

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**FUNGOS CELULOLÍTICOS DA FORMAÇÃO ARBUSTIVA ABERTA
DA RESTINGA DE GUAIBIM, BAHIA**

JACKELINE PEREIRA ANDRADE

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
SETEMBRO - 2013**

FUNGOS CELULOLÍTICOS DA FORMAÇÃO ARBUSTIVA ABERTA DA RESTINGA DE GUAIBIM

JACKELINE PEREIRA ANDRADE

Bacharel em Biologia

UFRB - Cruz das Almas, 2010

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Jorge Teodoro de Souza

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

SETEMBRO – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

A553

Andrade, Jackeline Pereira.

Fungos celulolíticos da formação arbustiva aberta da Restinga de Guaibim, Bahia / Jackeline Pereira Andrade. _ Cruz das Almas, BA, 2013.

90f.; il.

Orientador: Jorge Teodoro de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Fungos filamentosos – Análise. 2.Fungos – Flora – Restingas. 3.Celulase – Enzimas. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 579.6

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
JACKELINE PEREIRA ANDRADE**



Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB



Prof. Dr. José Luiz Bezerra
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB



Prof. Dr. Marcos Fábio Oliveira Marques
Universidade do Estado da Bahia-UNEB

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
SETEMBRO – 2013**

AGRADECIMENTOS

A todos da minha família pela paciência, compreensão, ajuda, carinho.

Ao meu amor Phellippe por me incentivar, apoiar e fazer cada dia da minha vida mais feliz. Foi um dos principais motivadores, abdicando de tempo e carinho em prol de minha realização pessoal. Realizamos-nos juntos.

As minhas amigas Eliana, Shirley, Eliane, companheiras de muitas alegrias, tristezas e vitórias alcançadas. Obrigada pelo carinho, paciência, compreensão, amizade verdadeira. Amo muito vocês !!!

Ao meu Orientador Jorge Teodoro pela oportunidade, confiança no meu trabalho, convívio e ajuda. Obrigada Professor!

Aos colegas do Laboratório pela amizade e ajuda sempre que precisei Valter, Vinícius, Daniele, Zayda, Patrícia, Adailson e Juan.

A todos os técnicos do laboratório, em especial a Zozilene e Carol.

Aos colegas de curso pelos momentos de diversão e estudo Valter, Fenícia, Adriana e Leo.

A Lidiane Roberta da UFPE e ao professor André pelo auxílio em algumas questões metodológicas.

A professora Alessandra Caiafa e ao mestrando Sérgio pelo auxílio nas análises estatísticas.

A CAPES pela concessão da bolsa para que o trabalho fosse desenvolvido e a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pelo espaço físico.

A todos, que de alguma forma me ajudaram, muito obrigada !!!

ÍNDICE

RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	9
REVISÃO DE LITERATURA	10
1. Ecossistema Restinga	10
1.1 Formações Vegetacionais	12
2. Fungos Filamentosos	16
3. Celulases	17
3.1 Fungos Celulolíticos	17
3.2 Celulose	18
3.3 Características Bioquímicas	20
3.4 Aplicações Biotecnológicas	21
REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 1	
Comunidade de Fungos Celulolíticos da Restinga de Guaibim, BA	31
Resumo	32
Introdução	33
Materiais e Métodos	34
Resultados	44
Discussão	65
Considerações Finais	69
Referências	70
CAPÍTULO 2	
Description <i>Penicillium restingae</i> sp. nov.	74
CONSIDERAÇÕES GERAIS	78
APÊNDICE	79

RESUMO

Andrade, J. P. Fungos Celulolíticos da Formação Arbustiva Aberta da Restinga de Guaibim

A restinga é um dos ecossistemas brasileiros mais antropizados, podendo se considerar que o aumento da sua destruição é proporcional ao nível de desconhecimento de sua diversidade biológica. A maioria dos estudos sobre fungos em restinga estão relacionados aos fungos micorrízicos e ou as leveduras. Nesse trabalho estudou-se a densidade, diversidade, composição e o potencial para a produção de celulase da comunidade de fungos celulolíticos das moitas e entre moitas da Formação Arbustiva Aberta (FAA) da restinga de Guaibim, BA. O trabalho foi dividido em três partes: 1) uma revisão de literatura sobre o ecossistema restinga, os fungos celulolíticos e aplicações das celulases; 2) o estudo da estrutura da comunidade de fungos celulolíticos da FAA (Capítulo 1); 3) descrição de uma espécie nova, *Penicillium restingae* (Capítulo 2). Foram identificadas 43 espécies de fungos celulolíticos e 16 gêneros, onde os mais frequentes foram *Penicillium* e *Aspergillus* em ambos os pontos de coleta amostrados (moitas e entre moitas). A microbiota celulolítica das moitas e entre moitas foram similares quanto à taxa de crescimento e atividade celulolítica, mas diferiram quanto à composição. O trabalho representa a primeira contribuição para o conhecimento dos fungos celulolíticos de restinga.

Palavras-Chave: celulase, comunidade celulolítica, *Penicillium*, *Aspergillus*

ABSTRACT

Andrade, J. P. Cellulolytic fungi from the Guaibim sandbank

The sandbanks are the most anthropized Brazilian ecosystem. The increase in their destruction is proportional to the lack of knowledge of the biological diversity they contain. Most studies on sandbank fungi are on mycorrhiza and/or yeasts. In this study the density, diversity, composition and the potential to produce cellulases were evaluated for a community of cellulolytic filamentous fungi from the Guaibim sandbank, Bahia State. The study was divided into three parts: 1) a literature review on the sandbank ecosystem, cellulolytic fungi and cellulase applications; 2) the study of the cellulolytic community of filamentous fungi from the Guaibim sandbank (Chapter 1); and 3) description of *Penicillium restingae* sp. nov. (Chapter 2). A total of 43 species were identified in 16 genera and the most frequent were *Penicillium* and *Aspergillus* in both sampling points (vegetation patches and areas between patches). The fungal community from the vegetation patches and from the areas between the patches were similar in their growth rate and cellulolytic activity, but differed in composition. This study represents the first contribution to the knowledge of cellulolytic filamentous fungi from sandbanks.

Keywords: cellulase, cellulolytic community, *Penicillium*, *Aspergillus*

INTRODUÇÃO

A restinga é considerada um dos mais complexos ecossistemas brasileiros, devido a sua diversidade de habitats. Essa característica, além de conferir interesses para realização de estudos, também é responsável por sua fragilidade e susceptibilidade a ações antropogênicas (ARAUJO; LACERDA, 1987). Como resultado dessas perturbações, pode-se considerar que as restingas, em todo o litoral brasileiro, encontram-se de alguma forma alteradas (MMA, 1996).

Na restinga de Guaibim localizada no município de Valença, Bahia, onde são encontradas formações florísticas distintas fitofisionomicamente, caracterizando uma diversidade de formações e espécies vegetais, também são observadas algumas alterações. Embora seja uma Área de Proteção Ambiental (APA), sua vegetação esta sendo continuamente descaracterizada devido a agressão ambiental por ação do homem. Nesse cenário, o risco de se perder o que não se conhece aumenta a cada dia e os maiores prejuízos são aos seres humanos, porque pode estar perdendo fontes potenciais para aplicações biotecnológicas.

A origem das formações florísticas, separadas tanto no espaço como no tempo, sugere que elas possuem micobiotas distintas devido a um processo de sucessão ecológica ou a interação com a comunidade vegetal.

A maioria dos estudos sobre fungos em restingas brasileiras estão relacionados aos fungos micorrízicos ou as leveduras, isso indica que a comunidade de fungos filamentosos, principalmente celulolíticos, presente no solo das restingas brasileiras, bem como seu potencial biotecnológico é pouco conhecida (CORDEIRO et al., 2003; CORDAZZO; STÜRMER, 2007). Nesse contexto, os objetivos desse trabalho foram estudar a estrutura e a composição da comunidade de fungos filamentosos celulolíticos da Formação Arbustiva Aberta da restinga de Guaibim, BA.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Ecossistema Restinga

As restingas são planícies arenosas litorâneas, formadas pelos processos de transgressão e regressão marinha, no período Quaternário, que expuseram o fundo do mar permitindo sua colonização por espécies de ecossistema adjacentes como Mata Atlântica e Caatinga (SUGUIO; MARTIN, 1990). Esse ecossistema é marcado por altas temperaturas e salinidade, períodos de seca, vento constante e escassez de nutrientes, que tornam a sua estrutura e função diferentes de quaisquer outros ambientes.

O termo restinga possui significado diverso, podendo estar relacionado com o tipo de vegetação ou ao substrato-vegetação (SUGIYAMA, 1998; BRASIL, 1999). Segundo Sugiyama (1998) restinga, em sentido botânico, “é o conjunto de comunidades vegetais distintas fisionomicamente, sob influência marinha, distribuídas em mosaico e que ocorrem em áreas com grande diversidade ecológica”. Essa vegetação é importante porque estabiliza o substrato e diminui a ação dos ventos (COSTA et al., 1984).

A Resolução do CONAMA nº 261/1999 (BRASIL, 1999), define restinga como “um conjunto de ecossistemas com comunidades vegetais florística e fisionomicamente distintas, situadas em terrenos arenosos, de origem marinha, fluvial, lagunar, eólica ou combinações destas. Estas comunidades formam um complexo vegetacional edáfico e pioneiro, que depende mais da natureza do solo que do clima, encontrando-se em praias, cordões arenosos, dunas, planícies e terraços”.

As restingas estão relacionadas com o mar desde a sua formação, por isso apresentam características próprias quanto a topografia e ao tipo e estrutura vegetacional. A complexidade dessas características aumentam a medida que se distanciam do oceano, sendo consideradas um complexo fitogeográfico em torno da costa brasileira (ARAUJO; LACERDA, 1987).

Por se tratar de um ambiente costeiro, esse ecossistema está perdendo suas características de formação devido ao aumento de atividades antropogênicas como: a expansão imobiliária, remoção de areia e da vegetação,

deposição de lixo e abertura de trilhas para acesso às praias (SANTOS; MEDEIROS, 2003). Esse é um fato recorrente desde aproximadamente 500 anos devido sua ocupação após descobrimento do Brasil.

Talvez o primeiro registro de impacto antropogênico nas restingas brasileiras seja a carta de Pero Vaz de Caminha destinada a D. Manuel, Rei de Portugal, relatando a descoberta do Brasil (CASTRO, 2009):

No domingo de Páscoa, pela manhã, determinou o Capitão de ir ouvir missa e pregação naquele ilhéu. Mandou a todos os capitães que se arranjassem nos batéis, e o acompanhassem. Desta maneira tudo foi feito. Mandou armar um pavilhão naquele ilhéu, e dentro dele foi levantado um altar muito bem preparado. E ali, na presença de todos nós, fez dizer missa pelo Padre Frei Henrique, em voz entoada acompanhada com o mesmo tom pelos outros padres e sacerdotes.

Acabada a missa, desvestiu-se o padre e subiu a uma cadeira alta, com todos nós espalhados no areal.

O crescimento das cidades e o pós-guerra contribuíram para a ocupação das zonas costeiras, intensificando a degradação nessa região e por consequência diminuindo a diversidade (SOUZA; CAPELLARI, 2004; EHRLICH, 1997). Esse ambiente é tido como frágil devido sua dificuldade de recuperação aos impactos ambientais, por isso é necessária uma atenção especial (KEMENES, 2003).

Em função dos impactos ambientais, a comunidade científica começou a realizar vários estudos nesse ecossistema, para conhecer sua diversidade e criar melhores estratégias de uso dos seus recursos naturais.

Diversos estudos relacionados a composição florística (ULE, 1967; FRANCO et al., 1984; MELO, 1996; ALMEIDA; ARAÚJO, 1997; MENEZES; ARAÚJO, 1999; ASSUMPÇÃO; NASCIMENTO, 2000; SANTOS et al., 2000; PEREIRA; ARAÚJO, 2000; COGLIATTI-CARVALHO et al., 2001; LEITE; ANDRADE, 2004; PEREIRA; CORDEIRO; ARAUJO, 2004; DE ASSIS; PEREIRA; THOMAZ, 2004; ALMEIDA JR; PIMENTEL; ZICKEL, 2008; NOVO et al., 2010; BOURSCHEID; REIS, 2010; CARVALHO; SÁ, 2011; MENEZES, et al., 2012; MARTINS, 2012) e diversidade de animais (SILVA, 2009; SANTA-ROSA, 2009; DIAS; ROCHA, 2005) foram realizados nas restingas brasileiras.

Estudos sobre a diversidade de fungos em restingas brasileiras limitam-se, em geral, a fungos micorrízicos ou leveduras o que indica que a comunidade de

fungos filamentosos celulolíticos presente no solo das restingas brasileiras, e seu potencial biotecnológico ainda são pouco conhecidos (TRUFEM et al., 1988,1989, 1990, 1995; ROSA et al., 1995; HAGLER et al., 1993; STÜMER; BELLI, 1994; MORAIS et al., 1994; SANTOS et al., 1995; KOSKEAND; GEMMA, 1996; TAVARES, 1998; CORDOBA et al., 2001; CORDEIRO et al., 2003; CORDAZZO; STÜRMER, 2007; DE OLIVEIRA et al., 2009).

Quando comparados os conhecimentos já adquiridos sobre a vegetação das restingas brasileiras em relação aos concernentes à fauna e micobiota, percebe-se que os últimos são menos estudados. Isso mostra a carência de informações sistematizadas sobre a composição de suas comunidades, de registros confiáveis da ocorrência de espécies e de dados sobre as relações entre estas e a vegetação.

Como podemos perceber, serão necessários mais estudos nas restingas brasileiras, para representar pelo menos uma parte da importância ecológica que esse ecossistema têm quando o assunto é biodiversidade.

1.1 Formações Vegetacionais

As formações vegetacionais da restinga são protegidas legalmente, por serem Áreas de Preservação Permanente (APPs), segundo o Código Florestal (Lei Federal nº 4771), pela resolução n.º 303/2002 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e por pertencerem ao bioma da Mata Atlântica. Elas são constituídas por vários tipos de formações. Na restinga de Guaibim, BA, por exemplo, foram descritas oito formações vegetacionais: Formação Arbustiva Aberta não Inundável (FAANI), Formação Arbustiva Fechada não-Inundável (FAFNI) e Inundável (FAFI), Formação Florestal não-Inundável (FFNI) e Inundável (FFI) e Formação Herbácea não-Inundável (FHNI), Inundável (FHIL) e Inundada (FHIA) (MARTINS, 2012).

Alguns dos tipos vegetacionais são influenciados pelo afloramento constante do lençol freático (áreas inundadas) ou pelo afloramento do lençol freático apenas no inverno (áreas inundáveis) (SAMPAIO et al, 2005).

A Formação Herbácea é caracterizada pela sua aproximação com as faixas de praia (Figura 1), podendo ser atingidas pelas altas marés, ou encontra-se em depressões alagáveis como mostra a figura 2 (SEELIGER, 1992).



Figura 1. Formação Herbácea Não-Inundável da restinga de Guaibim, BA.



Figura 2. Formação Herbácea Inundável da restinga de Guaibim, BA.

A Formação Arbustiva Aberta (Figura 3) possui um aspecto comum representado por áreas onde a vegetação é constituída de moitas com extensão e altura variáveis e em meio as quais são encontradas áreas abertas, chamadas de entre moitas. Segundo Ribas et al. (1994) o termo moita, pode ser definido como

um aglomerado de plantas de porte arbustivo e/ou arbóreo, com copas separadas de outras plantas por áreas abertas. As entre moitas são constituídas por espécies herbáceas.



Figura 3. Formação Arbustiva Aberta Não-Inundável da restinga de Guaibim, BA.

A fisionomia da Formação Arbustiva Fechada varia entre arbustos misturados a trepadeiras, cactáceas e bromélias (Figura 4) (ARAUJO, 1992). Essa formação é identificada como uma faixa de transição entre a Formação Arbustiva Aberta e Florestal.



Figura 4. Formação Arbustiva Fechada Não-Inundável da restinga de Guaibim, BA.

A Formação Florestal (Figura 5) é variável nos seus aspectos florísticos e estruturais. Estas florestas variam desde formações com altura a partir de 5m, com ou sem inundações periódicas decorrentes da ascensão do lençol freático durante os períodos mais chuvosos, até formações mais desenvolvidas, com alturas em torno de 15-20m (CÉSAR; MONTEIRO, 1995).



Figura 5. Formação Florestal Não-Inundável da restinga de Guaibim, BA.

A flora das restingas, geralmente é caracterizada como um conjunto de pouca riqueza, quando comparada com outros tipos de vegetação do Brasil. Para alguns autores isso está relacionado com as condições de estresse encontradas nesse tipo de ambiente, relacionados principalmente à origem, natureza e dinâmica do substrato (RIZZINI, 1979; ARAUJO; HENRIQUES, 1984; SILVA, 1990).

2. Fungos Filamentosos

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos, unicelulares ou pluricelulares. Aqueles que são pluricelulares possuem estruturas filamentosas, chamadas de hifas, que em conjunto constituem o micélio. Na fase reprodutiva, o

micélio forma estruturas assexuadas e/ou sexuadas que originam os esporos, principais estruturas responsáveis pela propagação das espécies fúngicas (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Esses organismos são cosmopolitas, mas geralmente a umidade e temperatura elevadas são condições mais propícias para seu desenvolvimento (ALEXOPOULOS et al., 1996).

A mais recente classificação dos fungos foi baseada em estudos filogenéticos e proposta por micologistas especialistas nos diversos grupos (HIBBETT et al., 2007). Eles consideraram os seguintes filós: *Chytridiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Microsporidia*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Esses autores separaram *Zygomycota* em três subfilós (*Mucoromycotina*, *Kickxellomycotina* e *Zoopagomycotina*). Em 2012, Gryganskyi et al. descreveram um novo filo o *Entomophthoromycota*.

De acordo Kirk (2008) o número de espécies fúngicas que foram descritas é de aproximadamente 99.000 espécies, das 1,5 milhões estimadas no mundo. Mas, recentemente com base nas diferentes técnicas moleculares, a estimativa é de 5,1 milhões de espécies (TAYLOR et al, 2010; BLACKWELL et al., 2011). Dentro dessas espécies descritas, cerca de 13.800 existiriam no Brasil, representando 14 % da diversidade mundial (LEWINSOHN; PRADO, 2006).

Segundo Junior e Maia (2010), existem um maior número de registros das espécies de fungos em ordem decrescente na Mata Atlântica (1.664 spp.), Caatinga (734 spp.), Amazônia (519 spp.), Cerrado (291 spp.), Pantanal (28 spp.) e no Pampa (1 sp.).

Quanto as regiões do Brasil, a região Nordeste é que possui registro de maior diversidade de espécies fúngicas, com 1.749, seguida pela Sudeste com 1.411, Sul 1.320, Norte 743 e Centro-Oeste 296. A Bahia é o quarto estado com maior número de espécies (584 spp.) (JUNIOR; MAIA, 2010). Aproximadamente 30 % do material coletado e identificado no semi-árido da Bahia representam novos registros de ocorrência ou espécies novas (GUSMÃO; MAIA, 2006).

Infelizmente, devido à ação antropogênica, várias espécies de fungos estão sendo extintas antes mesmo de serem conhecidas, causando prejuízo para o equilíbrio ecológico, além de não se obter conhecimento do potencial biotecnológico dessas espécies.

3. Celulases

3.1 Fungos Celulolíticos

Durante a Segunda Guerra Mundial, nas regiões tropicais do Pacífico, os soldados das forças armadas norte-americanas relataram a frequente deterioração de fardas, barracas, bolsas e demais objetos dos acampamentos, fabricados a partir de algodão. A partir de então, os cientistas começaram a realizar pesquisas para descobrir os agentes causadores da deterioração, quais os mecanismos de ação utilizados e como controlá-los.

Diante do acontecimento, o Dr. Elwyn T. Reese iniciou as pesquisas, isolando uma linhagem de um fungo filamentoso, codificada como QM6a que excretava enzimas capazes de degradar celulose. Esse isolado foi identificado como *Trichoderma viride* e mais tarde passou a chamar-se *Trichoderma reesei* em homenagem ao Dr. Reese.

Os fungos filamentosos são bons decompositores de material vegetal, porque possuem um arsenal enzimático capaz de degradar compostos orgânicos complexos, tais como: celulose, hemicelulose, ácido aromática e algumas proteínas. Dessa forma, as plantas e outros fungos absorvem as substâncias degradadas garantindo a ciclagem de nutrientes (GUSMÃO et al., 1995).

Nesse contexto os fungos celulolíticos ocorrem em todos os ambientes, onde há acúmulo de resíduo lignocelulolítico. Geralmente interagem sinergicamente espécies celulolíticas e não celulolíticas e por meio dessa interação, a celulose é completamente hidrolisada, convertida à glicose e esta em dióxido de carbono e água, em condições aeróbicas (BEGUIN; AUBERT, 1994).

Os fungos filamentosos são utilizados há algum tempo como fonte de produção de muitos metabólitos e enzimas. Como secretam enzimas naturalmente, eles têm sido explorados comercialmente por essa capacidade. Os fungos filamentosos de maior interesse industrial incluem espécies dos gêneros *Aspergillus* spp. (*A. awamori*, *A. niger*, *A. orizae*, *A. nidulans*, *A. terreus*), *Penicillium* spp. (*P. decumbens*, *P. funiculosum*, *P. brasilianum*, *P. waksmanii*) e *Trichoderma* spp. (*T. reesei*, *T. harzianum*) (KARLSSON et.al, 2002).

Trichoderma reesei, é um dos principais produtores de celulases, e o microrganismo cujo sistema de celulases tem sido mais estudado. Ele produz pelo menos seis endoglucanases e duas celobiohidrolases ativas em diferentes fontes de celulose, cristalinas ou amorfas (KARLSSON et.al, 2002).

Outros fungos celulolíticos incluem as espécies *Neurospora crassa*, *Arthrographis cellulolyticum*, *Fusarium solani*, *Mucor circinelloides*, e *Sporotrichium pruinosum* (RABINOVICH et al., 2002a; SAHA, 2004).

3.2 Celulose

As plantas representam o maior reservatório de carbono e como a celulose é um dos seus principais componentes, sua degradação representa uma parte importante no ciclo do carbono.

A celulose tem função estrutural e é constituída por um polímero linear de subunidades de glicose, unidas por ligações β -1,4, onde a celobiose é a unidade repetitiva do polímero (Figura 6).

Durante a biossíntese da celulose, as cadeias individuais de glicose são unidas por forças de Van der Waals e por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares. Essas ligações conferem uma forma rígida com microfibrilas insolúveis e geralmente resistentes a hidrólise enzimática. As microfibrilas estão organizadas em paralelo com uma extremidade não redutora e outra redutora (Figura 6). Essa estrutura resulta em regiões altamente ordenadas e cristalinas, intercaladas por regiões amorfas (Figura 7) (MANSFIELD; MEDER, 2003; LAVOINE et al., 2012).

O grau de cristalinidade da celulose depende da sua origem. A maioria das celulosas comerciais como algodão, papel filtro, o grau de cristalinidade pode variar entre 30 – 70 %. As formas amorfas e solúveis como a carboximetilcelulose (CMC) são frequentemente empregadas por sua rápida taxa de hidrólise. Tanto as celulosas com elevado grau de cristalinidade quanto às celulosas amorfas, geralmente são utilizadas para avaliar os sistemas de celulases. Embora a CMC seja muito utilizada, ela não deve ser empregada como indutor universal, pelo fato de não ser hidrolisada por todas as enzimas presentes em fluídos de cultura celulolítica (BEGUIN; AUBERT, 1994).

A diversidade e a heterogeneidade de substratos de celulose acabam dificultando a ampliação de estudos enzimológicos (KUMAR; MURTHY, 2013).

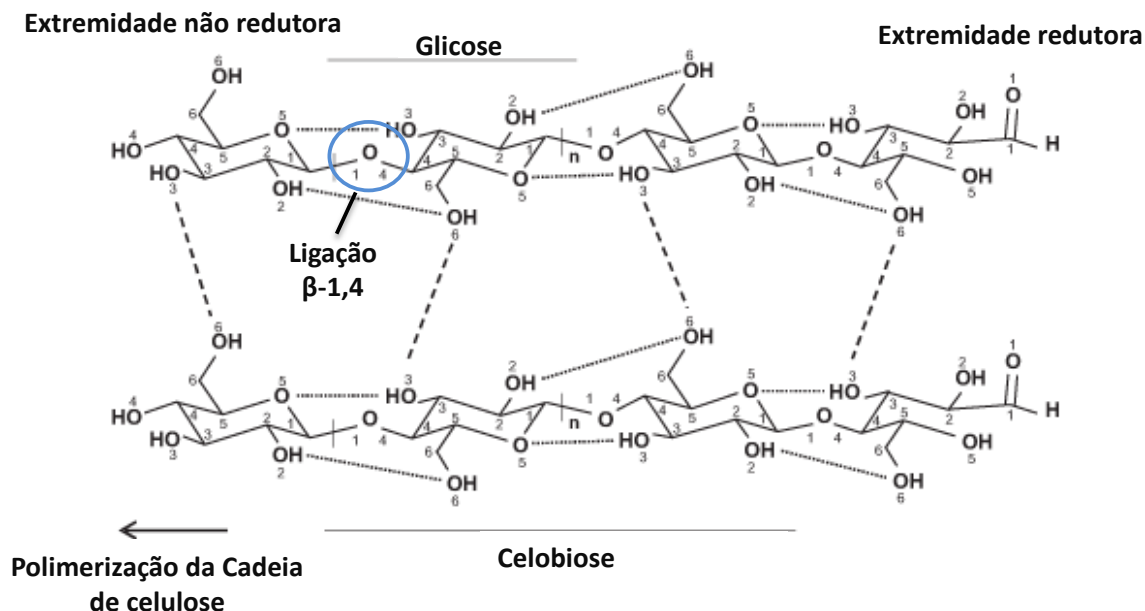


Figura 6. Ligação glicosídica entre duas unidades de β -D-Glicose; cadeia linear da celulose, formada por várias unidades consecutivas de celobiose; ligações de hidrogênio intra e intermolecular na estrutura molecular da celulose. Linhas tracejadas: Ligações de hidrogênio intermolecular. Linhas pontilhadas: Ligações de hidrogênio intramolecular (Modificado de Festucci-Buselli et al., 2007).

