	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	1/589	0
BCM_AC -13	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	1/593	0
BCM_AC -14	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	100	0/600	0
BCM_TH- 9	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	1/605	0
BCM_TH- 10	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	1/605	0
BCM_TH- 11	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	1/604	0
BCM_TH- 12	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	1/583	0
BCM_TH- 13	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	1/602	0
BCM_TH- 14	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	2/600	0
BCM_TH- 15	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	1/598	0
BCM_TH- 16	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	1/610	0
BCM_TH- 17	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	1/617	0
BCM_TH- 18	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	1/580	0
BCM_TH- 19	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	100	0/604	0
BCM_TH- 20	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	1/605	0
BCM_TH- 21	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	1/612	0
BCM_TH- 22	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	1/615	0
BCM_TH- 23	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	0/603	0
BCM_TH- 24	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	2/609	0
BCM_TH- 25	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	100	0/608	0
BCM_TH- 26	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	1/609	0
BCM_TH- 27	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	1/594	0
BCM_TH- 28	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	1/596	0
BCM_TH- 29	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	1/601	0
BCM_TH- 9	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	100	0/588	0
BCM_TNC -11	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	100	0/615	0
BCM_TNC -12	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	100	0/592	0
BCM_TNC -13	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	100	0/606	0
BCM_TNC -14	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	100	0/588	0
BCM_TNC -15	*Issatchenkia terricola*	EF550233	0	99	2/618	0
BCM_AC -16	*Pichia manshurica*	FM180542	0	100	0/579	0
BCM_AC -17	*Pichia manshurica*	FM180542	0	99	1/563	0
BCM_AC -18	*Pichia manshurica*	FM180542	0	100	0/562	0
BCM_AC -19	*Pichia manshurica*	FM180542	0	99	0/584	0
BCM_AC -20	*Pichia manshurica*	FM180542	0	100	0/563	0
BCM_AC -21	*Pichia manshurica*	FM180542	0	100	1/562	0

(continuação)

Isolado	Espécie	Número de acesso	*e-value*	Máxima identidade %	Bases diferentes / Total	*Gaps* entre as bases diferentes
BCM_AC -22	*Pichia manshurica*	FM180542	0	100	0/583	0
BCM_AC -23	*Pichia manshurica*	FM180542	0	100	1/581	0
BCM_AC -24	*Pichia manshurica*	FM180542	0	100	0/555	0
BMC_TC -6	*Pichia manshurica*	FM180542	0	100	0/582	0
BMC_TC -7	*Pichia manshurica*	FM180542	0	99	0/578	0
BMC_TC -8	*Pichia manshurica*	FM180542	0	99	1/563	0
BMC_TC -9	*Pichia manshurica*	FM180542	0	99	0/588	0
BMC_TC -10	*Pichia manshurica*	FM180542	0	100	1/580	0
BMC_TC -11	*Pichia manshurica*	FM180542	0	100	0/604	0
BMC_TC -12	*Pichia manshurica*	FM180542	0	100	1/573	0
BMC_TC -13	*Pichia manshurica*	FM180542	0	99	0/604	0
BMC_TC -14	*Pichia manshurica*	FM180542	0	100	0/611	0
BMC_TC -15	*Pichia manshurica*	FM180542	0	100	0/583	0
BMC_TC -16	*Pichia manshurica*	FM180542	0	100	0/581	0
BCM_TH-3	*Cryptococcus cf taibaiensis*	FJ7443602	0	87	77/600	12
BCM_AH-1	*Cryptococcus heveanensis*	AF406890	0	96	21 /584	0
BCM_TH-4	*Cryptococcus terrestris*	EF599104	0	99	1/598	1
BCM_TH-5	*Cryptococcus terrestris*	EF599104	0	99	1/601	1
BCM_TH-6	*Cryptococcus terrestris*	EF599104	0	99	1/569	1
BCM_AC -1	*Cryptococcus laurentii*	AY315663	0	99	2/615	1
BCM_AC -2	*Cryptococcus laurentii*	AY315665	0	100	0/601	0
BCM_AC -3	*Cryptococcus laurentii*	AY315670	0	100	0/619	0
BCM_AC -4	*Cryptococcus laurentii*	AY315671	0	99	1/610	1
BCM_AC -5	*Cryptococcus laurentii*	AY315669	0	100	0/604	0
BCM_AC -6	*Cryptococcus laurentii*	AY315666	0	100	0/599	0
BCM_AC -7	*Cryptococcus laurentii*	AY315667	0	99	1/614	1
BCM_AC -8	*Cryptococcus laurentii*	AY315668	0	99	1/611	1
BCM_AC -9	*Cryptococcus laurentii*	AY315672	0	99	1/617	1
BCM_AH -2	*Cryptococcus larentii*	AY315663	0	99	1/575	1
BCM_AH -3	*Cryptococcus larentii*	AY315663	0	100	0/584	0
BCM_AH -4	*Cryptococcus larentii*	AY315663	0	99	1/584	1
BCM_AH -5	*Cryptococcus larentii*	AY315663	0	99	1/613	1
BCM_AH -6	*Cryptococcus larentii*	AY315663	0	99	2/588	2
BCM_AH -7	*Cryptococcus larentii*	AY315663	0	99	2/612	2
BCM_AH -8	*Cryptococcus larentii*	AY315663	0	99	1/588	1
BCM_AC-10	*Cryptococcus zeae*	AM748533	0	99	1/597	0
BCM_TH-38	*Sporidiobolus pararoseus*	AM748549	0	98	8/572	5
BCM_AH-25	*Rhodotorula mucilaginosa*	AF335956	0	100	0/563	0
BCM_AH-26	*Rhodotorula mucilaginosa*	AF335956	0	99	3/562	1
BCM_AH-27	*Rhodotorula mucilaginosa*	AF335986	0	99	2/587	2
BCM_TH-32	*Rhodotorula dairenensis*	FM212448	0	99	3/584	2
BCM_TH-33	*Rhodotorula dairenensis*	FM212449	0	99	3/612	3
BCM_TH-34	*Rhodotorula dairenensis*	FM212448	0	99	1/589	1

conclusão

Isolado	Espécie	Número de acesso	*e-value*	Máxima identidade %	Bases diferentes / Total	*Gaps* entre as bases diferentes
BCM_TH-31	*Pseudozima aphidis*	AJ235303	0	99	1/615	1
BCM_AC-26	*Pseudozyma tsukubaensis*	AJ235297	0	100	0/578	0
BCM_TC-21	*Pseudozyma hubeiensis*	DQ008953	0	99	1/618	1