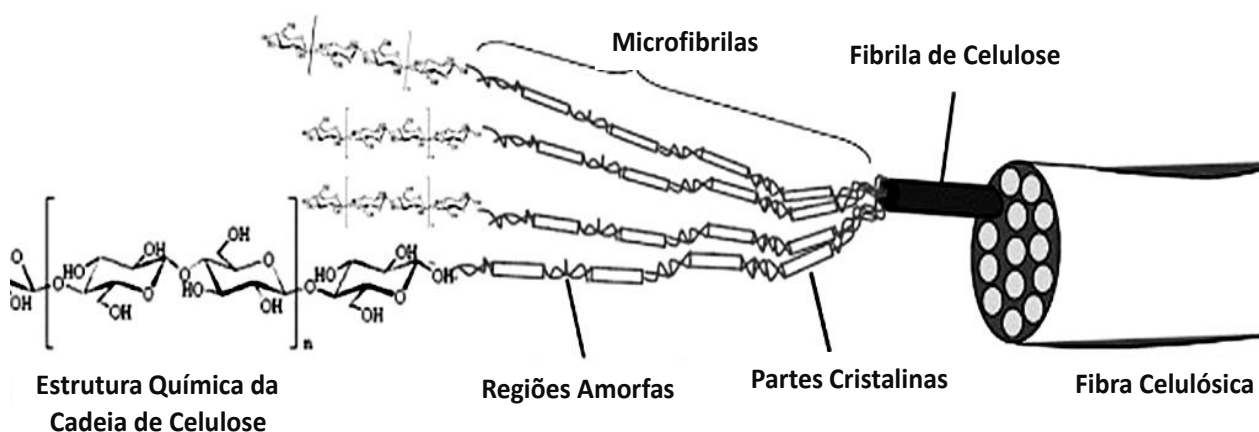


Figura 7. Detalhes da estrutura da fibra celulósica com ênfase sobre as microfibrilas de celulose (Modificado de Lavoine et al., 2012).

3.3 Características Bioquímicas

Celulase é formada por um sistema multienzimático, membro da família glicosil-hidrolases 61 (GH61) (HARRIS et al., 2010). Esse sistema é classificado em três principais classes de enzimas que agem sinergicamente: endoglucanases (EG); exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH I e CBH II) e β -glicosidases (Figura 8) (KUMAR; MURTHY, 2013).

As endoglucanases, denominadas 1,4-b-D-glucana-4-glucano-hidrolase, hidrolisam as ligações internas nas regiões amorfas no filamento de celulose, liberando oligossacarídeos com diferentes tamanhos e gerando novas cadeias que podem ser hidrolisada por exoglucanases (Figura 8). As regiões amorfas são mais facilmente hidrolisadas, porque possuem cadeias que não estão envolvidas com ligações de hidrogênio intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas, as quais são menos hidrolisadas por estas enzimas, devido ao maior grau de organização molecular (LYND et al., 2002; QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2013).

As celobiohidrolases são denominadas exo-1,4-b-D-glucanases. As CBHs I e CBHs II atuam na extremidade redutora e não redutora respectivamente da cadeia de celulose, liberando celobiose (Figura 8). As exoglucanases atuam sobre a celulose cristalina (Papel de filtro, algodão) (QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2013). Dos sistemas celulósicos melhor estudados, as CBHs I têm sido consideradas como as enzimas mais importantes a sacarificação eficiente da celulose. Estudos indicam que a atividade do complexo sobre o filamento de celulose cristalino pode ser reduzida em até 70 %, se o gene que codifica para produção de CBH I for removido (MEDVE, 1997).

As β -glicosidases são também conhecidas como celobiasas e possuem a função de hidrolisar a celobiose em duas moléculas de glicose (Figura 8). Essas enzimas são importantes na hidrólise da celulose pela remoção da celobiose do meio reacional, porque a celobiose é considerada um inibidor competitivo das celobiohidrolases (LYND et al., 2002).

Para ensaios de atividade de endoglucanase, alguns substratos são utilizados, como a carboximetilcelulose (CMC) (CMCase), considerada celulose amorfa. Enquanto os ensaios de atividade em substrato com regiões mais organizadas a exemplo do papel de filtro (Filter Paper Activity) (FPase), é

necessário um sistema celulásico completo (celobiohidrolases e endoglucanases). O papel de filtro é recomendado pela Comissão de Biotecnologia para se avaliar a atividade celulásica total (FPase) de um sistema celulásico. (MEDVE, 1997).

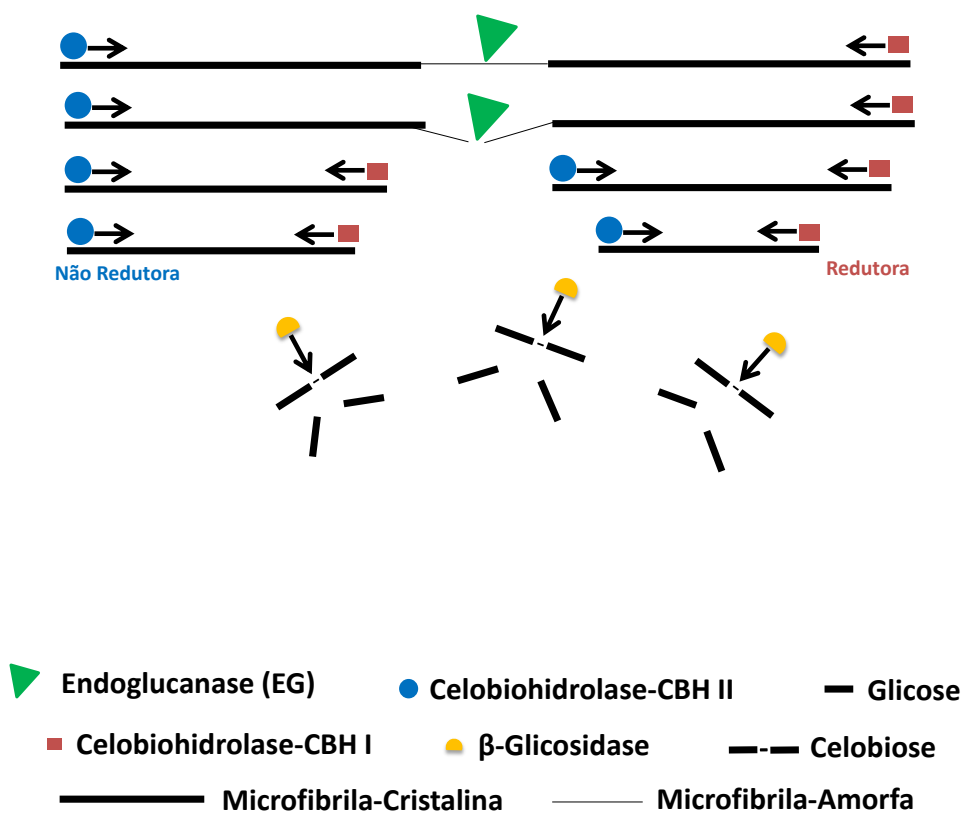


Figura 8. Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico. (Modificado de Lynd, et.al 2002).

3.4 Aplicações Biotecnológicas

Desde 1953, as décadas foram marcadas por muitos avanços em pesquisas sobre o sistema multienzimático que constitui as celulases. O início do século XXI foi marcado por grandes investimentos na produção de celulases, especialmente focada para sua aplicação na obtenção de etanol de segunda geração (RABINOVICH et al., 2002b).

Os avanços dos estudos sobre celulases ocorrem nas mais diferentes áreas do conhecimento. Contribuições científicas estão sendo gerados continuamente, quanto ao isolamento de microrganismos produtores de celulases; entendimento sobre os mecanismos de ataque à celulose; purificação e caracterização de componentes do sistema multienzimático; clonagem e

compreensão do controle da expressão gênica; determinação de estruturas tridimensionais das celulases; aumento da expressão e eficiência das celulases por mutações gênicas e a demonstração do potencial industrial dessas enzimas (RABINOVICH et al., 2002b; FESTUCCI-BUSELLI et al., 2007; ANTONELLA AMORE et al., 2012; QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2013).

Na década de 80, teve início a produção de celulases em escala industrial. Sua primeira aplicação foi como um aditivo para ração animal, de forma a aumentar a sua digestibilidade por ruminantes. Posteriormente, essas enzimas passaram também a ser utilizadas na indústria de alimentos, como exemplo em processamento de bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas (LYND et al., 2002).

Depois, as celulases começaram a ter diversas aplicações como: biopolimento que consiste na remoção enzimática de pilosidade dos tecidos ou malhas de algodão, tornando os tecidos mais lisos e macios; bioestonagem, processo de aspecto desbotado mais uniforme em jeans, em relação ao convencional (pois não causa grande degradação da fibra como a pedra-pomes); papel, para liberação de tintas da superfície das fibras a ser recicladas (COELHO, 2008).

Durante a década de 90, mais de 20 % do mercado mundial de enzimas era representado pelas celulases e hemicelulases. No cenário nacional em 2008, as celulases movimentaram em torno de USD 1,35 milhão, considerando apenas importações e exportações brasileiras (CASTRO, 2010).

Uma das aplicações emergentes das enzimas do complexo celulolítico é a hidrólise de biomassas. A matéria-prima de origem lignocelulósica, contém de 20 a 60% de celulose, que pode ser totalmente convertida em glicose, por ação enzimática. Em etapas seguintes, esse monossacarídeo pode ser utilizado para a obtenção de bioetanol uma das moléculas de maior interesse. Tais tecnologias se enquadram no conceito de biorrefinarias celulósicas, as quais visam o aproveitamento integral e integrado dos resíduos agroindustriais (BHAT, 2000).

REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Introductory Mycology. John Wiley e Sons, INC, New York. 4th ed, 869p. 1996.

ALMEIDA, J. R.; ZICKEL, C. S.; PIMENTEL, R. M. DE M. Caracterização e Espectro Biológico Da Vegetação do Litoral Arenoso Do Rio Grande Do Norte. Revista de Geografia. Recife: UFPE – DCG/NAPA, v. 24, no 1, jan/abr. 2008.

ALMEIDA, A. L.; ARAÚJO, D. S. D. Comunidades Vegetais do Cordão Arenoso Externo da Reserva Ecológica Estadual de Jacarepiá, Saquarema, RJ. Oecologia Brasiliensis, Rio de Janeiro, v. 3, p. 47-63. 1997.

AMORE, A.; PEPE, O.; VENTORINO, V.; BIROLO, L.; GIANGRANDE, C.; FARACO, V. Cloning and recombinant expression of a cellulase from the cellulolytic strain *Streptomyces* sp. G12 isolated from compost. Microbial Cell Factories, 11:164 2012.

ARAUJO, D. S. D.; LACERDA, L. D. A Natureza das restingas. rev. Ciência hoje. vol. 6 nº33. p. 42-48. 1987.

ARAUJO, D.S.D. Vegetation types of sandy coastal plains of tropical Brazil: a first approximation. In: Seeliger, U. (Ed.). Coastal Plant Communities of Latin America. San Diego: Academic Press, p. 337-347. 1992.

ARAUJO, D. S. D.; HENRIQUES, R. P. B. Análise florística das restingas do Estado do Rio de Janeiro. In: Lacerda, L. D. de *et al.* (orgs.). Restingas: Origem, Estrutura e Processos. Niterói, CEUFF. p. 159-194. 1984.

ASSUMPÇÃO, J.; NASCIMENTO, M. T. Estrutura e composição florística de quatro formações vegetais de restinga no complexo lagunar Grussaí/Iquipari, São João da barra, Rio de Janeiro, Brasil. Acta bot. Bras. v.14(3). p. 301-315. 2000.

BEGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiol. Rev. v. 13, pp. 25-58, 1994.

BHAT, M. K.; *Biotechnol. Adv.* 18, 355. 2000.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species? American Journal of Botany 98(3): 426–438. 2011.

BOURSCHID, K; REIS, A. Dinâmica da invasão de *Pinus elliottii* Engelm. em restinga sob processo de restauração ambiental no Parque Florestal do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. Biotemas, 23 (2): 23-30, junho de 2010.

BRASIL. Resolução do CONAMA n. 261, de 30 de junho de 1999. Define os parâmetros básicos para análise dos estágios sucessionais de vegetação de restinga para o Estado de Santa Catarina. 1999.

CARVALHO, D. A. DE; SÁ, C. C. Estrutura do estrato herbáceo de uma restinga arbustiva aberta na APA de Massambaba, Rio de Janeiro, Brasil. Rodriguésia 62(2): 367-378. 2011.

CASTRO, S. A carta de Pero Vaz de Caminha – O descobrimento do Brasil. Coleção L&PM Pocket, Porto Alegre, v. 326. 160p. 2009.

CASTRO, A. M. de. Produção, propriedades e aplicações de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. Química Nova. V.33, n. 1. P. 181-188, 2010.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D.; Tecnologia Enzimática, 1ª ed., EPUB: Rio de Janeiro, 2008.

COGLIATTI-CARVALHO, L.; FREITAS, A. F. N.; ROCHA, C. F. D.; VAN SLUYS, M. Variação na estrutura e na composição de Bromeliaceae em cinco zonas de restinga no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Macaé, RJ. Revista Brasileira de Botânica, 24(1): 1–9. 2001.

CORDAZZO, C. V.; STÜRMER, S. L. Ocorrência de Fungos Micorrízicos Arbusculares em *Panicum racemosum* (P.Beauv.) Spreng (Poaceae) nas Dunas Costeiras do Extremo Sul do Brasil. Revista Atlântica. 29(1): 65-68, 2007.

CORDEIRO, L. M. C.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Comparative studies of the polysaccharides from species of the genus *Ramalina*—lichenized fungi—of three distinct habitats. Phytochemistry. 63 (8): 967-975. 2003.

COSTA, C. S. B.; SEELIGER, U.; CORDAZZO, C. V. Aspectos da ecologia populacional do *Panicum racemosum* (Spreng) nas dunas costeiras do Rio

Grande do Sul, Brasil. Pp. 395-411 In: L. D. Lacerda; D. S. D. Araujo; R. Cerqueira; B. Turcq (Eds.) Restingas: Origem, Estrutura e Processos. CEUFF, Niterói. 1984.

DE ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J.; THOMAZ, L. D. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). *Revista Brasil. Bot.*, V.27, n.2, p.349-361, abr.-jun. 2004.

DE OLIVEIRA, J. R. G.; SOUZA, R. G. DE; SILVA, F. S. B. DA; MENDES, A. S. M.; YANO-MELO, A. M. O papel da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) autóctones no desenvolvimento de espécies vegetais nativas em área de dunas de restinga revegetadas no litoral do Estado da Paraíba. *Revista Brasil. Bot.*, V.32, n.4, p.663-670, out.-dez. 2009.

DIAS, E. J. R.; ROCHA, C. F. D. Os Répteis nas Restingas do Estado da Bahia: Pesquisa e Ações para a sua Conservação. Rio de Janeiro: Instituto Biomas Editoração Gráfica, 34p. 2005. Editora Neotrópica, São Paulo, SP. 2005.

EHRlich, P. R. A perda da diversidade – causas e consequências, p. 27-35. In: E. O. Wilson (Ed.). *Biodiversidade*. Rio de Janeiro. Nova Fronteira, 658p. 1997.

FESTUCCI-BUSELLI, R; OTONI, W. C.; JOSHI, C. P. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 19(1):1-13, 2007.

FRANCO, A. C.; VALERIANO, D. M.; SANTOS, F. A. M.; HAY, J. D.; HENRIQUES, R. P. B. e MEDEIROS, R. A. Os microclimas das zonas de vegetação da praia da restinga de Barra de Maricá. *In: Lacerda, L. D. de et al. (orgs.). Restingas: Origem, Estrutura e Processos*. Niterói, CEUFF. p. 413-425. 1984.

GRYGANSKYI, A. P.; HUMBER, R. A.; SMITH, M. E.; HODGE, K.; HUANG, B.; VOIGT, K.; VILGALYS, R. Phylogenetic lineages in *Entomophthoromycota*. *Persoonia* 30, 94–105. 2013

GUSMÃO, L. F. P.; MAIA, L. C. Diversidade e caracterização dos fungos do Semi-árido. *APN*, v.1. 219p. 2006.

GUSMÃO, L. F. P.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; SANTOS, V. D. Fungos associados à decomposição de folhas de *Aspidosperma polyneuron* Mull. Arg. e de *Cedrelela fissilis* Vell. *In Anais do IX Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo* (M.R.P., Noronha, coord.). SBSP, São Paulo, p.61-65. 1995.

HAGLER, A. N.; ROSA, C. A.; MORAIS, P.B.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Yeasts and coliform bacteria of water accumulated in bromeliads of mangrove and sand dune ecosystems of southeast Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*. 39: p.973-977, 1993.

HARRIS PV, WELNER D, MCFARLAND K, RE E, NAVARRO POULSEN JC, BROWN K, SALBO R, DING H, VLASENKO E, MERINO S: Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry*,49:3305–3316. 2010.

HIBBETT, D. S. et al. A Higher-level Phylogenetic Classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509-547. 2007.

JUNIOR, A. A. de C.; MAIA, L. C. Os fungos do Brasil. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Rio de Janeiro. v.1. p. 875, 2010.

KARLSSON, J. et. al. Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EGIII) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, Netherlands, v. 99, p.63-78, 2002.

KEMENES, A. Distribuição espacial da flora terrestre fanerogâmica do Parque Nacional Marinho de Abrolhos, BA. *Revista Brasileira de Botânica*, 26(2): 141–150. 2003.

KIRK P. M.; CANNON P. F.; DAVID J. C.; STALPERS J. A. (eds.) *Dictionary of the Fungi*, 11th ed. Wallingford: CABI Publishing. 2008.

KOSKEAND, R. E; GEMMA, J. N. Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Hawaiian SandDunes:Island of Kaua. *Pacific Science* vol. 50 ,n°.1:36-45,1996.

KUMAR, D; MURTHY, G. S. Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 6:63. 2013.

LAVOINE, N.; DESLOGES, I.; DUFRESNE, A.; BRAS, J. Microfibrillated cellulose- Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers* 90, 735-764, 2012.

LEITE, A. V. L.; ANDRADE, L. H. C. Riqueza de espécies e composição florística em um ambiente de duna após 50 anos de pressão antrópica: um estudo na Praia de Boa Viagem, Recife, PE – Brasil. *Biotemas* 17(1): 29-46. 2004.

LEWINSOHN T. M.; PRADO P. I. Síntese do conhecimento atual da biodiversidade brasileira. In: Lewinsohn T.M. (org.). Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2006.

LYND, L. R; WEIMER, P. J; VAN, Z. Y. L. W. H; PRETORIUS, I. S: Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66:506–577. 2002

MANSFIELD, S. D.; MEDER, R. Cellulose hydrolysis—the role of monocomponent cellulases in crystalline cellulose degradation, *Cellulose* 10 pp. 159–169. 2003.

MARTINS, M. L. L. Fitofisionomia das formações vegetais da Restinga da Área de Proteção Ambiental (APA) de Guaibim, Valença, Bahia, Brasil. *R. bras. Bioci.*, Porto Alegre, v. 10, n. 1, p. 66-73, jan./mar. 2012.

MEDVE, J. Cellulose Hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of celobiohydrolase I, II and endoglucanase II. Lund, Sweden, 49 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Department of Biochemistry, Lund University. 1997.

MELO, E. DE. Levantamento de espécies de *Coccoloba* (Polygonaceae) da restinga do estado da Bahia, Brasil, *sitentibus*, Feira de Santana, nº15 p 49-59, 1996.

MENEZES, C. M.; SANTANA, F. D.; SILVA, V. S. A.; SILVA, V. I. S.; ARAÚJO, D. S. D. Florística e fitossociologia em um trecho de restinga no Litoral Norte do Estado da Bahia. *Biotemas*, 25 (1), 31-38, março de 2012.

MENEZES, L. F. T. DE; ARAUJO, D. S. D de. Estrutura de duas formações vegetais do cordão externo da Restinga de Marambaia, RJ. *Acta Botanica Brasilica* 13(2): 223-235. 1999.

MMA/PPG 7. Projeto Parques e Reservas. Corredores Biológicos. Brasília. 1996.
MORAIS, P.B.; ROSA, C.A.; HAGLER, A.N. e MENDONÇA-HAGLER, L.C. Yeasts communities of the cactus *Pilosocereus arrabidae* as resources for larval and adult stages of *Drosophila serido*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 66: 313-317. 1994

NOVO, R. R. Biologia reprodutiva de *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae) em uma área de restinga no Estado de Pernambuco / Reinaldo Rodrigo Novo. – 2010. 47 f. il. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife, 2010.

PEREIRA, M. C. A.; CORDEIRO, S. Z.; ARAUJO, D. S. D. Estrutura do estrato herbáceo na formação aberta de *Clusia* do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 18(3): 677-687. 2004.

PEREIRA, O. J.; ARAÚJO, D. S. D. Análise florística das restingas dos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro. *In* F. A. Esteves e L. D. Lacerda (eds.). *Ecologia de restingas e lagos costeiros*, Macaé, p. 25–63. 2000.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E; FOLCH-MALLOL, J. L. Cap. 6. Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*, 2013.

RABINOVICH, M. L.; MELNICK, M. S.; BOLOBOVA, A. V. The structure and mechanisms of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry*, Moscow, v. 65, n. 8, p. 850-71, 2002a.

RIBAS, L. A.; HAY, J. D. e CALDAS-SOARES, J. F. Moitas de restinga: Ilhas ecológicas. *In*: ACIESP (org.). 3o Simpósio sobre Ecossistemas da Costa Brasileira. *Anais* v. 2. p. 79- 88. 1994.

RIZZINI, C. T. *Tratado de Fitogeografia do Brasil*. v. 2. São Paulo. HUCITEC EDUSP. 374 p. 1979.

ROSA, C. A.; MORAIS, P. B.; SANTOS, S. R.; PERES-NETO, P. R.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeast communities associated with different plant resources in sandy coastal plains of Southeastern Brazil. *Mycological Research*. 99: 1047-1054. 1995.

SAHA, B. C. Production, purification and properties of endoglucanase from newly isolated strains of *Mucor circinelloides*. *Process Biochemistry*, Oxford, v. 39, p. 1871-6, 2004.

SANTA-ROSA, V. G. Artigo de Conclusão de Curso. *Cnemidophorus abaetensis* como agente dispersor de *Byrsonima sericea* na restinga de Abaeté, Salvador, Bahia. Centro Universitário Jorge Amado, Salvador, 18p. 2009.

SANTOS, C. R.; MEDEIROS, J. D. A. A. ocupação humana das áreas de preservação permanente, vegetação fixadoras de dunas de Morro das Pedras, Santa Catarina - SC, Brasil. *Revista de Estudos Ambientais*, Blumenau, v. 5, n. 1, p. 22-41, 2003.

SANTOS, M.; ROSADO, S. C. S.; OLIVEIRA-FILHO, A. T. e CARVALHO, D. Correlações entre variáveis do solo e espécies herbáceo-arbustivas de dunas em revegetação no litoral norte da Paraíba. *Cerne* 6(1): 19-29. 2000.

SANTOS, O. M.; OLIVEIRA, N. C. e NOVAES, R. F. Observações preliminares sobre fungos micorizicos vesículo-arbusculares em plantas crescendo em dunas na Bahia. *Revista CERES*. 42 (240): 191-2021, 1995.

SEELIGER, U. Coastal foredunes of southern Brazil: physiography, habitats and vegetation. *In*: U. Seeliger (org.). *Coastal plant communities of Latin America*. New York. Academic Press. 367-381. 1992.

SILVA, M. C. M. da. Diversidade De Abelhas (Hymenoptera, Apoidea: Apiformes) Na Floresta Nacional - Flona - Da Restinga De Cabedelo, Paraíba – Brasil. Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil, 13 a 17 de Setembro de, São Lourenço – MG. 2009.

SILVA, S. M. Composição florística e fitossociologia de um trecho de floresta de restinga na Ilha do Mel, Município de Paranaguá, PR. Dissertação de Mestrado. Campinas. Universidade Estadual de Campinas. 146 p. 1990.

SOUZA, V. C.; CAPELLARI, JR., L. A vegetação das dunas e restingas da Estação Ecológica Juréia-Itatins. *In* O. A. V. Marques e W. Duleba (eds.). *Estação Ecológica Juréia-Itatins: ambiente físico, flora e fauna*. Holos, Ribeirão Preto, p. 103–114. 2004

STÜMER, S. L.; BELLI, M. M. Composition and seasonal variation of spore populations of arbuscular mycorrhizal fungi in dune soils on the island of Santa Catarina, Brazil. *Canadian Journal of Botany*. 72: 359-363, 1994.

SUGIYAMA, M. Estudo de florestas da restinga da Ilha do Cardoso, Cananéia, São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Botânica* 11: 119-159. 1998.

SUGUIO, K.; MARTIN, L. Geomorfologia das restingas. *In: ACIESP (org.). 2o Simpósio sobre Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira. Anais v. 3. p. 185-205. 1990.*

TAYLOR, D. L.; HERRIOTT, I. C.; STONE, K. E; MCFARLAND, J. W.; BOOTH, M. G.; LEIGH, M. B. Structure and resilience of fungal communities in Alaskan boreal forest soils. *Canadian Journal of Forest Research* 40 : 1288 – 1301. 2010.

TAVARES, S. R. L. Uso de leguminosas Arbóreas submetidas a inoculações com rizóbios e micorrizas arbusculares para revegetação do solo de restinga degradado. *Dissertação de Mestrado. Agronomia, UFRRJ. Seropedica. 1998.*

ULE, E. A vegetação de Cabo Frio. *Boletim Geográfico* 200: 21-32. 1967.

CAPÍTULO 1

**Comunidade de Fungos Filamentosos Celulolíticos da Formação
Arbustiva Aberta da Restinga de Guaibim**

Será submetido à revista **Fungal Diversity**
An International Journal of Mycology

Comunidade de Fungos Filamentosos Celulolíticos da Formação Arbustiva Aberta da Restinga de Guaibim, Bahia

Jackeline P. Andrade; Rodrigo P. do Nascimento
Phellippe A. S. Marbach; Jorge T. de Souza

Resumo

A microbiota celulolítica do solo é um dos componentes dos ecossistemas que desempenham importante papel na decomposição da matéria orgânica. No entanto, pouca atenção tem sido dada a sua diversidade, principalmente quando se trata do ecossistema restinga. O objetivo deste trabalho foi estudar a estrutura e composição da comunidade de fungos filamentosos celulolíticos das moitas e entre moitas da Formação Arbustiva Aberta da restinga de Guaibim, BA. Foram coletadas 16 amostras de solo das moitas e entre moitas. O isolamento foi realizado pela técnica das diluições seriadas. Todos os isolados foram quantificados e posteriormente separados por gêneros. Em seguida foi realizado o estudo de variabilidade genética pela técnica Rep-PCR, paralelo a identificação morfológica. Apenas um representante de cada espécie foi sequenciado. Os parâmetros ecológicos foram calculados para a microbiota das entre moitas e das moitas. Com um isolado de cada espécie foi realizada a caracterização da enzima celulase e análise da taxa de crescimento. O número de UFC/g nas moitas foi significativamente maior que nas entre moitas. Foi observado que existe uma tendência em separar moitas de entre moitas. Nos 16 pontos, foram obtidos 190 isolados, distribuídos em 16 gêneros e 43 espécies. Foram encontradas quatro prováveis espécies novas. A média da taxa de crescimento das espécies encontrada apenas nas moitas não foi significativamente maior do que aquelas que ocorreram apenas nas entre moitas. De maneira geral, a maioria dessas espécies teve uma atividade celulase baixa. Esse trabalho representa a primeira contribuição para o conhecimento dos fungos celulolíticos da restinga.

Palavras-chaves: celulase, Rep-PCR, solo, ecossistema

Jackeline P. Andrade; Phellippe A. S. Marbach; Jorge T. de Souza
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia,
Campus Cruz das Almas, Bahia, Brasil
e-mail: jackelineandrade@hotmail.com; phmarbach@hotmail.com; jgeteodoro@gmail.com

Rodrigo P. do Nascimento
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, Brasil
e-mail: rpn1978@gmail.com

Introdução

Restingas são formações vegetais que tiveram origem no quaternário e estão incluídas no bioma Mata Atlântica. No litoral brasileiro, as restingas apresentam grande diversidade fisionômica e florística caracterizando tipos particulares de formações vegetais (Menezes e Araújo 1999).

A formação vegetacional arbustiva aberta das restingas brasileiras ficam próximas à praia e apresentam geralmente um aspecto de mosaico, pela ocorrência de áreas onde a vegetação é predominantemente um conjunto de moitas com extensão e forma variadas, em meio às quais existem áreas abertas, as entre moitas. Nas regiões de entre moitas a vegetação esparsa deixa o solo exposto, sendo formadas por espécies que suportam as condições adversas deste ambiente, como as altas temperaturas (Ribas et al. 1994).

O solo deste ambiente é arenoso e pobre em nutrientes minerais, colocando a microbiota do solo numa posição central, pois os fungos celulolíticos regulam a degradação da matéria orgânica e a transformação dos nutrientes, além de serem um indicador da qualidade do solo (Tólota 2002). Em geral, esses fungos ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos.

Embora se reconheça a importância da microbiota celulolítica do solo como componente de ecossistemas e o papel que desempenham em ciclos biogeoquímicos associados à manutenção da biosfera, pouca atenção tem sido dada aos estudos sobre sua diversidade, principalmente estudos relacionados ao ecossistema restinga. O conhecimento desta microbiota, além de fundamental para o levantamento taxonômico das populações que ali se encontram, pode levar ao descobrimento de processos metabólicos utilizados por estes organismos,

tornando-se importante para interações ambientais e aplicações biotecnológicas (Lynch et al. 1981).

Considerando o exposto acima os objetivos deste trabalho, foram estudar a estrutura e composição da comunidade de fungos filamentosos celulolíticos das moitas e entre moitas da Formação Arbustiva Aberta da restinga de Guaibim, BA.

Materiais e Métodos

Área de Estudo

A Área de Proteção Ambiental (APA) do Guaibim, localizada no município de Valença-BA, foi criada pelo decreto nº 1.164 de 11 de maio de 1992, por apresentar remanescentes de Mata Atlântica (DECRETO 1.164) (Bahia 1992). A APA define o limite norte do Corredor Central da Mata Atlântica (Ayres et al. 2005). Com área estimada em 2.000 ha, essa unidade de conservação abriga uma vegetação representativa de restinga tanto pela área quanto pela diversidade de formações e espécies vegetais.

A porção norte da Vila do Guaibim, Praia de Taquari, não está incluída na APA do Guaibim (Fig. 9). No extremo sul da APA está localizada a Ponta do Curral que abriga um atracadouro de onde os turistas podem embarcar com destino à Ilha de Cairu, Gamboa e Morro de São Paulo. Entre as Praias de Taquari e a APA localiza-se a Vila do Guaibim, com extensão de 4,6 km e cerca de 5.000 habitantes. Essa região é destacada pela crescente demanda turística com diversos estabelecimentos destinados a esse setor, como pousadas e restaurantes.

A proximidade com regiões amplamente freqüentadas por turistas, como Morro de São Paulo, Ilha de Itaparica e as Praias do Guaibim e Taquari, vem despertando o interesse de grandes empresários pela restinga. Os principais conflitos ambientais na APA são: o lançamento de esgoto doméstico nos corpos hídricos, deposição de lixo, desmatamento devido a expansão imobiliária, abertura de estradas, monocultura, criação de gado.

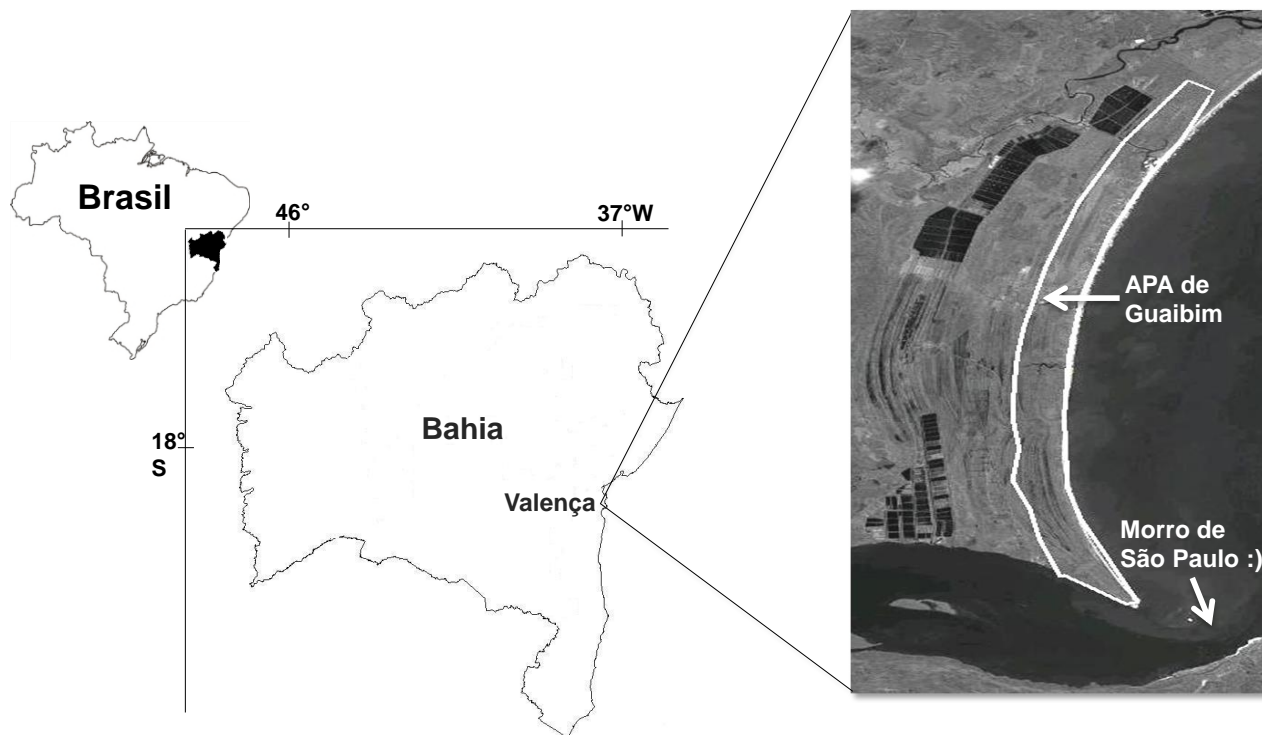


Fig. 9 Mapa de localização da Área de Proteção Ambiental (APA) do Guaibim. Fonte: Google Earth.

Coleta das amostras de solo

As amostras de solo foram obtidas de oito moitas e oito entre moitas da Formação Arbustiva Aberta (FAA) da restinga de Guaibim, totalizando 16 pontos de coleta (Fig. 10). Esses pontos foram amostrados duas vezes, a primeira nos meses de outubro (2009) a janeiro (2010) e a segunda nos meses de janeiro a abril de 2011. Na primeira amostragem, a cada mês foram coletadas amostras de solo de duas moitas e duas entre moitas, totalizando 4 amostras por coleta, desse modo durante os quatro meses, foi possível amostrar os 16 pontos. Foi realizado exatamente o mesmo na segunda amostragem.

As amostras de solo da região entre moita foram coletadas ao redor das moitas amostradas sendo constituídas 10 sub-amostras, constituindo uma amostra composta e as amostras das moitas foram coletadas do seu maior eixo e também constituídas por 10 sub-amostras (amostra composta) (Fig. 10). Também foram realizadas as medidas das distâncias entre os locais amostrados (Fig. 11), georreferenciamento e registro fotográfico de cada região (Fig. 12).

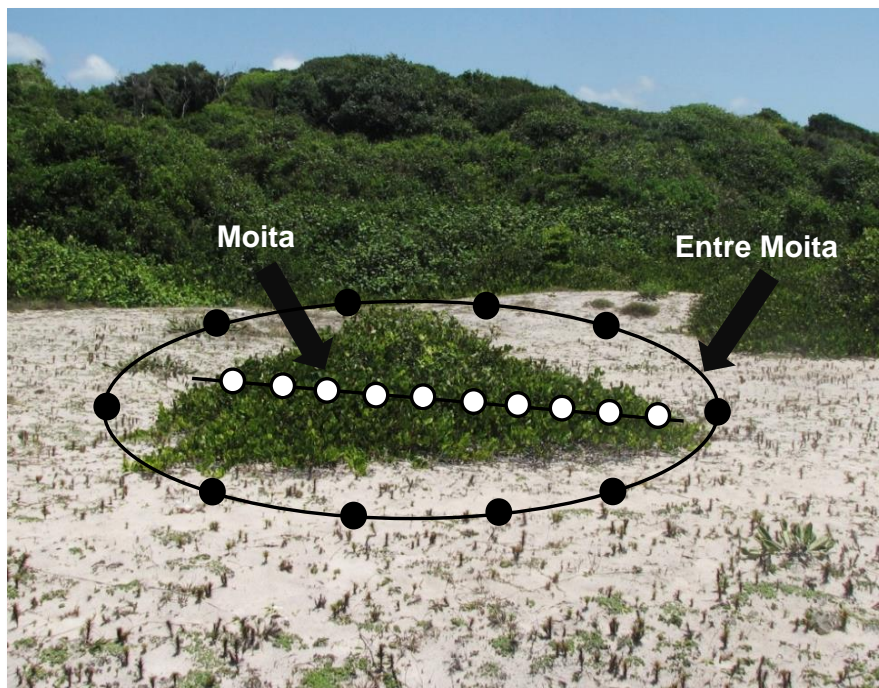


Fig. 10 Identificação das Moitas e Entre Moitas

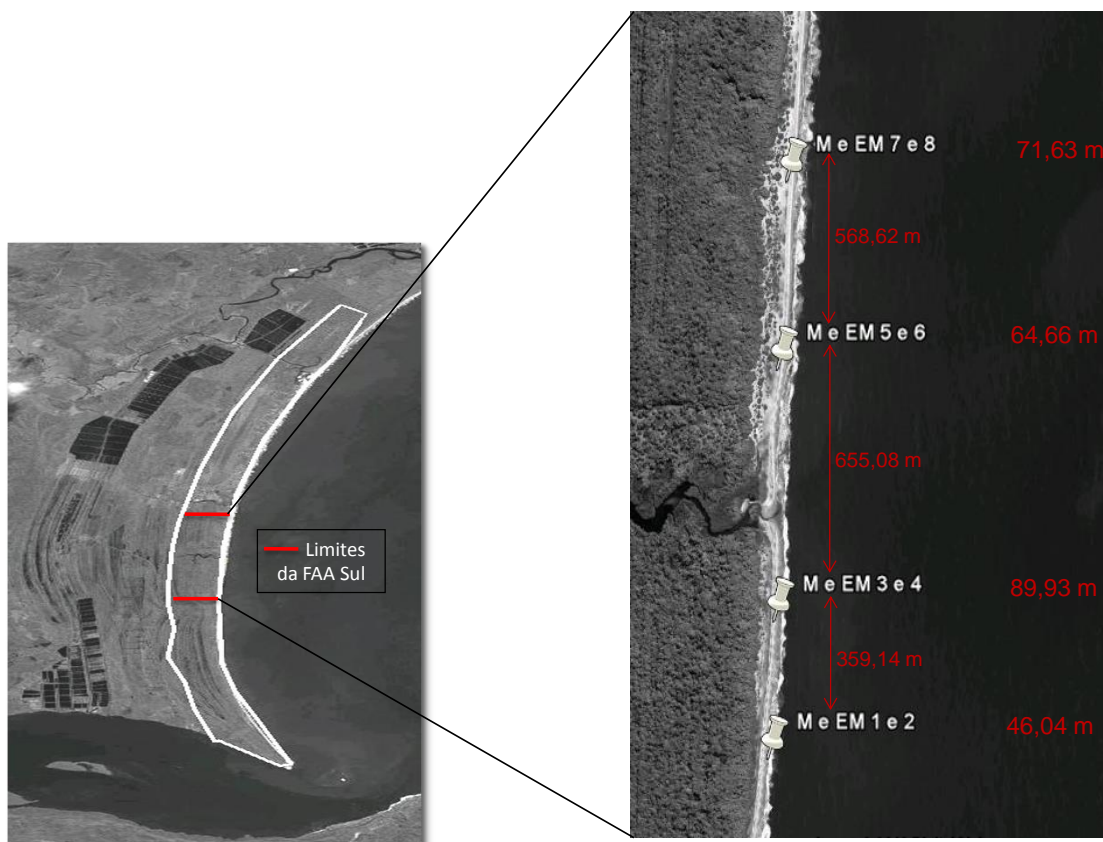


Fig. 11 Distribuição espacial das Moitas (M) e Entre Moitas (EM) amostradas e as medidas das distâncias entre elas. Fonte: Google Earth



Me EM 1: S 13°18'56.6" W 38°58'00.5"



Me EM 2: S 13°18'55.1" W 38°58'00.5"



Me EM 3: S 13°18'43.4" W 38°57'59.3"



Me EM 4: S 13°18'40.5" W 38°57'59.2"



Me EM 5: S 13°18'19.2" W 38°57'58.4"



Me EM 6: S 13°18'17.1" W 38°57'58.6"



Me EM 7: S 13°18'05.9" W 38°57'57.1"



Me EM 8: S 13°18'03.1" W 38°57'56.8"

Fig. 12 Locais das coletas de todas as amostras de solo georreferenciados: Moitas (M) e Entre Moitas (EM)

Isolamento dos Fungos Celulolíticos

Para o isolamento dos fungos, foi adotada a Técnica das Diluições Seriadas, até a diluição 10^{-3} . Em seguida alíquotas de 0,5 mL dessa diluição foram transferidas para placas em triplicata contendo meio seletivo de celulose (Breccia et al. 1995) (g/L): NaNO_3 (1,2), KH_2PO_4 (3,0), K_2HPO_4 (6,0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,05), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001), $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01), Extrato de Levedura (3,0), ágar (15), Clorafenicol (0,05) e celulose microcristalina (única fonte de carbono) (10). As placas foram incubadas a 28°C , por 10 dias (Fig. 13). Após esse período foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) e observação da ocorrência de isolados com características bem definidas (morfortipos) para análise de similaridade.

Este procedimento foi repetido para a mesma amostra de solo até que apenas 20 % dos fungos obtidos em um novo isolamento da amostra não tinham sido isolados previamente, indicando que foi feita uma amostragem de pelo menos 80 % dos fungos celulolíticos presentes na mesma amostra de solo capazes de crescer nas condições de cultivo descritas. Cada morfortipo distinto foi transferido para duas placas de Petri contendo Agar Extrato de Malte (20 %) (g/L): Extrato de Malte (6) e Ágar (15) e incubados por 10 dias a 28°C , de onde foram fotografados e armazenados pelo método de Castellani (1967).

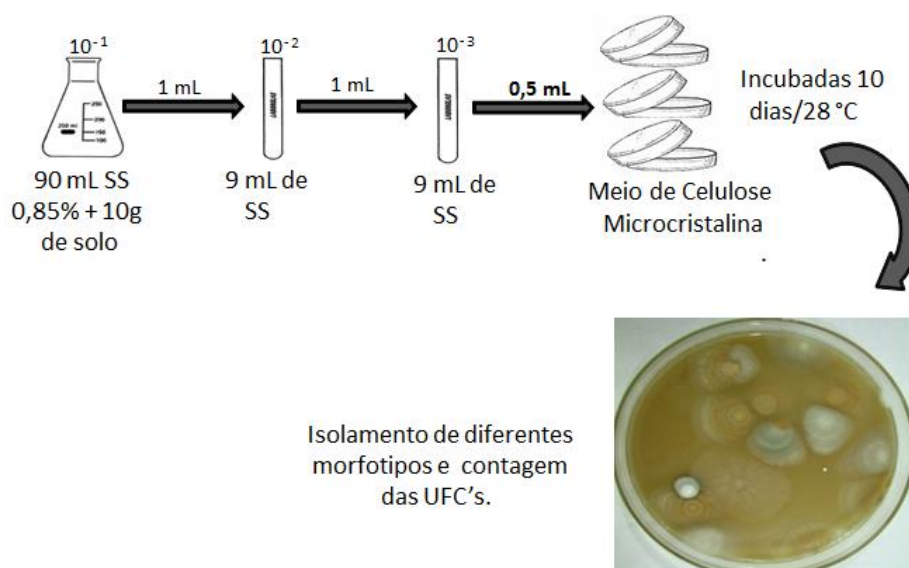


Fig. 13. Procedimento da Diluição Seriada.

Identificação Morfológica

Todos os isolados fúngicos foram primeiramente agrupados em gêneros por meio da técnica de microcultivo em lâmina. Posteriormente, os isolados de cada gênero foram identificados morfológicamente em nível de espécie, analisando características macroscópicas como diâmetro, coloração e o reverso da colônia e microscópicas como o comprimento e forma dos conidióforos, forma, textura e tamanho dos conídios. Para a identificação das espécies do gênero *Aspergillus* foram utilizados os meios de cultura CYA (Czapek Yeast Extract Agar) nas temperaturas de 25 e 37 °C e MEA (Malt Extract Agar) a 25 °C e as espécies de *Penicillium* nos meios de CYA a 5, 25 e 37 °C, MEA a 25 °C e G25N (25 % glycerol nitrate agar) a 25 °C. A identificação desses isolados foi realizada de acordo com Klich e Pitt (2002), Klich (2002), Pitt (1988), Raper et al. (1949), Barnett e Hunter (1999), Raper e Fennel (1965).

Extração de DNA e Estudo de Variabilidade Genética dos isolados

Os isolados foram cultivados em meio de malte líquido 20 %, por 5 dias a 28 °C. Em seguida o micélio foi coletado, liofilizado e preservado a -20 °C para extração de DNA pelo método Doyle e Doyle (1990) adaptado. Para a análise de variabilidade genética foi utilizada a técnica Rep-PCR, baseado na amplificação de elementos de DNA repetitivos o ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), REP (Repetitive Extragenic Palindromic) e elementos BOX PCR. Na amplificação do elemento BOXA foi utilizado o *primer* BOXA 1R (5'- CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') (Louw et al. 1999), do elemento REP os *primers* REP 1R (5'- III ICG ICG ICA TCI GGC-3') e REP 2R (5'- ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3') (Louw et al. 1999) e do ERIC os *primers* ERIC 1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') e ERIC 2R (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') (Hulton et al. 1991). As reações e os programas das PCRs estão descritos nas tabelas 1 e 2 respectivamente. Os fragmentos amplificados pelos elementos descritos anteriormente foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,0 % e em seguida os géis foram fotografados. O programa FREETREE (Hampl et

al. 2001), foi utilizando para construção do dendrograma empregando-se o coeficiente de Jaccard e o método UPGMA.

Tabela 1 - Reações das PCRs (reação final de 25 μ L)

Reagentes	BOX	REP	ERIC	β -tubulina, ITS1 e 4
Tampão 5X (μ L)	5,0	5,0	5,0	5,0
MgCl₂ (50 mM)	6,0	4,0	2,0	2,0
dNTPs (2,5 mM)	7,1	8,0	8,0	2,0
Taq polimerase (5 U/ μ L)	0,4	0,4	0,4	0,4
Primer 1 (10 pmol/ μ L)	5,0	3,0	3,0	0,8
Primer 2 (10 pmol/ μ L)	-	3,0	3,0	0,8
DNA (μ L)	1,5	1,5	1,5	2,0
Água (μ L)		0,1	2,1	12,1

Tabela 2 – Programas das PCRs

	Desnaturação Inicial	Ciclos (x)	Extensão Final
BOX	95 °C-5'	10x- 94°C-1'; 40°C-30"; 72°C-1' 30x- 90°C-1'; 48°C-30"; 72°C-1'	72 °C-10'
REP	94 °C-5'	40x - 94°C-1'; 40°C-1'; 72°C-4'	72 °C-10'
ERIC	94 °C-5'	40x - 94°C-1'; 52°C-1'; 72°C-8'	72 °C-10'
β-tubulina (<i>Penicillium</i>)	94 °C-4'	35x - 94°C-1'; 60°C-1'; 72°C-2'	72 °C-7'
β-tubulina (<i>Aspergillus</i>)	94 °C-3'	35x - 94°C-30"; 58°C-45"; 72°C-1'30"	72 °C-5'
ITS 1 e 4	94 °C-2'	15x - 94°C-2'; 65°C-30"; 72°C-1' 35x - 94°C-30"; 48°C-30"; 72°C-1'	72 °C-10'

Amplificação e Sequenciamento

A amplificação e sequenciamento das espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* foram realizados com fragmento do gene β -tubulina, utilizando os *primers* BT2a (5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3') e BT2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3') (Glass e Donaldson 1995) e dos demais gêneros foram amplificados e sequenciados com a região ITS (espaçador interno transcrito), com os *primers* ITS1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Glass e Donaldson 1995). As reações

e os programas da PCR estão descritos na tabela 1 e 2 respectivamente. Os produtos da PCR foram sequenciados através do método de Sanger et al. (1977), no sequenciador do tipo ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). As sequências foram editadas no programa Sequencher 4.1 (Gene Codes, Madison, WI, U.S.A.).

Caracterização molecular e análises filogenéticas

A identificação molecular, foi realizada utilizando o programa BLASTN (Altschul et al. 1997) para comparar as sequências obtidas de cada isolado com outras nos bancos de dados públicos. Essas sequências obtidas foram incluídas nas análises para fins de comparação. O alinhamento e edição das sequências foram realizados no programa MEGA 5.2 (Tamura et al. 2011). As árvores filogenéticas foram geradas no mesmo programa utilizando o método de Máxima Verossimilhança, com análises de bootstraps com 100 repetições.

Cálculo dos parâmetros ecológicos

Abundância Relativa (AR) de cada espécie foi calculada conforme o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) total de cada espécie / Σ do número de UFC de todas as espécies x 100. Para a Frequência de Ocorrência (FO) foi calculado o número de locais que as espécies foram encontrados / Σ de locais amostrados x 100. As Classes de Frequência de Ocorrência (FO) foram determinadas segundo Matteucci e Colma (1982), onde $FO \geq 70\%$ - Muito Frequente (MF); $40\% \leq FO < 70\%$ - Frequente (F); $10\% \leq FO < 40\%$ - Pouco Frequente (PF) e $FO < 10\%$ Esporádica (E). Para o cálculo da FO nas Moitas e Entre Moitas foi considerado o número total de pontos amostrados (n=16), apenas nas Moitas n=8 e apenas nas Entre Moitas n=8. A Frequência Absoluta (FA) foi calculada contando o número de vezes que cada espécie ocorreu nos locais amostrados. Esses parâmetros foram calculados para a microbiota celulolítica das Entre Moitas, das Moitas de ambas regiões.

Verificação do Potencial Celulolítico das Espécies Diferentes

As espécies diferentes foram ativadas em meio de Malte 20 % por 10 dias a 28 °C. Posteriormente foi retirado um disco de 15 mm do meio com o fungo e transferido para Erlenmeyers de 1000 mL contendo 240 mL do meio de Mandels e Weber (1969) constituído por (g/L): K_2HPO_4 (2), $(NH_4)_2SO_4$ (1,4), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,3), $CaCl_2$ (0,3), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,005), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (0,00156), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,0014), $CoCl_2$ (0,002), Extrato de Levedura (3,0) e suplementado com 2,4 g de Papel Filtro (gramatura 90 g/m²), cortado (1 x 1cm). Em seguida os Erlenmeyers foram incubados em agitador a 150 rpm e 28 °C por 6 dias. Diariamente alíquotas de 3,5 mL foram coletadas, centrifugadas a 4500 rpm/4 °C e analisadas quanto a produção de proteínas totais, endoglucanase (CMCase) e exoglucanase (FPase).

Determinação da Concentração de Proteínas Totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976), adicionando 1 mL do reagente Bradford a 100 µL da solução protéica e a absorbância da solução medida a 595 nm. A concentração das proteínas foi determinada contra uma curva de calibração baseada em soro albumina bovina como padrão.

Determinação da Atividade Endoglucanase (CMCase) e Exoglucanase (FPase)

A atividade de CMCase foi determinada por meio da quantificação dos açúcares redutores produzidos durante a incubação da mistura reacional (0,6 mL do extrato enzimático e 0,6 mL da solução 2,0 % de carboximetilcelulose – CMC – em tampão Citrato de Sódio 50 mM (pH 4,8) a 50 °C por 20 min (Ghose 1987), pelo método do Ácido Dinitrosalicílico (Miller 1959). A leitura das atividades foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e os resultados apresentados em U.L⁻¹,

onde cada unidade (U) corresponde a quantidade de μ moles de açúcares redutores liberados por minuto.

A atividade de FPase foi determinada por meio da quantificação dos açúcares redutores da mesma amostra produzidos durante a incubação da mistura reacional (0,5 mL do extrato enzimático, 1,0 mL do tampão Citrato de Sódio 50 mM (pH4,8) e 50 mg de Papel Filtro (gramatura 90 g/m²) a 50 °C por 60 min (Ghose 1987), pelo mesmo método supracitado. A leitura das atividades foi realizada em espectrofotômetro a 550 nm e os resultados também apresentados em U.L⁻¹.

Determinação da taxa de crescimento dos isolados

Discos de micélio de 8 mm de diâmetro foram retirados da cultura pura de cada isolado, transferido para três placas contendo o meio de celulose e incubadas a 28 °C. O diâmetro das colônias foi medido a cada 24 h por 10 dias.

Análise de similaridade e correlação

A análise de similaridade foi realizada entre os isolados e as regiões amostradas. A análise foi realizada no programa Fitopac 1 software (Shepherd 1995), utilizando o coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA.

Análises de correlação foram realizadas no programa BioEstat 5.3 (Ayres et al. 2007) entre a taxa de crescimento x frequência absoluta, taxa de crescimento x CMC_{case}, taxa de crescimento x FPase, proteína total x FPase, proteína total x CMC_{case}, FPase x CMC_{case}, frequência absoluta x FPase, frequência absoluta x CMC_{case}. Para o conjunto de dados que apresentaram distribuição normal foi utilizado o coeficiente de *Pearson* e aqueles que não apresentaram utilizou-se o coeficiente de *Spearman*. Para observar a normalidade dos dados utilizou-se o programa R 3.0.1 (R Development Core Team 2008).

As médias das densidades populacionais, taxas de crescimento e atividade enzimática dos isolados de moitas e das entre moitas, foram comparados realizando o teste T no programa BioEstat 5.3 (Ayres et al. 2007).

Resultados

Composição da microbiota celulolítica das moitas e entre moitas

Na análise em conjunto dos dados de ambas amostragens, o número médio das Unidades Formadoras de Colônias por grama de solo (UFC/g) nas moitas (44.333,0 UFC/g) foi significativamente maior que nas entre moitas (31.162,2 UFC/g) pelo teste T a 5 % de probabilidade ($P=0,043$) (Fig. 14). A média das UFCs das entre moitas 1, 2, 3 e 4 também foi significativamente maior (43.916,5 UFC/g), quando comparada com a média das demais entre moitas (18.408,5 UFC/g) pelo teste T a 5 % de probabilidade ($P=0,0034$).

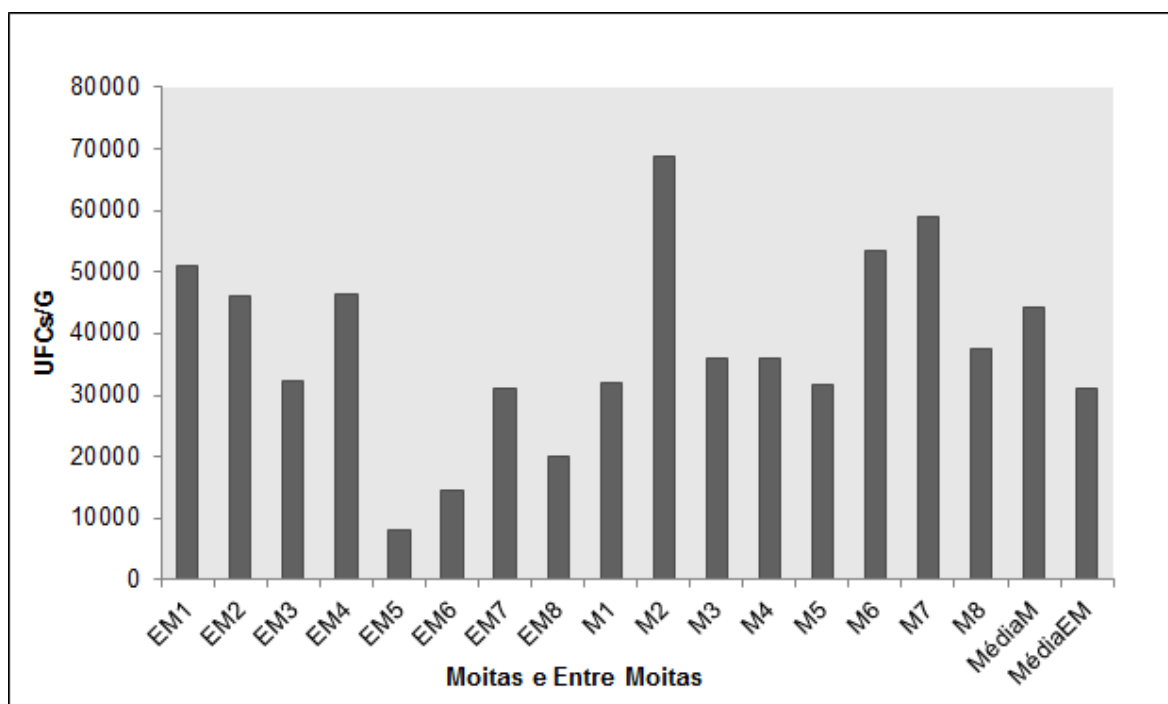


Fig. 14 Unidades Formadoras de Colônias totais por grama de solo (UFC/G) nos pontos de coleta das moitas (M) e entre moitas (EM).

A análise de similaridade da micobiota celulolítica foi realizada entre as regiões amostradas na primeira, na segunda e em ambas amostragens. Na primeira amostragem observa-se uma tendência de separação entre as regiões moita e entre moita. A maior similaridade nas entre moitas foi observada entre as entre moitas 1 e 2 e nas moitas a maior similaridade foi ente as moitas 1, 3 e 5 (Fig. 15).

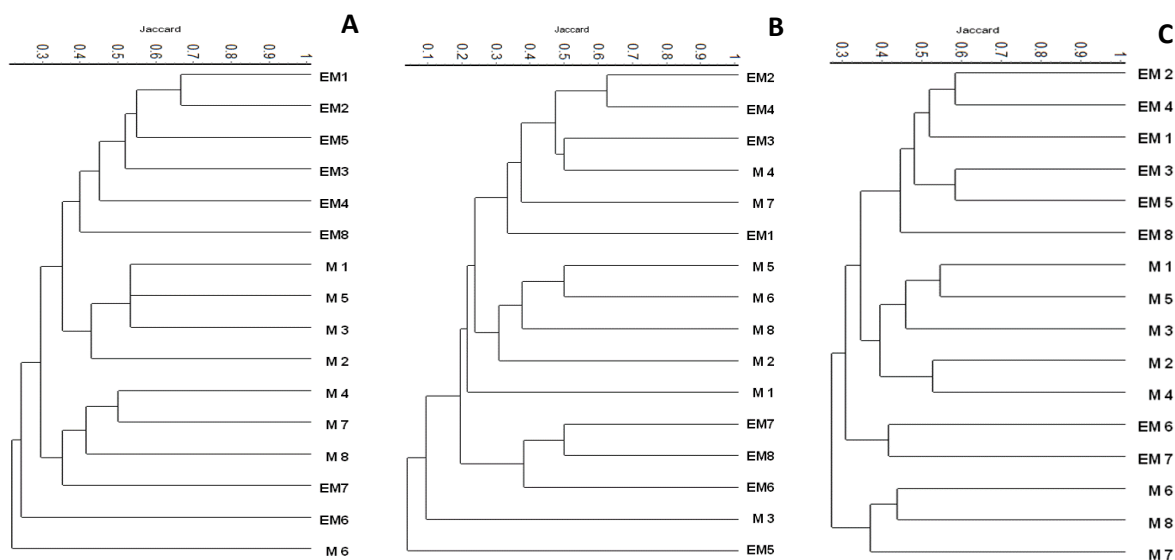


Fig. 15 Dendrogramas de similaridade entre os pontos de coleta amostrados (Moitas - M e Entre Moitas EM). **A-** Primeira amostragem; **B-** Segunda amostragem; **C-** Ambas amostragens. O agrupamento foi feito pelo método UPGMA e coeficiente de Jaccard. Índice de correlação cofenética 0,78.

Na segunda amostragem, como pode ser observada na fig. 15 B, a similaridade entre os pontos foi diferente daquela observada no dendrograma da primeira amostragem. A maior similaridade nessa amostragem nas moitas foi entre as moitas 5 e 6 e a entre moita 2 e 4. Ao analisar o dendrograma das duas amostragens (Fig. 15 C), observa-se que existe uma tendência em separar moitas de entre moitas. A maioria das moitas formou um grupo distinto das entre moitas.

Nos 16 pontos amostrados duas vezes, foram obtidos 190 isolados fúngicos celulolíticos. Nas oito Moitas (M) ocorreram 50,52 % desse total de isolados e nas oito Entre Moita (EM) 49,48 % (Fig. 16).

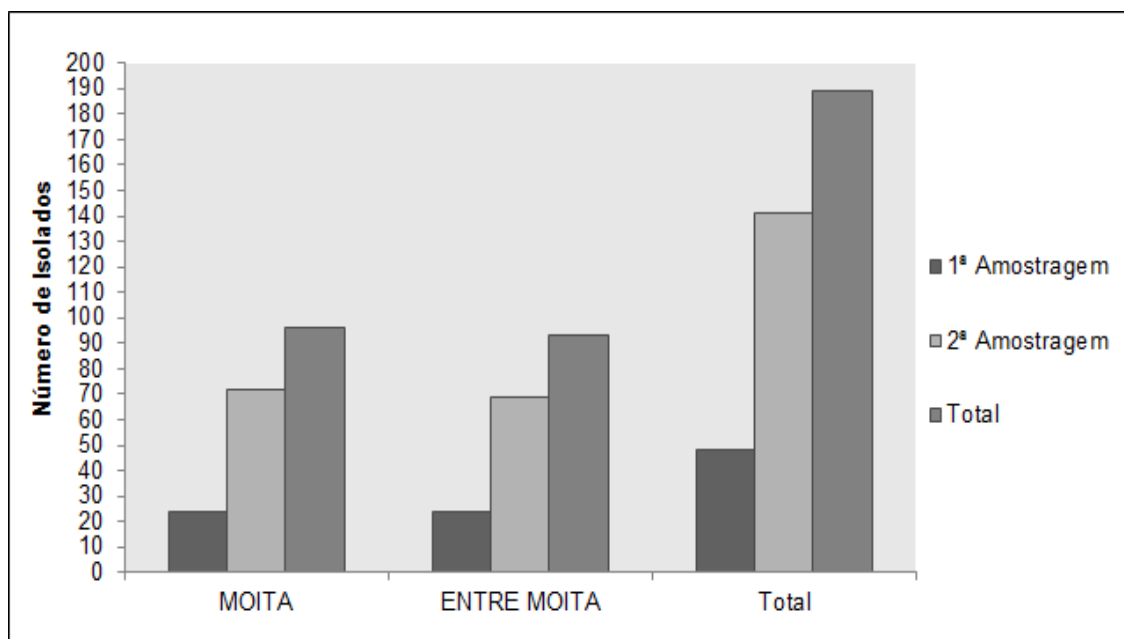


Fig. 16 Número de isolados por amostragens de cada Moita, Entre Moita e do total.

Todos os isolados primeiramente foram separados por gêneros utilizando a identificação morfológica. Foram identificados 16 gêneros e os mais representativos foram *Penicillium* e *Aspergillus* com 63 e 55 isolados respectivamente (Fig. 17).

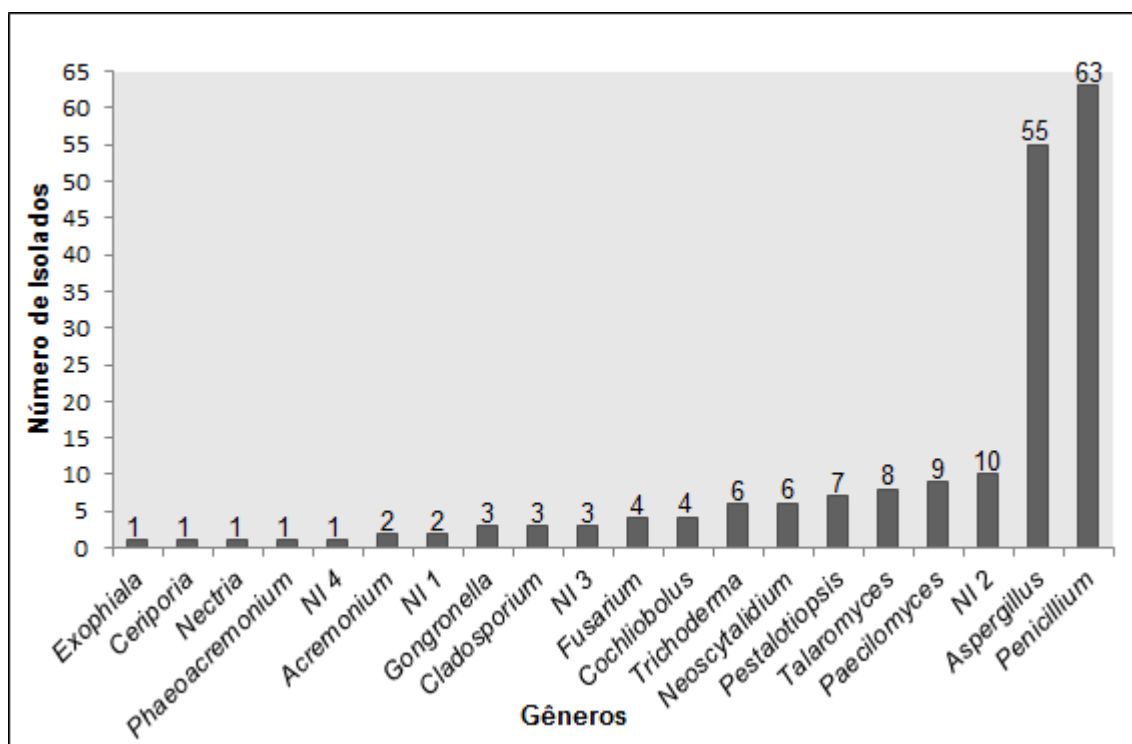


Fig. 17. Número de isolados por gênero. NI-Não Identificados

O gênero *Aspergillus* apresentou maior abundância relativa (AR) nas entre moitas, enquanto o gênero *Penicillium*, maior AR nas moitas (Tabela 3). Além do gênero *Penicillium*, os gêneros *Talaromyces*, *Paecilomyces*, *Pestalotiopsis* e *Trichoderma* também foram mais abundantes nas moitas. Pode-se observar que a maioria dos gêneros apresentou baixa abundância relativa, ou seja, menor que 1 %, em ambos os pontos (Tabela 3).

Tabela 3 – Abundância Relativa (AR) (número de UFC total de cada espécie/Σ Número de UFCs de todas as espécies x 100) dos gêneros nos dois pontos amostrados (Moitas e Entre Moitas)

Regiões	Gêneros	AR (%)
Entre Moita	<i>Aspergillus</i>	62.78
	<i>Penicillium</i>	21.62
	NI 2	6.20
	<i>Talaromyces</i>	2.82
	<i>Fusarium</i>	1.88
	<i>Neoscytalidium</i>	0.94
	<i>Trichoderma</i>	0.94
	<i>Cladosporium</i>	0.94
	<i>Paecilomyces</i>	0.38
	NI 3	0.38
	<i>Pestalotiopsis</i>	0.19
	<i>Exophiala</i>	0.19
	<i>Cochliobolus</i>	0.19
	<i>Acremonium</i>	0.19
	<i>Nectria</i>	0.19
	<i>Ceriporia</i>	0.19
Moita	<i>Penicillium</i>	53.55
	<i>Aspergillus</i>	13.98
	<i>Talaromyces</i>	12.08
	<i>Paecilomyces</i>	8.41
	<i>Pestalotiopsis</i>	3.79
	<i>Gongronella</i>	2.37
	<i>Trichoderma</i>	1.42
	<i>Exophiala</i>	1.18
	<i>Neoscytalidium</i>	0.71
	NI 2	0.59
	<i>Fusarium</i>	0.47
	<i>Cochliobolus</i>	0.47
	NI 1	0.36
	<i>Cladosporium</i>	0.12
	NI 3	0.12
	<i>Acremonium</i>	0.12
<i>Phaeoacremonium</i>	0.12	
NI4	0.12	

NI – Não Identificado

Variabilidade genética e identificação das espécies

Com cada gênero foi realizado o estudo de variabilidade genética. Para os gêneros com maior número de isolados - *Penicillium* e *Aspergillus* -, foram utilizados os elementos BOX, ERIC e REP-PCR e BOX e ERIC-PCR respectivamente (Fig. 18 e 19). Para os demais gêneros o estudo foi realizado apenas com o elemento BOX (Fig. 20). A maioria dos isolados de *Aspergillus* e dos demais gêneros não foi amplificada com os elementos REP e ERIC-PCR, por isso eles não foram utilizados nas análises para esses gêneros.

A análise dos dados gerados com os marcadores foi realizada juntamente com a caracterização morfológica dos isolados, para identificar os grupos com isolados geneticamente idênticos. Nos grupos dos isolados com padrão de bandas idênticas foi sequenciado apenas um isolado representante, utilizando a região β -tubulina para os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* e a região ITS para os demais gêneros. Nos grupos que apresentaram variação para os marcadores Rep-PCR, mesmo tendo identificado morfológicamente como mesma espécie, todos isolados foram sequenciados (Fig. 18 e 19 B).

O sequenciamento realizado com os isolados que apresentaram variação nos marcadores confirmou que eles são da mesma espécie. Isso indica uma variação intraespecífica como mostra os géis nas fig. 18 e 19

Os dados da análise do BLASTN dos isolados sequenciados estão nas tabelas 4, 5, 6, 7, 8. O nome de cada espécie esta ao lado direito de cada dendrograma e as árvores filogenéticas no apêndice (apêndice 1-*Penicillium citrinum*; apêndice 2-*Penicillium guanacastense*; apêndice 3- *Penicillium toxicarium*; apêndice 4-*Aspergillus flavipes*; apêndice 5-*Aspergillus brasiliensis*; apêndice 6-*Aspergillus pseudodeflectus*; apêndice 7-*Aspergillus terreus* e *neotindicus*; apêndice 8-*Talaromyces pinophilus* e *siamensis*; apêndice 9-*Paecilomyces lilacinus*; apêndice 10-*Neoscytalidium dimidiatum*; apêndice 11-*Gongronella butleri*; apêndice 12-*Nectria pseudocinnabarina*; apêndice 13-*Exophiala spinifera*; apêndice 14-*Bipolaris geniculatus*, *sativus* e *epapendorffii*; apêndice 15-*Fusarium oxysporum* e *solani*; apêndice 16-*Cladosporium oxysporum*; apêndice 17-*Trichoderma harzianum*, *atroviride*, *spirale* e *asperellum*).

As espécies *Penicillium janthinellum*, *simplicissimum* e *javanicum* estão na fig. 20.

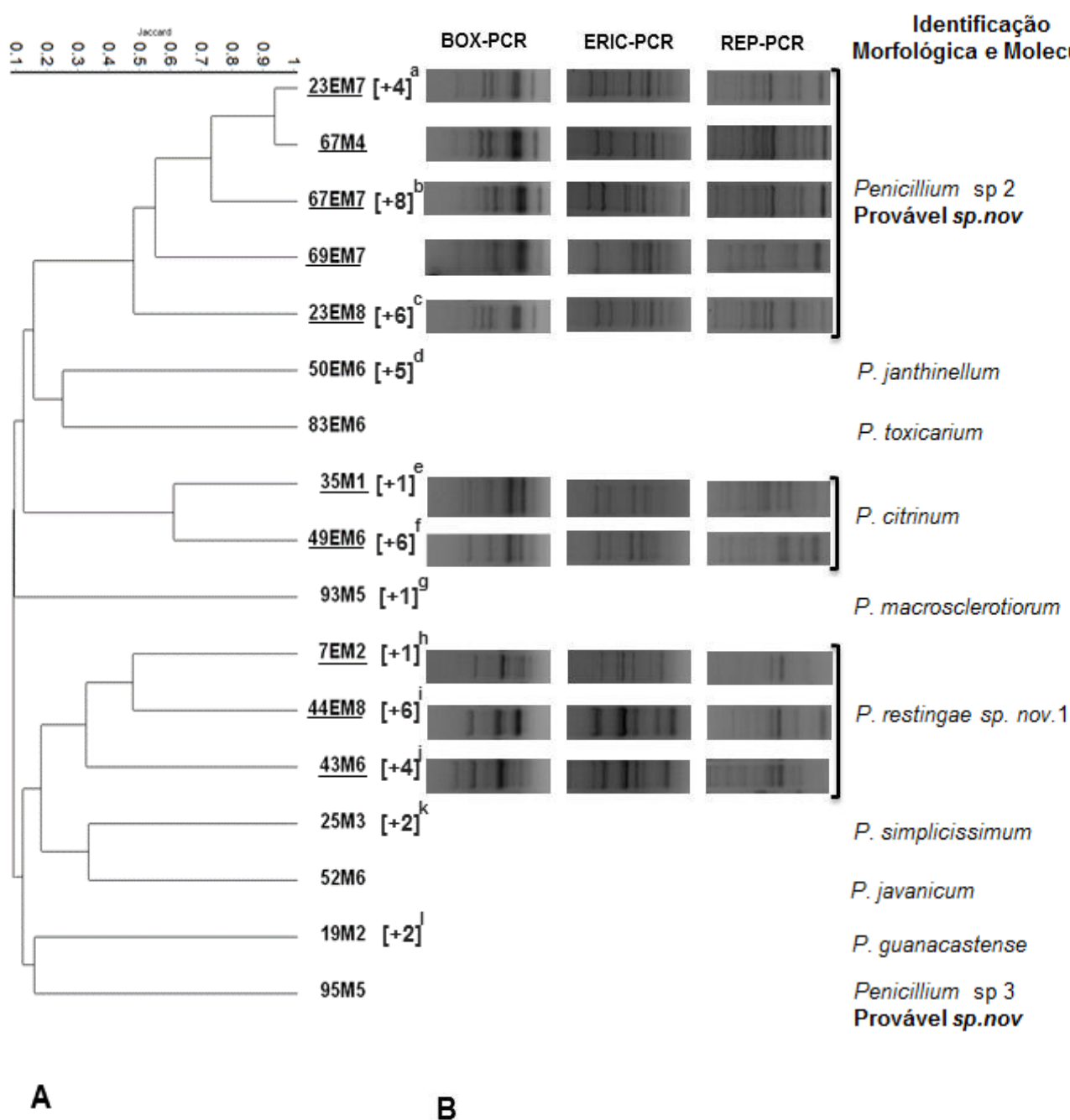


Fig. 18 A-Dendrograma de similaridade dos isolados do gênero *Penicillium* por meio da análise dos elementos BOX, ERIC e REP-PCR. O número de isolados iguais está indicado entre colchetes e estes são listados a seguir: ^a26EM1, 58EM7, 67EM2, 67M7; ^b23M5, 67M6, 67EM8, 67EM4, 67M8, 67M1, 72M8, 77M8; ^c6EM5, 67EM3, 67M2, 73EM8, 79M7, 122EM1; ^d10EM3, 10EM7, 10EM8, 50EM8, 105M3; ^e35M6; ^f81M7, 84M2, 101M3, 18M5, 18M1, 18M2; ^g109M1; ^h43M4; ⁱ43EM2, 43M1, 43EM4, 43M2, 66EM7, 128M1; ^j14EM2, 7M7, 14M6, 44M8; ^k42M4, 106M3; ^l118M1, 118M2. **B**-Géis dos elementos BOX, ERIC e REP-PCR mostrando a variabilidade intraespecífica somente dos isolados com diversidade intra-específica. Ao lado direito dos géis estão as espécies identificadas

por análises morfológicas e moleculares e em destaque as prováveis espécies novas. O agrupamento foi feito pelo método UPGMA e com o coeficiente de Jaccard.

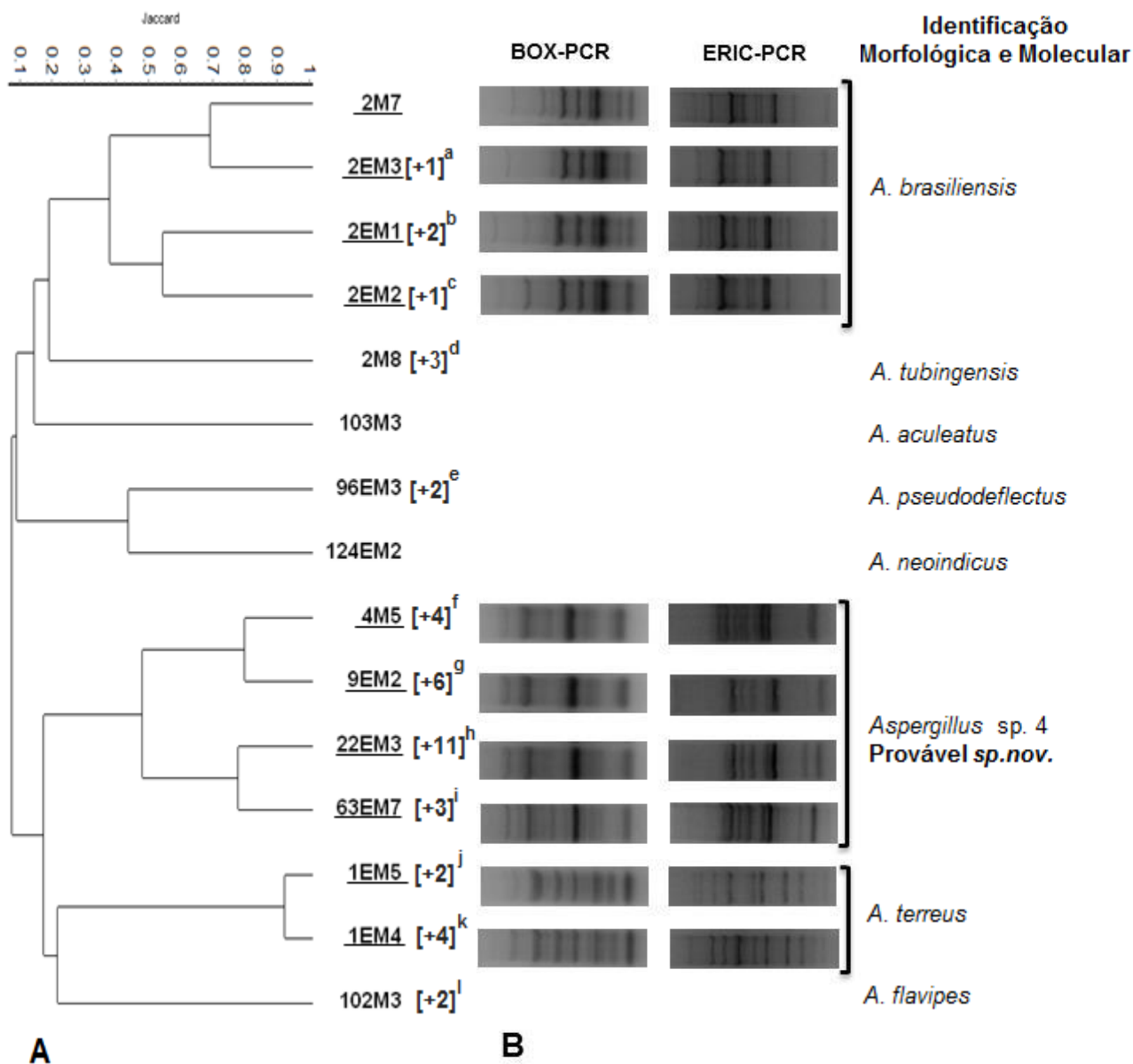


Fig. 19 A-Dendrograma de similaridade dos isolados do gênero *Aspergillus* por meio da análise dos elementos BOX e ERIC-PCR. O número de isolados iguais está indicado entre colchetes e esses listados a seguir: ^a2M1; ^b2M4, 2EM4; ^c2EM5; ^d20M6, 20M3, 20M5; ^e3EM5, 96M4; ^f4EM5, 22M4, 63EM8, 121EM1; ^g9EM3, 33EM4, 33EM6, 27EM1, 57EM7, 63EM3; ^h4EM7, 9EM7, 9EM1, 22EM7, 74M8, 85EM3, 85EM6, 94M5, 99EM4, 111EM2, 123EM1; ⁱ22M3, 120M2, 126EM2; ^j1M4, 125EM2; ^k1EM3, 1EM1, 1EM2, 1M2; ^l21M2, 21M3. **B**-Géis dos elementos BOX e ERIC-PCR mostrando a variabilidade intraespecífica, nos isolados onde esta ocorre. Ao lado direito dos géis estão as espécies identificadas por análises morfológicas e moleculares e em destaque as prováveis espécies novas. O agrupamento foi feito pelo método UPGMA e com o coeficiente de Jaccard.

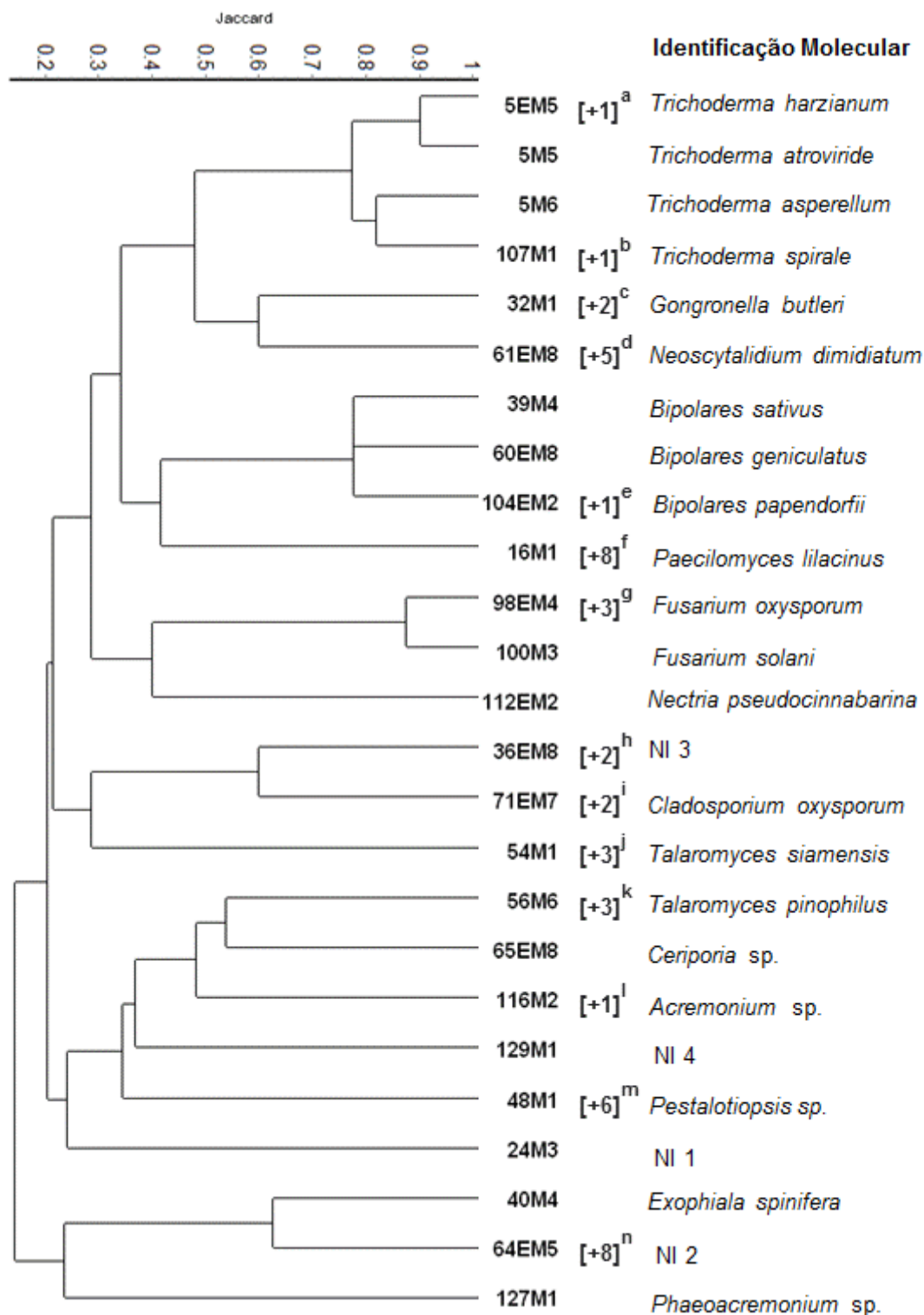
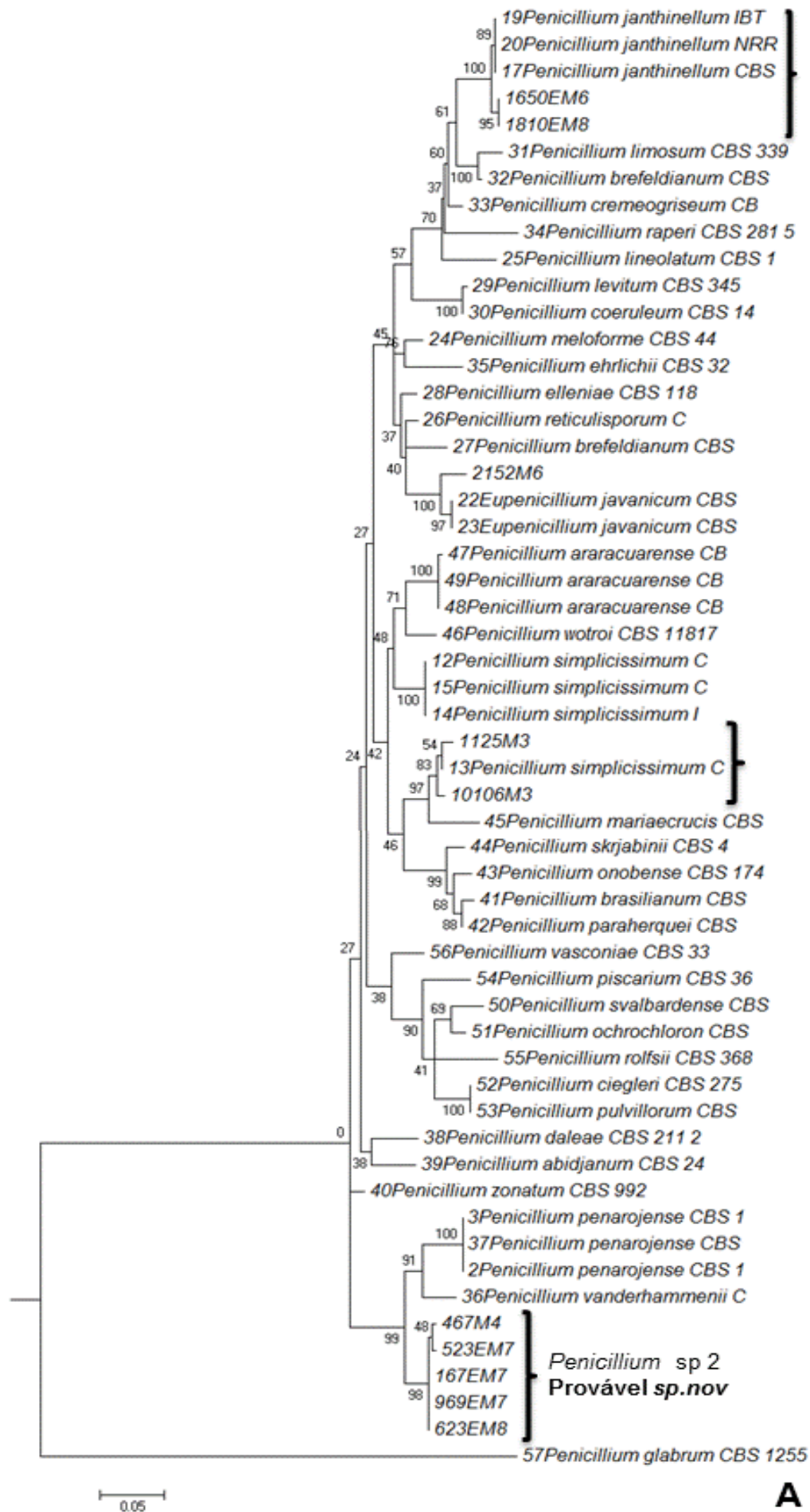


Fig. 20 Dendrograma de similaridade dos isolados dos demais gêneros por meio da análise dos elementos BOX-PCR. O número de isolados iguais está indicado entre colchetes e esses são listados a seguir: ^a5EM1; ^b30M1; ^c32M5, 32M6; ^d41M4, 41M5, 41EM6, 41EM1, 70EM7; ^e104M3; ^f16EM2, 16M5, 16M6, 16EM6, 16M3, 16M4, 16M2, 78M8; ^g12EM1, 12M2, 12EM2; ^h36EM5, 36M4; ⁱ11EM3, 76M8; ^j29M1, 29M2, 54M5; ^k54M6, 56EM1, 88M6; ^l37EM4; ^m8EM3, 8M6, 46M1, 46M3, 46M4, 48M5; ⁿ11EM7, 11EM8, 13EM1, 13EM3, 64EM7, 64EM6, 64EM8, 86EM5. Ao lado direito do dendrograma estão as espécies identificadas por análises moleculares. O agrupamento foi feito pelo método UPGMA e com o coeficiente de Jaccard.

Um total de sete isolados foi identificado somente em nível de gênero e dentre esses, quatro são prováveis espécies novas, três pertencentes ao gênero *Penicillium* e uma ao gênero *Aspergillus*. Uma dessas espécies (*Penicillium restingae* sp. nov.1) está descrita no segundo capítulo desta dissertação.

A árvore filogenética na fig. 21 A, mostra que *Penicillium* sp. 2 (provável sp. nov.) está dentro da seção *Lanata-divaricata* e forma um grupo separado relacionado com as espécie *P. penajorensis* e *P. vanderhammenii*. Na fig. 21 B, a árvore filogenética com algumas espécies da seção *Fumigati*, o grupo separado da espécie *Aspergillus* sp. 4 (provável sp.nov), mostra relação filogenética com as espécies *Neosartorya udagawae* e *A. viridinutans*. Com o *Penicillium* sp. 3 (provável sp. nov.) não foi realizada filogenia, pois de acordo com a análise do BLASTN o isolado que apresentou maior similaridade (92 %) está identificado apenas em nível de gênero, como mostrado na tabela 4.

Apenas quatro isolados não foram identificados morfologicamente porque não esporularam e com a análise do BLASTN não identificou nenhum gênero relacionado a esses isolados (Tabela 8).



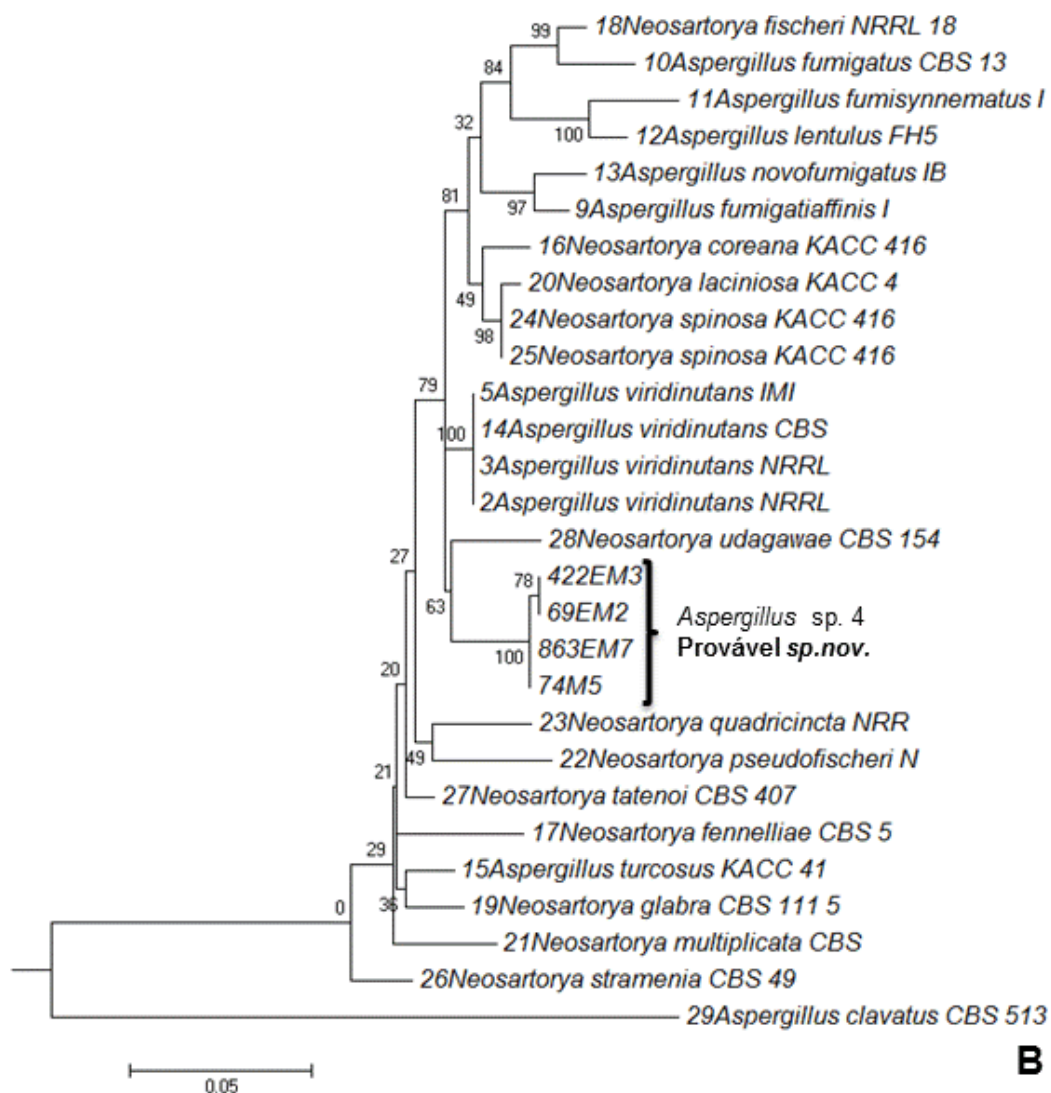


Fig. 21 Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida do alinhamento das sequências do gene β tubulina construída no programa MEGA 5.2. **A**-Relação filogenética de *Penicillium* sp. 2 (provável sp. nov.) dentro da seção Lanata-divaricata. O melhor modelo selecionado pelo programa foi o modelo Kimura 2-parâmetros (K2 + G). *Penicillium glabrum* CBS 1255 foi utilizado como grupo externo. **B**-Relação filogenética do *Aspergillus* sp. 4 (provável sp. nov.) dentro da seção Fumigati. O melhor modelo selecionado pelo programa foi o modelo Kimura 2-parâmetros (K2 + I). *Aspergillus clavatus* CBS 513 foi utilizado como grupo externo.

Tabela 4 – Isolados do gênero *Penicillium* que estão no dendrograma da figura 18 relacionados as espécies mais próximas que retornaram com o BLASTN e os respectivos valores de cobertura (Cobert.) e máxima identidade (Max. Ident).

Isolados	Fragmento (pb)	Nº de Acesso do GeneBank	Espécies mais próximas com BLAST		Seção		
			Referência do Nº de Acesso	Cobert. (%)		Max. Ident (%)	
35M1	459	GU944545	<i>P. citrinum</i> CBS 139 45T	95	99	<i>Citrina</i>	
			JN637993	<i>P. citrinum</i> KAS 2602	95		100
			EU128576	<i>P. citrinum</i> 217P	95		100
49EM6	473	EU128558	<i>P. citrinum</i> 139P	94	99		
44EM8	428	JN625959	<i>P. adametzii</i> KAS 3464	98	94		
			JN625961	<i>P. adametzii</i> KAS 3466	98		93
43M6	451	JN625959	<i>P. adametzii</i> KAS 3464	95	93	<i>Sclerotiora</i>	
			JN625961	<i>P. adametzii</i> KAS 3466	95		93
7EM2	427	JN625959	<i>P. adametzii</i> KAS 3464	97	93		
			JN625961	<i>P. adametzii</i> KAS 3466	97		93
19M2	419	JN625968	<i>P. guanacastense</i> DAOM 239913	98	99		
			JN625967	<i>P. guanacastense</i> DAOM 239912T	98		99
25M3	474	DQ486650	<i>P. simplicissimum</i> CBS 372 48NT	100	92		
			GU981631	<i>P. simplicissimum</i> CBS 328 59	98		99
50EM6	464	EF123659	<i>P. janthinellum</i> IBT 13051	99	99		
			GU981625	<i>P. janthinellum</i> CBS 340 48NT	97		99
52M6	510	GU981657	<i>P. javanicum</i> CBS 341 48T	92	98		
			GU981658	<i>P. javanicum</i> CBS 349 51	92		98
67EM7	524	GU981643	<i>P. penarajense</i> CBS 113144	92	91	<i>Lanata-divaricata</i>	
			GU981644	<i>P. penarajense</i> CBS 113132	92		91
67M4	545	GU981643	<i>P. penarajense</i> CBS 113144	88	91		
			GU981644	<i>P. penarajense</i> CBS 113132	88		91
23EM7	545	GU981643	<i>P. penarajense</i> CBS 113144	88	91		
			GU981644	<i>P. penarajense</i> CBS 113132	88		91
23EM8	529	GU981643	<i>P. penarajense</i> CBS 113144	91	91		
			GU981644	<i>P. penarajense</i> CBS 113132	91		91
69EM7	473	GU981643	<i>P. penarajense</i> CBS 113144	97	92		
			GU981644	<i>P. penarajense</i> CBS 113132	97		92
93M5	415	AB530460	<i>P. macrosclerotiorum</i> CBS 116871T	99	96	<i>Gracilentia</i>	
83EM6	424	EF198616	<i>P. toxicarium</i> NRRL 35655	96	99	<i>Exilicaulis</i>	
			EF198614	<i>P. toxicarium</i> NRRL 31271	96		99
95M5	454	JQ973898	<i>Penicillium</i> sp. GT22	96	92		
			JQ973897	<i>Penicillium</i> sp. GT11	96		92

- Isolados sequenciados com a região β tubulina.

Tabela 5 – Isolados do gênero *Aspergillus* que estão no dendrograma da figura 19 relacionados as espécies mais próximas que retornaram com o BLASTn e os respectivos valores de cobertura (Cobert.) e máxima identidade (Max. Ident).

Isolados	Fragmento (pb)	Nº de Acesso do GeneBank	Espécies mais próximas com BLAST			Seção
			Referência do Nº de Acesso	Cobert. (%)	Max. Ident (%)	
1EM4	523	EF669519	<i>A. terreus</i> NRRL 255T	97	97	
		FJ491709	<i>A. terreus</i> IBT 6271	99	99	
		FJ491706	<i>A. terreus</i> NRRL 274	99	99	
1EM5	511	JX501417	<i>A. terreus</i> A1S2 D18	100	99	Terrei
		FJ491706	<i>A. terreus</i> NRRL 274	99	99	
124EM2	511	EF669531	<i>A. allahabadii</i> NRRL 4539T	96	95	
		FJ491716	<i>A. nivea</i> CBS 115 27T	96	95	
		FJ491723	<i>A. carneus</i> CBS 494 65T	96	95	
102M3	527	EU014084	<i>A. flavipes</i> NRRL 5504T	96	95	Flavipedes
		EU014082	<i>A. flavipes</i> NRRL 4578	96	99	
96EM3	427	EF591732	<i>A. pseudodeflectus</i> CBS 596 65	99	99	Usti
22EM3	517	DQ534153	<i>A. viridinutans</i> IMI367415	97	95	
		EF661252	<i>A. viridinutans</i> NRRL 4365	97	95	
9EM2	522	DQ534153	<i>A. viridinutans</i> IMI367415	96	96	Fumigati
		EF661252	<i>A. viridinutans</i> NRRL 4365	96	96	
4M5	521	DQ534153	<i>A. viridinutans</i> IMI367415	97	96	
		EF661252	<i>A. viridinutans</i> NRRL 4365	97	96	
63EM7	523	DQ534153	<i>A. viridinutans</i> IMI367415	97	96	
		EF661252	<i>A. viridinutans</i> NRRL 4365	97	96	
2M7	518	AM295186	<i>A. brasiliensis</i> IMI 381727	98	98	
		HQ632660	<i>A. brasiliensis</i> IHEM5185	100	99	
		AY820006	<i>A. brasiliensis</i> CBS 101740	98	98	
2EM2	537	AM295184	<i>A. brasiliensis</i> ITEM 4544	95	99	
		AM295183	<i>A. brasiliensis</i> ITEM 4540	95	99	
2EM3	512	HQ632660	<i>A. brasiliensis</i> IHEM5185	100	99	Nigri
		AM295184	<i>A. brasiliensis</i> ITEM 4544	100	99	
2EM1	505	AM295184	<i>A. brasiliensis</i> ITEM 4544	99	100	
		AM295183	<i>A. brasiliensis</i> ITEM 4540	99	99	
2M8	510	FJ629305	<i>A. tubingensis</i> CBS 134 48T	82	100	
		JX463330	<i>A. tubingensis</i> A2S1 D60	99	99	
103M3	500	HE577806	<i>A. aculeatus</i> CBS 172 66T	98	96	
		JX545070	<i>A. aculeatus</i> A2S3 D3	98	99	

- Isolados sequenciados com a região β tubulina.

Tabela 6 – Isolados que estão no dendrograma da figura 20 relacionados as espécies mais próximas que retornaram com o BLASTn e os respectivos valores de cobertura (Cobert.) e máxima identidade (Max. Ident).

Isolados	Fragmento (pb)	Nº de Acesso do GeneBank	Espécies mais próximas com BLAST		
			Referência do Nº de Acesso	Cobert. (%)	Max. Ident (%)
56M6	417	AY753379	<i>Talaromyces pinophilus</i> BCC 14374	99	99
54M1	435	JX091379	<i>Talaromyces siamensis</i> CBS 475 88	90	99
16M1	303	GU980007	<i>Paecilomyces lilacinus</i> NRRL22958	92	98
		GU980008	<i>Paecilomyces lilacinus</i> IBT27036	92	98

- Isolados sequenciados com a região β tubulina.

Tabela 7 – Isolados que estão no dendrograma da figura 20 relacionados as espécies mais próximas que retornaram com o BLASTn e os respectivos valores de cobertura (Cobert.) e máxima identidade (Max. Ident).

Isolados	Fragmento (pb)	Nº de Acesso do GeneBank	Espécies mais próximas com BLAST		
			Referência do Nº de Acesso	Cobert. (%)	Max. Ident (%)
48M1	490	JX305703	<i>Pestalotiopsis mangiferae</i> FA02Pm	99	99
		JX875596	<i>Pestalotiopsis clavispora</i> 5	99	99
		JF501649	<i>Pestalotiopsis malicola</i> NK101	99	99
		JN943631	<i>Pestalotiopsis foedans</i> 3.9144	99	99
71EM7	449	JN592511	<i>Cladosporium cladosporioides</i> F28b	99	99
		EU759979	<i>Cladosporium oxysporum</i> IFM 56397	99	99
32M1	654	JN943049	<i>Gongronella butleri</i> CBS 969 73	95	98
		JN206286	<i>Gongronella butleri</i> CBS 179 28	95	98
100M3	524	KF274670	<i>Fusarium solani</i> KSA13-01	98	99
		JQ910159	<i>Fusarium solani</i> Cc 149	98	99
98EM4	444	GQ856367	<i>Fusarium oxysporum</i> 69	98	99
		JX406553	<i>Fusarium oxysporum</i> CSS11721	99	99
61EM8	533	JX473739	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> BWH-TS1	99	100
		HQ439174	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> Nd3	99	100
40M4	470	KC445294	<i>Exophiala spinifera</i> R68E3	99	99
		AY156960	<i>Exophiala spinifera</i> CBS 269 28	99	99
5M6	586	HM439634	<i>Trichoderma asperellum</i> IARI	88	99
		KC561056	<i>Trichoderma asperellum</i> CEN162	87	99
5M5	557	EF113590	<i>Hypocrea lixii</i> CBS 115337	97	99
		JF502439	<i>Trichoderma atroviride</i> 1-24	97	99
5EM5	592	KC576660	<i>Trichoderma harzianum</i> CEN230	97	99
		KC561063	<i>Trichoderma harzianum</i> CEN284	95	99
107M1	551	JF439515	<i>Trichoderma spirale</i> F28	98	99
		EU871034	<i>Trichoderma spirale</i> TU Graz 11TSM4	98	99
39M4	505	JQ936205	<i>Cochliobolus sativus</i> C20	99	99
		JQ936103	<i>Cochliobolus sativus</i> M8 2	99	99
60EM8	561	HE861840	<i>Cochliobolus geniculatus</i> UTHSC 09 3005	91	100
		HE861839	<i>Cochliobolus geniculatus</i> UTHSC 07 3111	91	100
104EM2	585	KC592365	<i>Bipolaris papendorffii</i> AH-01	92	98
		JN943415	<i>Cochliobolus geniculatus</i> NBRC 7406	92	98
116M2	476	HQ607884	<i>Acremonium</i> sp. ATT196	96	99
		HQ607846	<i>Acremonium</i> sp. ATT126	96	99

- Isolados sequenciados com a região ITS.

Tabela 8 – Isolados que estão no dendrograma da figura 20 relacionados as espécies mais próximas que retornaram com o BLASTN e os respectivos valores de cobertura (Cobert.) e máxima identidade (Max. Ident). Isolados que não esporularam.

Isolados	Fragmento (pb)	Nº de Acesso do GeneBank	Espécies mais próximas com BLAST		
			Referência do Nº de Acesso	Cobert. (%)	Max. Ident (%)
127M1	314	JN828794	<i>Phaeoacremonium</i> sp. E8828b	97	99
112EM2	536	JX082392	<i>Nectria pseudocinnabarina</i> BRFM 1288	94	99
		HM484553	<i>Nectria pseudocinnabarina</i> A.R. 4548	95	99
65EM8	608	HM012818	<i>Ceriporia</i> sp. MA201	99	99
24M3 (NI 1)	525	HM116750	<i>Pleosporales</i> sp. ICMP 17118	99	92
64EM5 (NI 2)	521	FJ612677	Fungal sp. ARIZ B590	96	91
36EM8 (NI 3)	473	KC113291	Fungal sp. PKU F10	99	96
		GQ996139	Fungal sp. mh3955 5	93	91
129M1 (NI 4)	430	AY699678	Fungal sp. R46	92	91

- Isolados sequenciados com a região ITS. NI – Não Identificado

Ao observar as espécies que ocorreram apenas em um ou no outro ponto de coleta (moitas e entre-moitas), o número de espécies apenas nas moitas foi maior (39,53 %) comparado as que ocorreram apenas nas entre moitas (13,95 %) (Tabela 9). As prováveis espécies novas estão entre as mais frequentes, inclusive a descrita no capítulo 2, como mostra a tabela 9.

Tabela 9. Espécies que ocorreram em ambos os pontos (Moitas e Entre Moitas), espécies que ocorreram apenas nas Moitas e espécies que ocorreram apenas nas Entre Moitas com os respectivos valores de Frequência Absoluta (FA) (número de vezes que cada espécie ocorreu nos locais amostrados), Frequência de Ocorrência (FO %) (número de locais que as espécies foram encontrados / Σ de locais amostrados x 100) e a Classe de Frequência de Ocorrência.

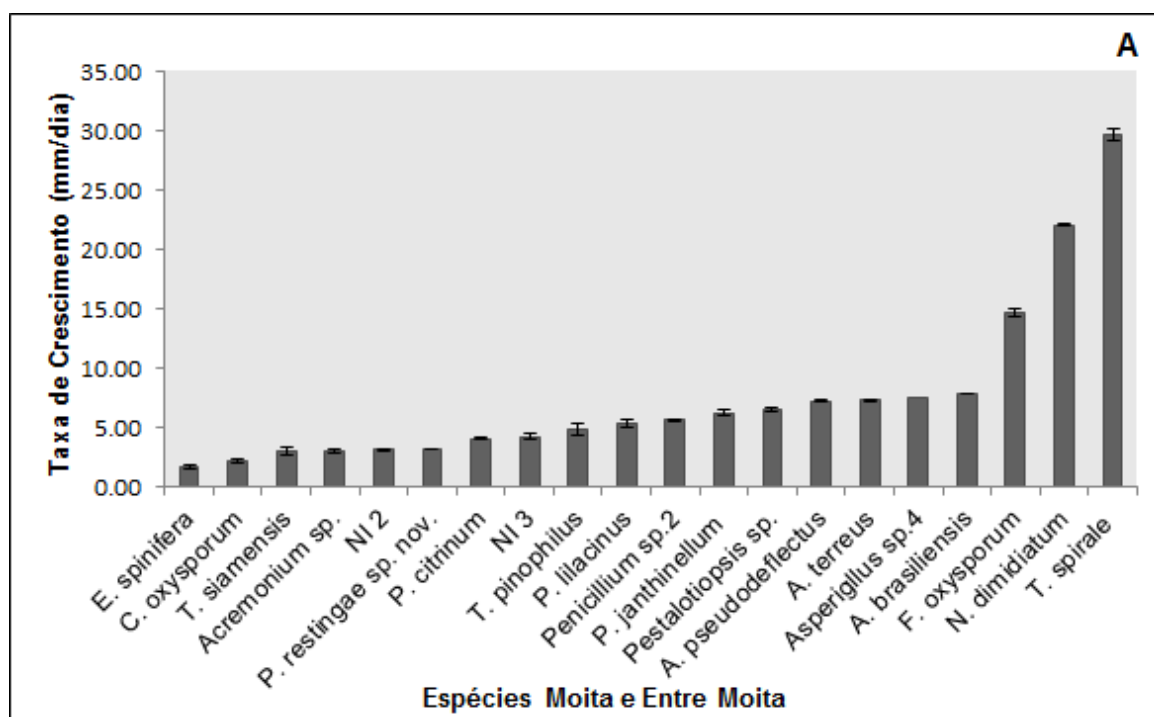
Espécies Moita e Entre Moita	FA	FO (%)	Classe FO	Espécies Moita	FA	FO (%)	Classe FO	Espécies Entre Moita	FA	FO (%)	Classe FO
<i>Penicillium citrinum</i>	9	56.25	F	<i>Penicillium guanacastense</i>	3	37.50	PF	<i>Penicillium toxicarium</i>	1	12.50	PF
<i>Penicillium restingae</i> sp. nov. 1	15	93.75	MF	<i>Penicillium simplicissimum</i>	3	37.50	PF	<i>Aspergillus nivea</i>	1	12.50	PF
<i>Penicillium janthinellum</i>	7	43.75	F	<i>Penicillium javanicum</i>	1	12.50	PF	<i>Trichoderma harzianum</i>	2	25.00	PF
<i>Penicillium</i> sp. 2 nov	16	100.00	MF	<i>Penicillium macrosclerotiorum</i>	2	25.00	PF	<i>Bipolaris geniculatus</i>	1	12.50	PF
<i>Aspergillus terreus</i>	11	68.75	F	<i>Penicillium</i> sp. 3 nov	1	12.50	PF	<i>Nectria pseudocinnabarina</i>	1	12.50	PF
<i>Aspergillus pseudodeflectus</i>	4	25.00	PF	<i>Aspergillus flavipes</i>	2	25.00	PF	<i>Ceriporia</i> sp.	1	12.50	PF
<i>Aspergillus</i> sp. 4 nov	14	87.50	MF	<i>Aspergillus tubingensis</i>	4	50.00	F				
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	12	75.00	MF	<i>Aspergillus aculeatus</i>	1	12.50	PF				
<i>Talaromyces pinophilus</i>	2	12.50	PF	<i>Gongronella butleri</i>	4	50.00	F				
<i>Talaromyces siamensis</i>	7	43.75	F	<i>Fusarium solani</i>	1	12.50	PF				
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	10	62.50	F	<i>Trichoderma asperellum</i>	1	12.50	PF				
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	8	50.00	F	<i>Trichoderma atroviride</i>	1	12.50	PF				
<i>Cladosporium oxysporum</i>	3	18.75	PF	<i>Bipolaris sativus</i>	2	25.00	PF				
<i>Fusarium oxysporum</i>	5	31.25	PF	<i>Bipolaris papendorfii</i>	1	12.50	PF				
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	6	37.50	PF	<i>Phaeoacremonium</i> sp.	1	12.50	PF				
<i>Exophiala spinifera</i>	4	25.00	PF	NI 1	2	25.00	PF				
<i>Trichoderma spirale</i>	2	12.50	PF	NI 4	1	12.50	PF				
<i>Acremonium</i> sp.	2	12.50	PF								
NI 2	12	75.00	MF								
NI 3	3	18.75	PF								

Classe de Frequência de Ocorrência (FO): FO \geq 70 % - Muito Frequente (MF); 40 % \leq FO<70 % - Frequente (F); 10 % \leq FO<40 % - Pouco Frequente (PF) e FO<10 % Esporádica (E). Frequência de Ocorrência nas Moitas e Entre Moitas n=16, apenas nas Moitas n=8 e apenas nas Entre Moitas n=8.

Características fisiológicas da microbiota celulolítica: Taxa de crescimento e atividade celulolítica

A média da taxa de crescimento das espécies encontrada apenas nas moitas (9,65 mm/dia) não foi significativamente maior do que aquelas que ocorreram apenas nas entre moitas (9,06 mm/dia) (Fig. 22 B e C). A maioria das espécies que ocorreu em ambas regiões e apenas nas entre moitas (Fig. 22 A e C) apresentaram taxa de crescimento baixa, crescendo menos de 10 mm/dia. Já as espécies que ocorreram apenas nas regiões de moita, 50 % apresentaram taxa de crescimento menor que 10 mm/dia e 50 % taxa de crescimento acima de 10 mm/dia.

Espécies que apresentaram taxas de crescimento maior que 20 mm/dia, pertencem a gêneros que são conhecidos por crescerem rápido como *Trichoderma* e *Fusarium*.



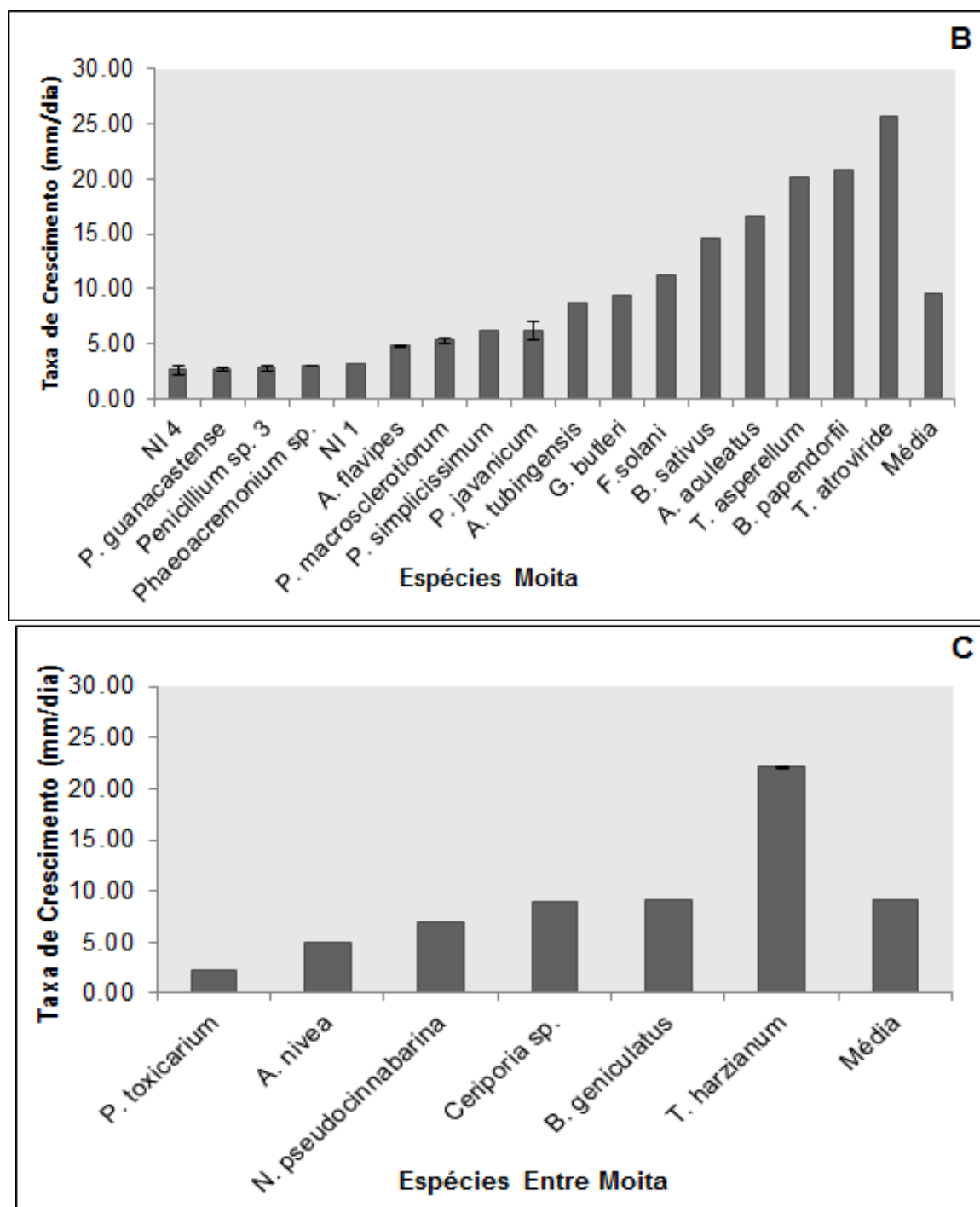
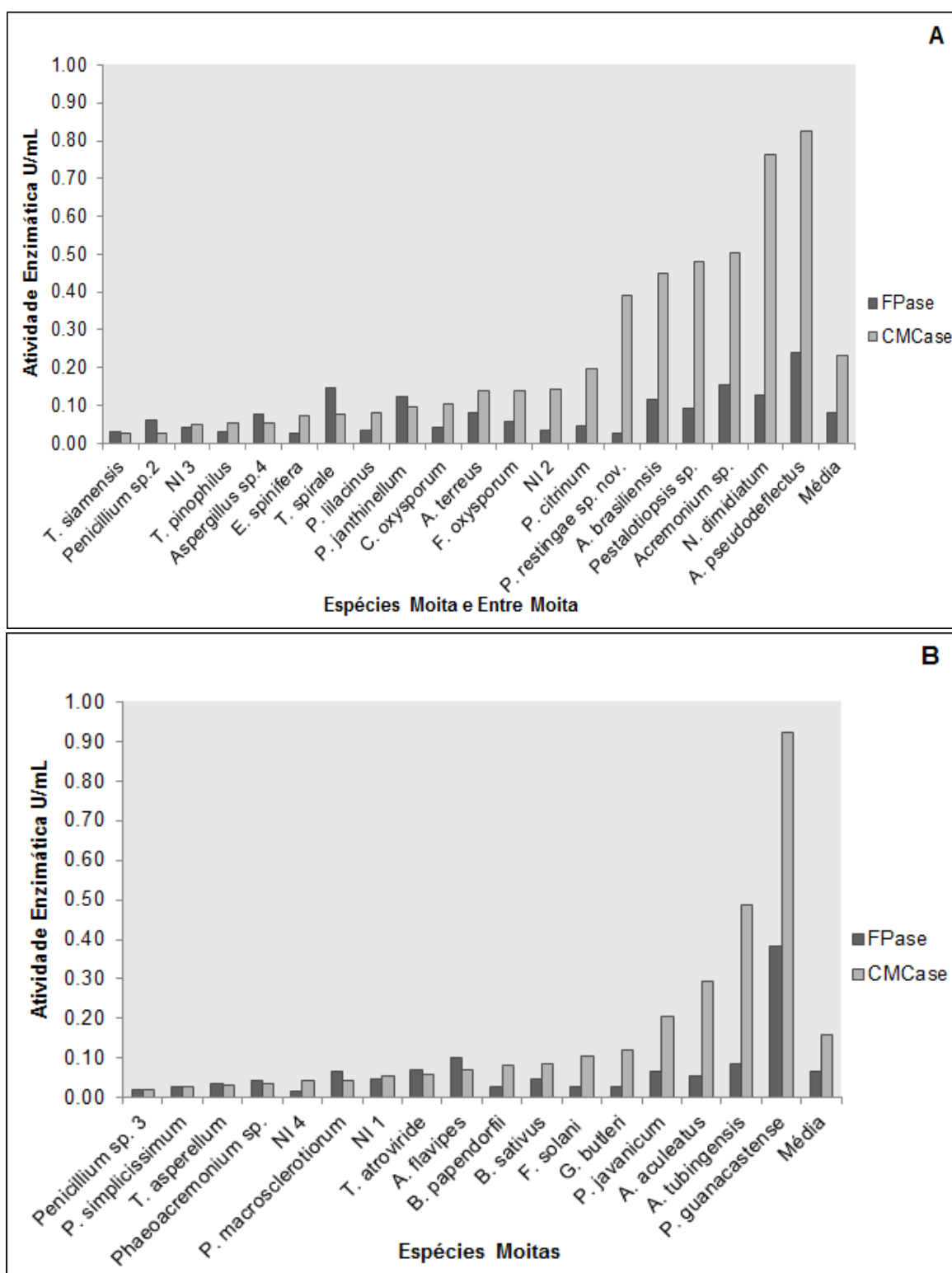


Fig. 22 Taxa de crescimento (mm/dia) das espécies por ponto de coleta de amostras no meio de celulose microcristalina a 28 °C. **A**-Espécies que ocorreram nas moitas e entre moitas. **B**-Espécies que ocorreram apenas nas moitas. **C**-Espécies que ocorreram apenas nas entre moitas.

Foi realizada a quantificação da atividade enzimática CMCase e FPase de todas as espécies (Fig. 23). Entre as espécies que ocorreram em ambas regiões, as espécies *N. dimidiatum* e *A. pseudodeflectus* apresentaram a maior atividade de CMCase e a maior atividade FPase foi observada para as espécies *A. pseudodeflectus* e *Trichoderma spirale* (Fig. 23 A e B). Das espécies que ocorreram

apenas nas moitas, o *P. guanacastense* se destacou com uma alta atividade de CMCase e FPase, enquanto nas entre moitas *T. harzianum* obteve a maior atividade dessas duas enzimas (Fig. 23 B e C).

De maneira geral, a maioria dessas espécies teve uma atividade de CMCase e FPase baixa. Existiu correlação moderada e positiva entre a atividade de CMCase e FPase ($P=0,0001$).



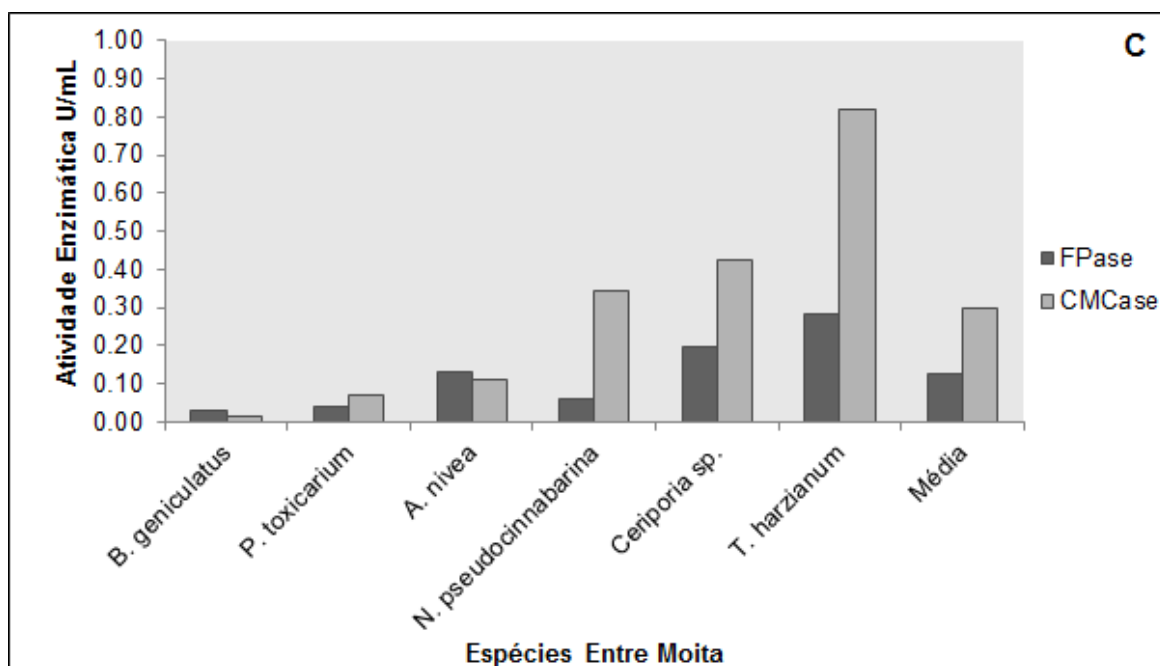
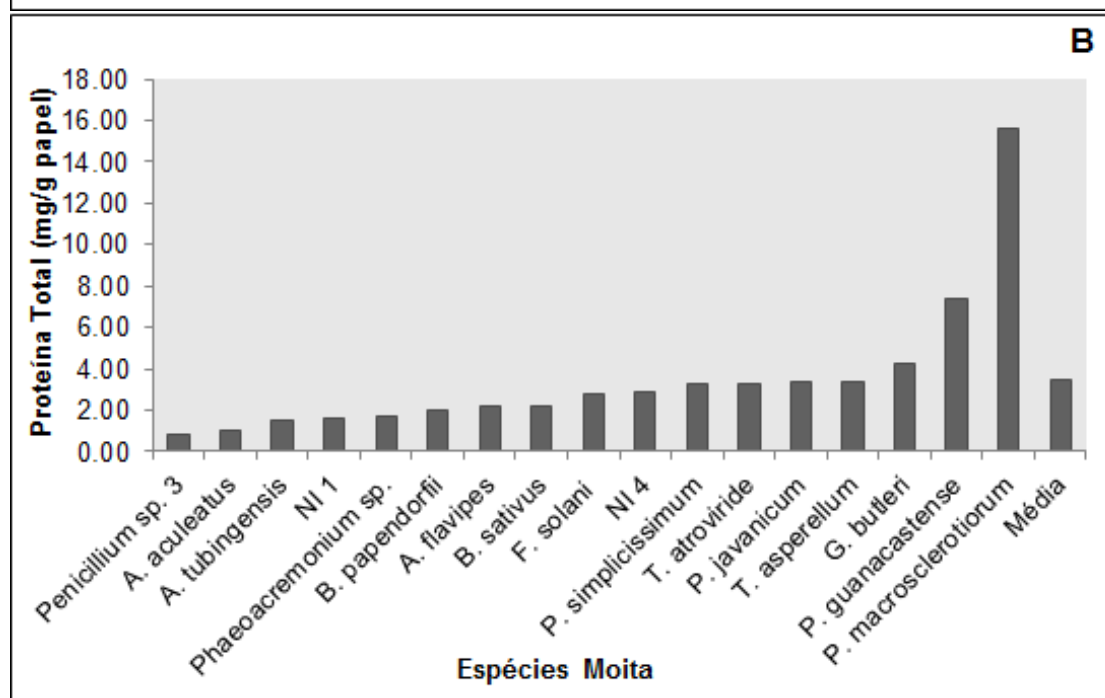
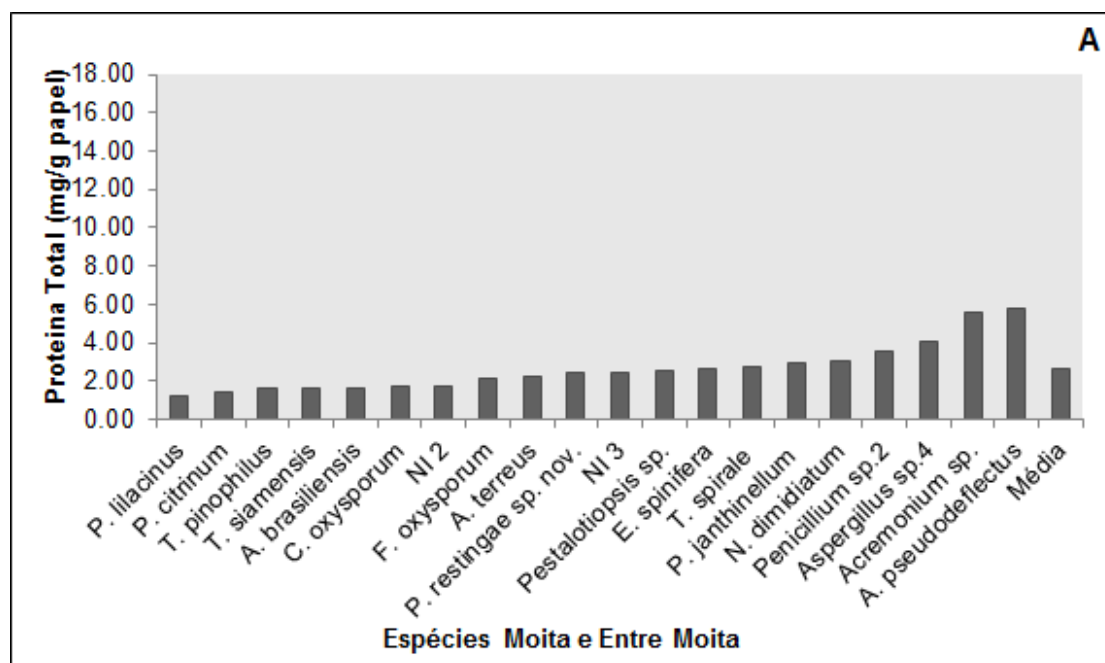


Fig. 23 Atividade enzimática (U/mL) de CMCase e FPase das espécies por ponto de coleta amostrado. Os valores apresentados correspondem ao maior valor de atividade encontrado em experimentos com duração de seis dias em meio de sais minerais com 2,4 g de papel filtro a 150 rpm/28 °C. **A**-Espécies que ocorreram nas moitas e entre moitas. **B**-Espécies que ocorreram apenas nas moitas. **C**-Espécies que ocorreram apenas nas entre moitas.

A quantificação das proteínas totais foi realizada juntamente com a atividade enzimática para analisar se existia correlação entre a atividade enzimática e a quantidade de proteínas totais liberadas. Houve correlação fraca e positiva entre a quantidade de proteínas totais e a atividade de FPase ($p=0,013$), mas não com a atividade de CMCase. Não houve diferença significativa entre as médias das quantidades de proteínas totais produzidas pelas espécies de cada ponto de coleta amostrado (Fig. 24).



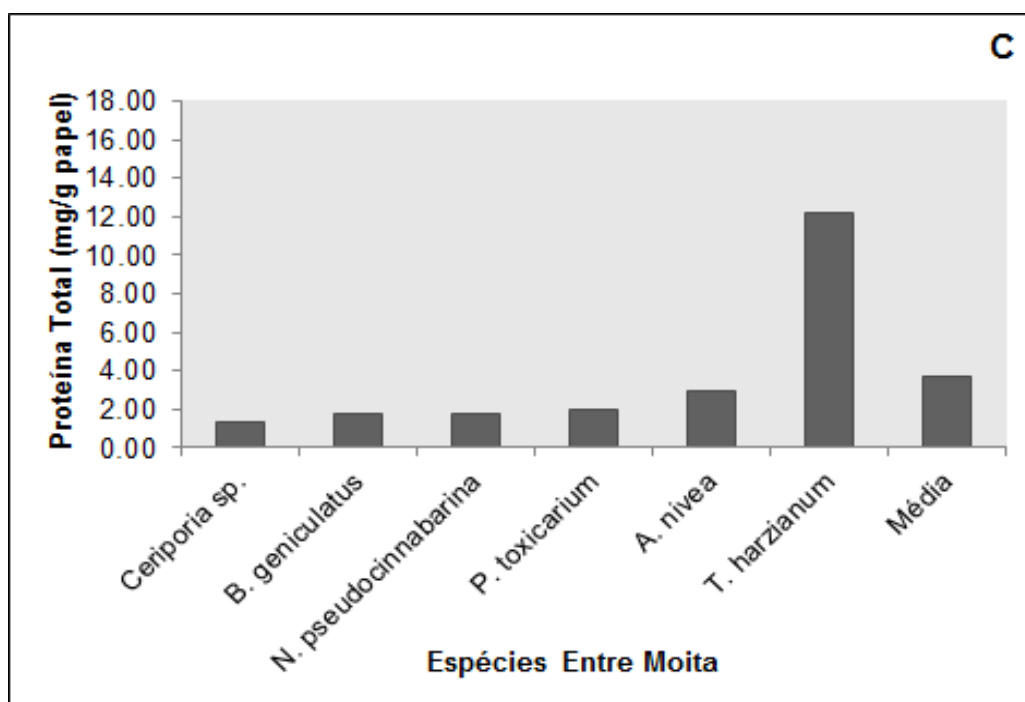


Fig. 24 Quantificação de Proteínas Totais (mg/g de papel) das espécies por ponto de coleta amostrados. Os valores apresentados correspondem ao maior valor da quantidade de proteína total encontrado em experimentos com duração de seis dias em meio de sais minerais com 2,4 g de papel filtro a 150 rpm/28 °C. **A**-Espécies que ocorreram nas moitas e entre moitas. **B**-Espécies que ocorreram apenas nas moitas. **C**-Espécies que ocorreram apenas nas entre moitas.

Discussão

Composição da microbiota celulolítica das moitas e entre moitas

Esse trabalho é o primeiro registro destas espécies neste ecossistema no Brasil e o primeiro estudo sistemático sobre fungos filamentosos celulolíticos de restinga.

Ao comparar o número de isolados, espécies e de gêneros encontrados nesse estudo com outros trabalhos sobre comunidade, os 190 isolados distribuídos em 43 espécies e 16 gêneros, foram considerados números representativos, por ser um estudo de uma comunidade de fungos específica, os fungos celulolíticos (Ver abaixo). No trabalho de Taylor (2011) sobre comunidade de fungos filamentosos do solo de uma caverna turística, foram obtidas 7.718 isolados, 81 espécies e 18 gêneros, dentre esses, sete também foram encontrados no presente estudo (*Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma*). Uma questão relevante sobre esses dados é como essas

comunidades foram acessadas. Taylor (2011) realizou coletas de amostras de solo em 15 pontos no mês de março e no mês de setembro. Como esse trabalho não foi com comunidade específica, com poucas coletas foi possível obter um número elevado de isolados.

No presente trabalho, além das duas amostragens em cada região, com cada amostra de solo foram realizados isolamentos até que apenas 20 % dos fungos obtidos em um novo isolamento, não tivessem sido isolados previamente, ou seja, teria sido feita uma amostragem de pelo menos 80 % dos fungos daquela amostra. Desse modo, foi necessário um esforço amostral maior para acessar de maneira representativa essa comunidade específica. Isso pode justificar o fato de ter sido encontrada esse número de espécies.

A baixa similaridade observada entre as micobiotas das moitas e das entre moitas indica que estas comunidades são heterogêneas na sua composição e, conseqüentemente, possuem alta diversidade β , ou seja, elevada diversidade entre os pontos de coleta. Esta informação indica que a comunidade de fungos celulolíticos da Formação Arbustiva Aberta da APA de Guaibim pode sofrer grande perda de diversidade devido a ações antropogênicas, mesmo que estas sejam localizadas em pequenas áreas desta formação vegetacional.

Portanto, as informações sobre a estrutura e composição da micobiota produzidas neste trabalho poderão ser úteis na definição da estratégia de conservação desta Formação florística, levando também em consideração a comunidade microbiana do solo que, em geral, é negligenciada nestas situações.

Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* foram os mais abundantes nas moitas e nas entre moitas (Tabela 3) e os que apresentaram maior número de espécies (Fig. 17). Esses gêneros também foram os mais representativos no trabalho de Taylor (2011). Eles são considerados alguns dos mais diversos no solo (Christensen et al. 2000).

Penicillium foi o gênero mais abundante nas moitas (Tabela 3). Este gênero foi descrito em 1809 na Alemanha, pertence ao filo Ascomycota, à ordem Eurotiales, e a família Trichomaceae (Index Fungorum, 2010). Além do solo, esse fungo também pode ser encontrado em restos vegetais e no ar. Algumas espécies desse gênero são consideradas fitopatógenos fracos atacando órgãos de reserva, como sementes e frutos (Bergamin Filho et al. 1995). Alguns produzem micotoxinas que quando ingeridas provocam sérios danos em animais e no homem, além de ter relevância

para a produção de enzimas, como as celulases e produção de metabólitos secundários a exemplo da penicilina (Beguin e Aubert 1994).

Ao contrário do gênero *Penicillium*, o gênero *Aspergillus* foi mais abundante nas entre moitas (Tabela 3), região mais exposta a insolação devido pouca cobertura vegetal. Essa maior abundância pode ser justificada pelo fato de espécies desse gênero serem frequentemente encontradas em regiões quentes (Domsch et al. 1993). Mas, para Klich et al. (2002) não é apenas a elevada temperatura que influencia na ampla distribuição desse gênero, fatores como disponibilidade de água e nutriente, bem como competição podem influenciar.

O gênero *Aspergillus* foi descrito em 1729 pelo padre e biólogo Pietro Antônio Micheli, que observando o fungo no microscópio, lembrou-se da forma de um aspergillum (borrifador de água santa), e nomeou a espécie de acordo com o objeto (Caixeta 2010). *Aspergillus* pertence ao filo Ascomycota, e a família Trichocomaceae. Algumas espécies desse gênero produzem micotoxinas, sendo alguns desses compostos, agentes cancerígenos a humanos e animais.

O gênero *Trichoderma* apresentou maior abundância nas moitas (Tabela 3), essa região é constituída por uma maior cobertura vegetal e conseqüentemente existe pouca competição entre os isolados por nutrientes. A maior disponibilidade de nutrientes pode justificar essa abundância. Este gênero, descrito no início do século 19 (por volta de 1865, pelos irmãos Tulasne), pertence ao Filo Ascomycota, e a família Hypocreaceae ele está amplamente distribuído, e é constituído por fungos saprofíticos com capacidade de parasitar outros fungos, inclusive fitopatógenos. Devido a estas características as espécies do gênero *Trichoderma* são amplamente utilizadas no controle biológico de muitos fungos fitopatogênicos (Melo 1996).

Paecilomyces, assim como os gêneros *Talaromyces* e *Pestalotiopsis* também apresentaram maior abundância nas moitas (Tabela 3). O gênero *Paecilomyces* foi descrito pela primeira vez por Bainier (1907), pertence ao filo Ascomycota, ordem Eurotiales e Família Trichocomaceae. (Domsch et al. 1993). Espécies desse gênero habitam o solo e plantas em decomposição. Algumas espécies são parasitas facultativos de ovos de alguns nematóides, é usado no controle de pragas. Algumas espécies também podem provocar doença em humanos (Cadioli et al. 2007).

Os gêneros *Fusarium* e *Neoscytalidium* foram mais abundantes nas entre moitas (Tabela 3). Espécies do gênero *Fusarium* são encontradas no solo ou associados a espécies vegetais. Decompõem matéria orgânica do solo e podem causar doenças em diferentes espécies vegetais (Martins 2005).

O gênero *Neoscytalidium* pertence ao filo Ascomycota, a família Botryosphaeriaceae, vive em raízes de determinadas plantas como *Pinus* e *Platanus*, principalmente. Ainda não é considerado como agente patogênico, sem afastá-lo, todavia, como agente emergente, capaz de provocar lesões fúngicas oportunistas (Lacaz 1999).

Os gêneros identificados neste trabalho são considerados habitantes comuns do solo, ocorrendo em solos arenosos, de florestas, campos e áreas cultivadas (Domsch et al. 1993).

A maioria (62,5 %) dos gêneros apresentou apenas uma espécie e 37,5 % apresentou mais de uma. Cerca de 32,4 % das espécies apresentaram apenas um isolado (Tabela 9). É interessante ressaltar que, apesar do esforço amostral, esses resultados enfatizam a baixa frequência de ocorrência de algumas dessas espécies da comunidade celulolítica. Esses resultados podem ser utilizados como argumento para preservar melhor esse ecossistema, evitando a perda da diversidade e de espécies com potencial biotecnológico.

Variabilidade genética

Os três marcadores ERIC, REP e BOX-PCR, utilizados juntos foram apropriados para analisar a variabilidade intra e interespecífica dos isolados do gênero *Penicillium*, característica também observada por Redondo et al. (2009). Para o gênero *Aspergillus* foram utilizados apenas o BOX e o ERIC-PCR para mostrar a variabilidade, mas os marcadores REP-PCR não amplificaram para a maioria dos isolados. O mesmo aconteceu com os demais gêneros para os marcadores REP e ERIC-PCR. Apesar de ter sido observada uma variabilidade intraespecífica relativamente alta (até 50% de similaridade) para algumas das espécies estudadas (Fig. 18 e 19), os marcadores rep-PCR sempre as mantiveram no mesmo grupo, correspondendo à classificação morfológica.

Características fisiológicas da microbiota celulolítica

Os valores de atividade enzimática CMCase e FPase na fig. 23, mostraram que a microbiota celulolítica de ambas regiões é composta predominantemente por fungos com atividade celulolítica baixa, independente da região analisada. Não foi

observada correlação entre a taxa de crescimento e a atividade celulolítica das espécies.

A maioria das espécies encontradas: *P. guanacastense*, *P. toxicarium*, *P. macroesclerotiorum*, *A. flavipes*, *A. pseudodeflectus*, *T. pinophilus*, *T. siamensis*, *P. lilacinus*, *G. butleri*, *E. spinifera*, *N. dimidiatum*, *B. sativus*, *B. geniculatus*, *B. papendorfii*, *T. spirale*, *N. pseudocinnabarina*; nunca foi citada como produtora da enzima celulase em outros estudos. Dentre estas, as espécies *N. dimidiatum*, *A. pseudodeflectus* e *P. guanacastense*, foram as que apresentaram a maior atividade de CMCase (Fig. 23 A e B). Apesar de algumas espécies de *Trichoderma* serem mais estudadas quanto a produção de celulases (Andrade et al. 2011), algumas espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* também têm sido citadas como boas produtoras destas enzimas (Castillo et al. 1994; Kim et al. 1997). O gênero *Penicillium*, representado por maior número de espécies nesse trabalho, tem sido constantemente utilizado para a produção de enzimas em vários setores industriais (Carvalho et al. 1992; Teixeira 1994).

Considerações Finais

Nesse trabalho foram encontradas 4 prováveis espécies novas, 3 de *Penicillium* e uma de *Aspergillus*. Além disso, os fungos celulolíticos foram quantificados, identificados ao nível de espécie e caracterizados quanto a produção de celulases. Portanto, o trabalho representa a primeira contribuição para o conhecimento dos fungos celulolíticos da restinga.

As restingas podem ser consideradas como um remanescente de espécies relictuais, ou seja, que existiam em ambiente adjacente, como Mata Atlântica e que não existe mais. Talvez por isso, foram encontradas mais de 10 % de espécies que são provavelmente novas ou que foram descritas recentemente. Esses podem ser alguns argumentos para preservar esse ecossistema, que infelizmente é um dos ecossistemas brasileiros com maior ação antropogênica.

Referências

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. Vol. 25, No. 17, pp. 3389-3402, Sep.
- Andrade JP, Bispo ASdaR, Marbach PAS, Nascimento RPdo (2011) Production and Partial Characterization of Cellulases from *Trichoderma* sp. IS-05 Isolated from Sandy Coastal Plains of Northeast Brazil. *Enzyme Research*, Vol. 2011, p.7.
- Ayres JM, Fonseca GAB, Hylands AB, Queiroz HL, Pinto LP, Masterson D, Cavalcanti RB (2005) Os Corredores Ecológicos das Florestas Tropicais do Brasil. Sociedade Civil Mamirauá. Belém. 256p.
- Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AA (2007) BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong Mamiraua. Belém, PA.
- Barnett HL, Hunter BB (1999) *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Minneapolis, ed. 14.
- Beguín PE, Aubert JP (1994) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* v. 13, pp. 25-58.
- Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L (1995) *Manual de Fitopatologia Princípios e conceitos* 3 ed. Ceres: Editora agrônômica.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p.248-254.
- Breccia JD, Castro GR, Baigori MD, Sineriz F (1995) Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method. *Journal Applied Bacteriology*. 78.p. 469-472.
- Cadioli MC, Santiago DC, Hoshino AD, Homechin M (2007) Crescimento micelial e parasitismo de *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Meloidogyne paranaensis* em diferentes temperaturas "in vitro". *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.31, n.2, p.305-311, mar./abr.
- Caixeta AA (2010) Aspectos Gerais e Morfológicos do fungo *Aspergillus*, IN:PAZ LIMA, M.L. Estudos em doenças de plantas.
- Carvalho SMS, Teixeira MFS, Esposito E, Machuca A, Ferraz A, Dúran N (1992) Fungal screening from decayed Laurel and Cedar trees. *Applied Biochemical and Biotechnology* 37:150-157.
- Castellani AA (1967) Maintenance na cultivation of the common pathogenic fungi of man. In sterile distilled water. Further researches. *Journal of Tropical Medicine*. London, v. 70, p. 181-184.

- Castillo MR, Gutierrez-Correa M, Linden JC, Tengerdy RP (1994) Mixed culture solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. *Biotechnology Letters* 16:967-972.
- Christensen M, Frisvad JC, Tuthill DE (2000) *Penicillium* species diversity in soil and taxonomic and ecological notes. In: Samson RA, Pitt JI (Eds) *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*, pp. 309-320. Singapore: Harwood Academic Publishers.
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH (1993) *Compendium of soil fungi*. 2. Ed. Eching. IHW-Verlag, v.1 860p.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v 12, p. 13-15.
- Ghose TK (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* v. 59, pp. 257-268.
- Glass NL, Donaldson G (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environl Microbiol*; 61: 1323–1330.
- Hapl V, Pavlicek A, Flegr J (2001) Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.51, p.731-735.
- Hulton CSJ, Higgins CF, Sharp PM (1991) ERIC sequences—a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol.*;5:825–34. doi: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb00755.x.
- Index Fungorum (2013). <http://www.indexfungorum.org/names/genusrecord.asp?RecordID=9257>. Acessado em 20 de março de 2013.
- Kim SW, Kang SW Lee JS (1997) Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. *Bioresource Technology* 59:63-67.
- Klich MA (2002) *Identification of Common Aspergillus Species*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands, 85167-3508.
- Klich MA, Pitt JI (2002) *A laboratory guide to the common Aspergillus species and their 4 teleomorphs*. CSIRO - Division of Food Processing, Australia, 116p.
- Lacaz CdaS, Pereira AD, Heins-Vaccari EM, Cuce LC, Benatti C, Nunes RS, Melo NTde, Freitas-Leite RSde, Hernandez-Arriagada GL (1999) Onychomycosis caused by *Scytalidium Dimidiatum*. report of two cases. Review of the taxonomy of the synanamorph and anamorph forms of this Coelomycete. *Rev. Ins. Med. Trop. São Paulo*.

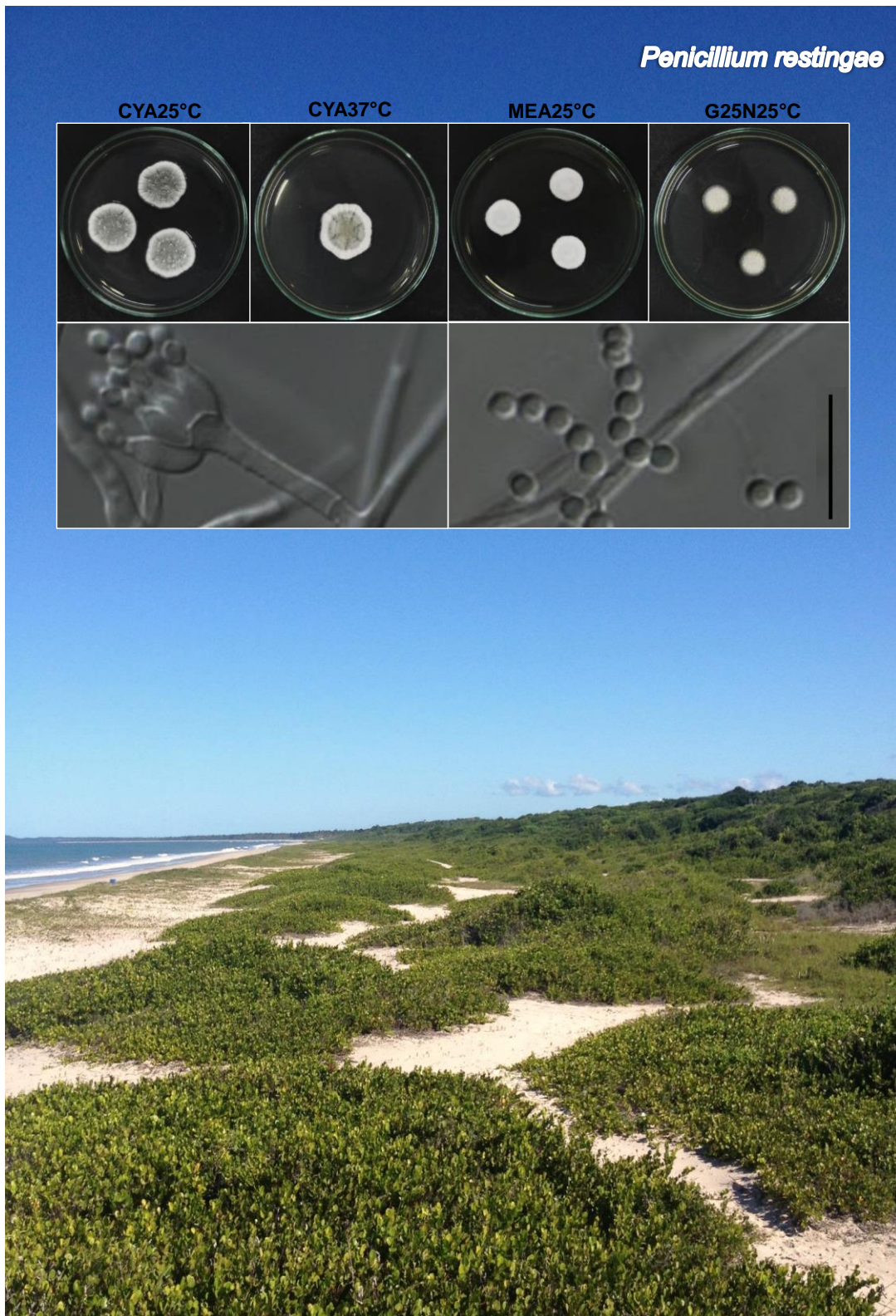
- Louws FJ, Rademaker JLW, De Bruijn FJ (1999) The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. *Ann Rev Phytopathol.* 37:81–125. doi:10.1146/annurev.phyto.37.1.81.
- Lynch JM, Slater JH, Bennett JA, Harper SHT (1981) Cellulase activities of some aerobic micro-organisms isolated from soil. *Journal of General Microbiology* 127:231-236.
- Mandels M, Weber J (1969) The production of cellulase. *Adv. Chem. Series*, v. 95, pp. 391-414.
- Martins LF (2005) Caracterização do complexo celulósico de *Penicillium echinulatum*. 2005. 121f. Mestrado (Dissertação) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Matteucci SD, Colma A (1982) Metodologia para el estudio de la vegetacion. Washington: The Genral Secretarial of the Organization of American States,. 167p. (Série Biologia - Monografia, 22).
- Melo IS (1996) *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. *Revis. Anu. Patol. Plantas* 4(1):261-295.
- Menezes LFTde, Araujo DSDde (1999) Estrutura de duas formações vegetais do cordão externo da Restinga de Marambaia, RJ. *Acta Botanica Brasilica* 13(2): 223-235.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, pp. 426–428.
- Pitt JI (1988) A Laboratory Guide To Common *Penicillium* Species. CSIRO Food Research Laboratory, North Ryde.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Raper KB, Fennell DI (1965) The Genus *Aspergillus* Robert e. Krieger Publishing Company, INC. Malabar, Florida.
- Raper KB, Thom C, Fennell DI (1949) A Manual of the *Penicillia*. Waverly Press, INC. Made in United States of America.
- Redondo C, Cubero J, Melgarejo P (2009) Characterization of *Penicillium* species by ribosomal DNA sequencing and BOX, ERIC and REP-PCR analysis. *Mycopathologia*, 168:11–22.
- Ribas LA, Hay JD, Caldas-Soares JF (1994) Moitas de restinga: Ilhas ecológicas. In: ACIESP (org.). 3o Simpósio sobre Ecossistemas da Costa Brasileira. *Anais* v. 2. p. 79- 88.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain: terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, Washington, v. 74, p. 5463-5467.
- Shepherd GJ (1995) FITOPAC 1. Manual de usuário. Departamento de Botânica, UNICAMP.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology Evolution* 28: 2731-2739.
- Taylor ELS (2011) Estudo Da Comunidade De Fungos Filamentosos De Uma Caverna Turística: Subsídios Para o Manejo e a Conservação. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras.
- Teixeira MFS (1994) Obtenção de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* termofílicas e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de alimentos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- Tótola MR (2002) Bioindicadores de qualidade de solo. Resumos 4^o Encontro Nacional de Biólogos. Ouro Preto, MG. p.28.

CAPÍTULO 2

Description of *Penicillium restingae* sp. nov.

Autores: J.P. Andrade, P.A.S. Marbach, C.M.deS. Motta & J.T.de Souza
Submetido à revista **Persoonia**
Molecular phylogeny and evolution of fungi



Colour illustration. sandbanks ecosystem; colonies growing on CYA, MEA and G25N; conidiophores with conidia. Scale bars = 10 μ m.

Etymology. Related to the sandbanks ecosystem, where this species was isolated from.

Microscopic characteristics — *Conidiophores* strictly monoverticillate. *Stipes* smooth walled, 10–22 (–39) × 1–2 (–3) μm. *Vesicle* 2–9 (–12) × 2–6 μm. *Phialides* ampulliform, 4–6 × 1.2–2 (–4) μm. *Conidia* with walls finely roughened, spheroidal, 1–2 μm. Sclerotia not observed.

Culture characteristics — (in the dark, colony diam after 7 days in mm): Colonies on Czapek yeast extract agar (CYA) 25 °C 18–27, plane or umbonate, radially and concentrically sulcate or wrinkled, low to moderately deep, mycelia white, texture velutinous to lightly floccose, sporulation light to moderate, pale grey to greenish grey, exudate clear to almost yellowish brown, reddish brown soluble pigment occasionally produced, reverse typically pale, less commonly yellow or reddish brown. CYA 37 °C 23–33, colony size was the only difference observed for these two temperatures. CYA 5 °C no growth. Colonies on malt extract agar (MEA) 25 °C 16–23, usually umbonate, in some isolate is plane, mycelia white, texture floccose, sporulation light to moderate, white to pale grey, exudate absent, soluble pigment absent, reverse yellow pale to gray pale. Colonies on 25 % glycerol nitrate agar (G25N) 25 °C 9–18, plane, mycelia white, texture floccose or less commonly velutinous, reverse pale.

Typus: Brazil, Bahia, soil on the sandbanks of Guaibim, Jan. 2011, seven isolates coll. by J. P. Andrade; culture ex-type URM 7075; ITS sequence GenBank KF803355, BTUB sequence GenBank KF803349, CMD sequence GenBank KF803352, MycoBank 807051.

Notes — This new species was isolated from soil sandbanks ecosystem in the Brazil. Comparison of ITS, BTUB and CMD sequence data to sequences in GenBank and subsequent phylogenetic analyses based on species (VISAGIE et al. 2013), suggest that the present species is distinct and closely related to *P. adametzii*, but morphologically *P. restingae* is similar to *P. restrictum* (PITT, 1985). *Penicillium restingae* differs from *P. adametzii* by colony size MEA 25 °C, CYA 37 °C and stipe size.

Phylogenetic analysis — A maximum likelihood tree based on ITS, β-tubulin and calmodulin nucleotide sequences shows that this species belongs to the section *Sclerotiora* and is closely related to *P. adametzii* (Fig. 1).

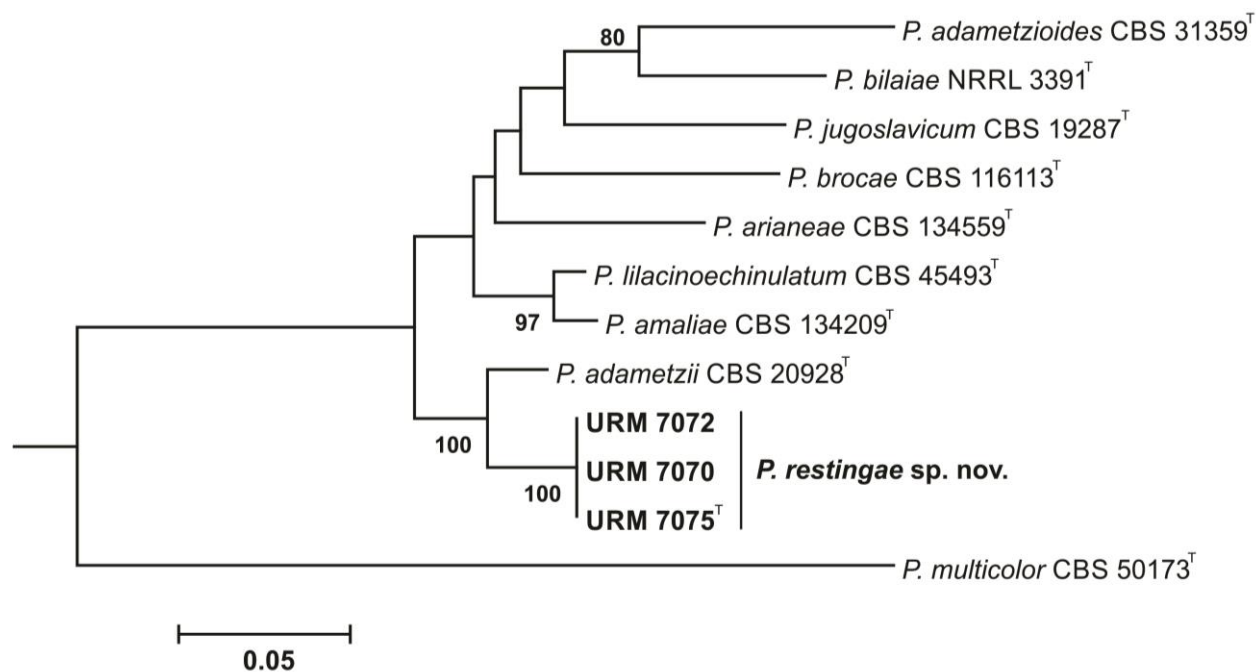


Fig. 1 Maximum likelihood tree based on ITS, β -tubulin and calmodulin nucleotide sequences showing the relationship of species in the section *Sclerotiora*. Trees inferred using the software MEGA 5.2. *P. multicolor* (CBS 501.73^T) were chosen as outgroups. Bootstrap values above 80 % are presented at nodes. (T= ex-type). **Bold** numbers indicate strains that belong to the new species.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

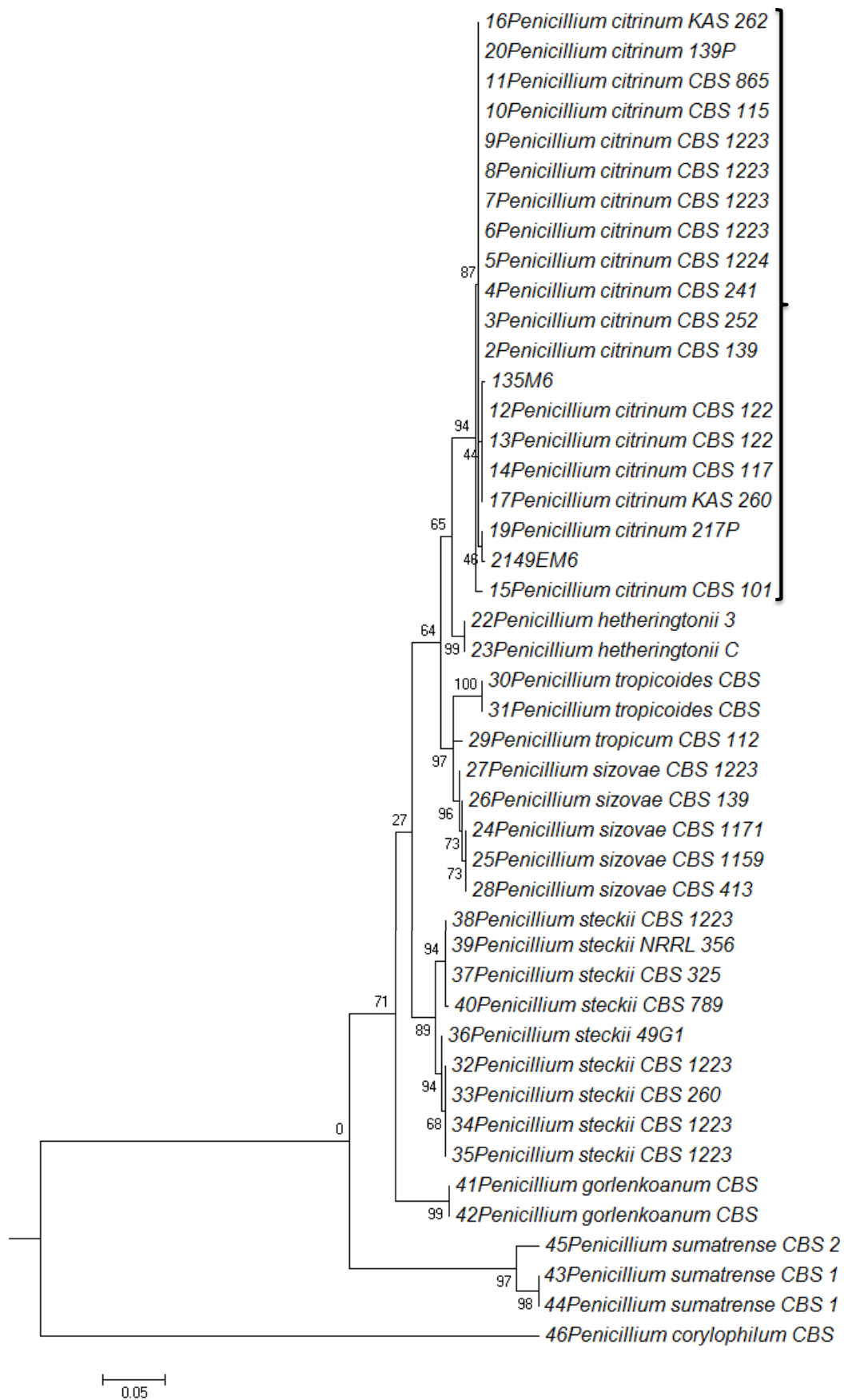
Os fungos são o grupo de eucariotos dos quais se conhece apenas 5 %, de uma diversidade estimada em 5,1 milhões. Isso se confirma nessa amostragem, onde foram encontradas quatro prováveis espécies novas e algumas espécies que haviam sido descritas recentemente.

As restingas podem ser consideradas como um remanescente de espécies relictuais, ou seja, que existiam em ambiente adjacente, como Mata Atlântica e que não existe mais. Talvez por isso, foram encontradas mais de 10 % de espécies que são provavelmente novas ou que foram descritas recentemente. Esses podem ser alguns argumentos para preservar esse ecossistema, que infelizmente é um dos ecossistemas brasileiros com maior ação antropogênica.

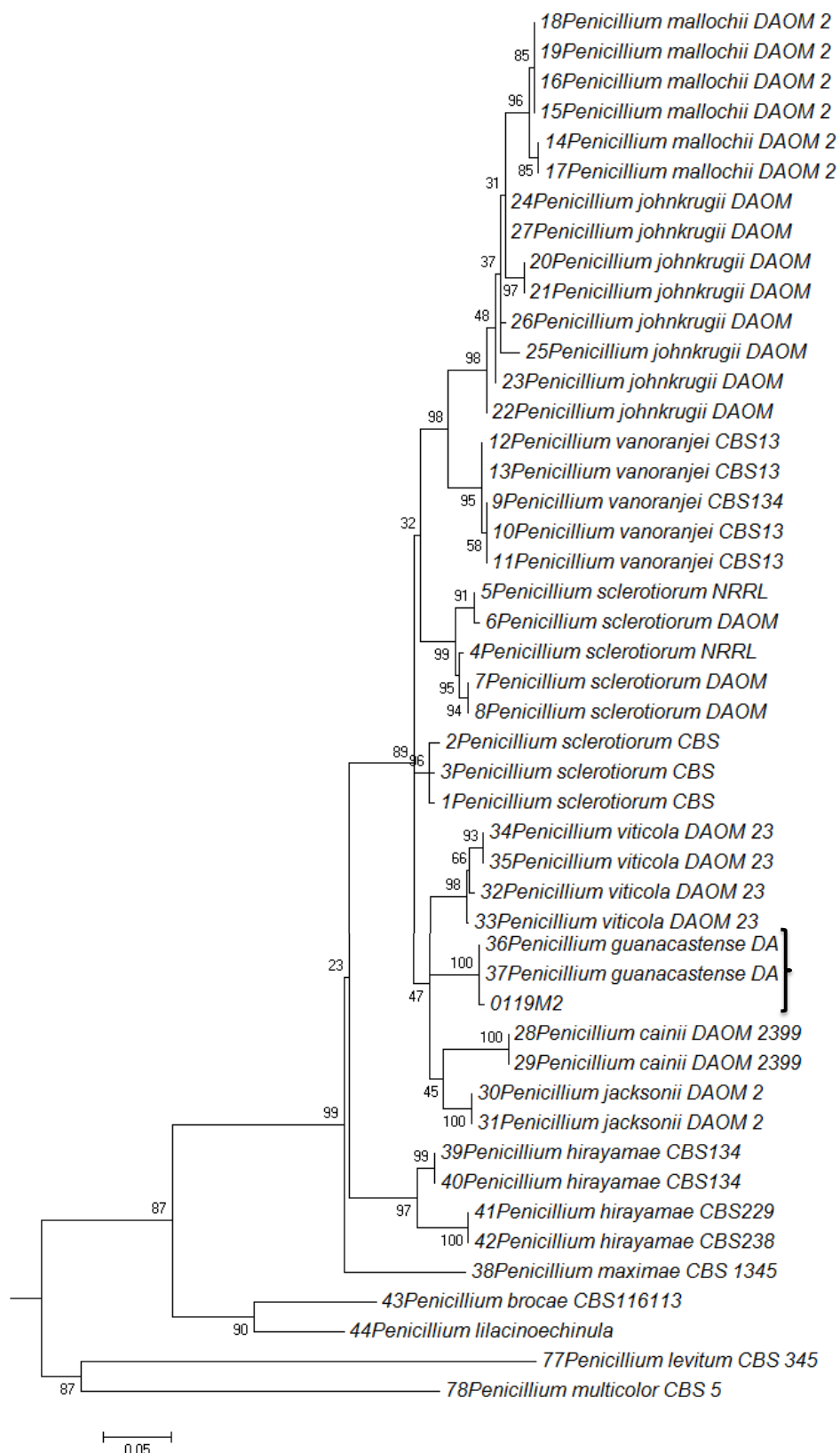
Os resultados desse trabalho enfatizam a diversidade de uma comunidade específica, os fungos filamentosos degradadores de celulose, que foram obtidos por uma intensa amostragem. O número de gêneros e espécies encontrados foi relativamente baixo para os fungos celulolíticos, mas a diversidade total de fungos ainda não foi determinada para esse ecossistema.

Nesse trabalho foram encontradas 4 prováveis espécies novas, 3 de *Penicillium* (*P. restingae* está sendo descrito no capítulo 2) e uma de *Aspergillus*. Além disso, os fungos celulolíticos foram quantificados, identificados ao nível de espécie e caracterizados quanto à produção de celulases. Portanto, o trabalho representa a primeira contribuição para o conhecimento dos fungos celulolíticos da restinga.

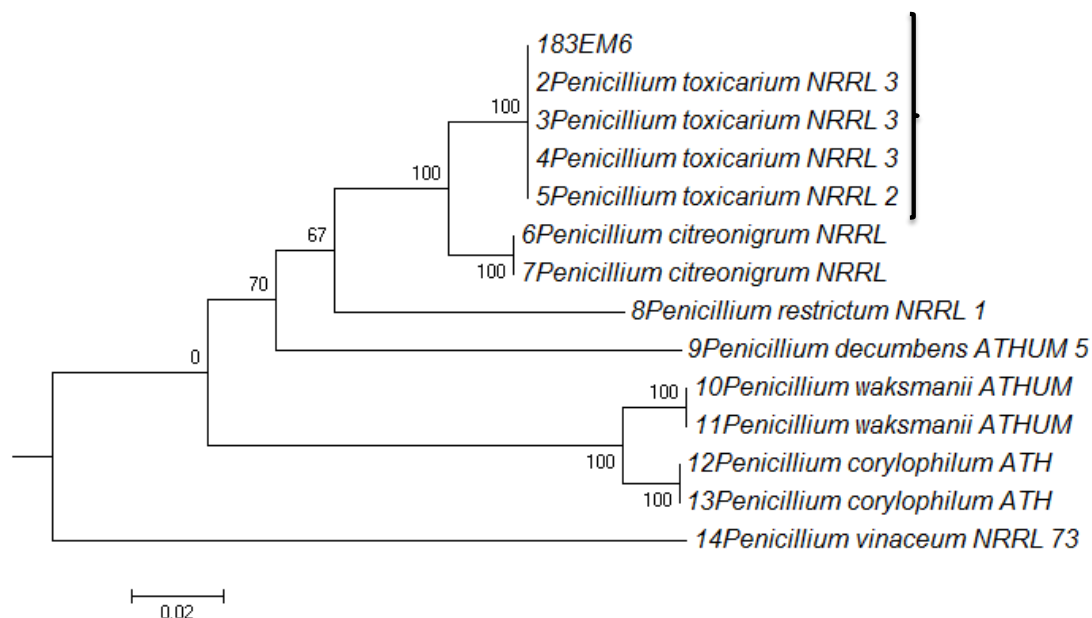
APÊNDICE



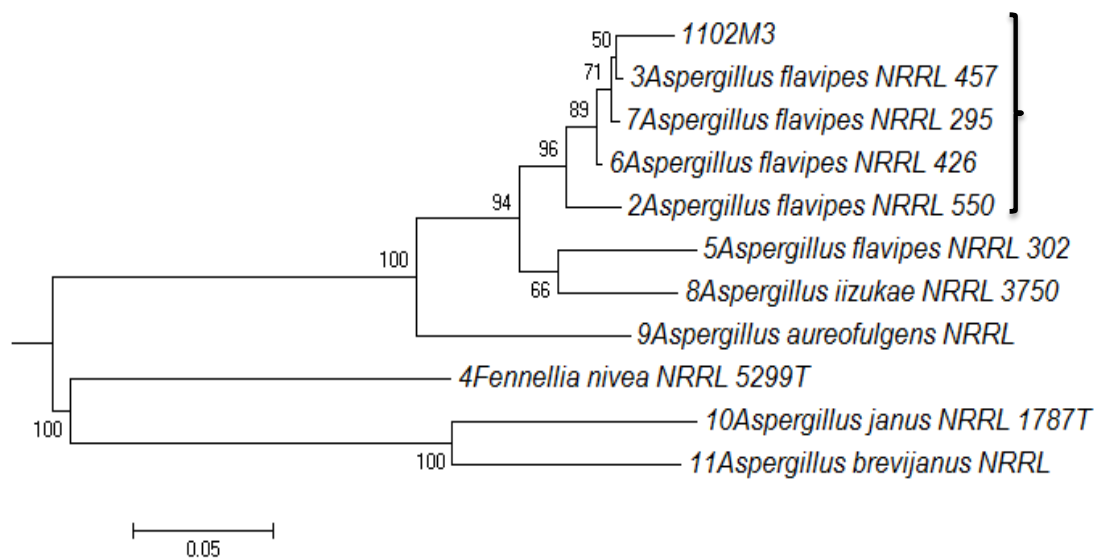
Apêndice 1. Árvore filogenética inferida do alinhamento das sequências do gene β tubulina. O melhor modelo para a substituição de nucleotídeos selecionada pelo MEGA 5.2 foi o modelo Kimura 2-parâmetros (K2 + G) mostrando as relações entre os isolados 49EM6 e 35M6 e a espécie *P. citrinum*. O *P. corylophilum* foi utilizado como grupo externo.



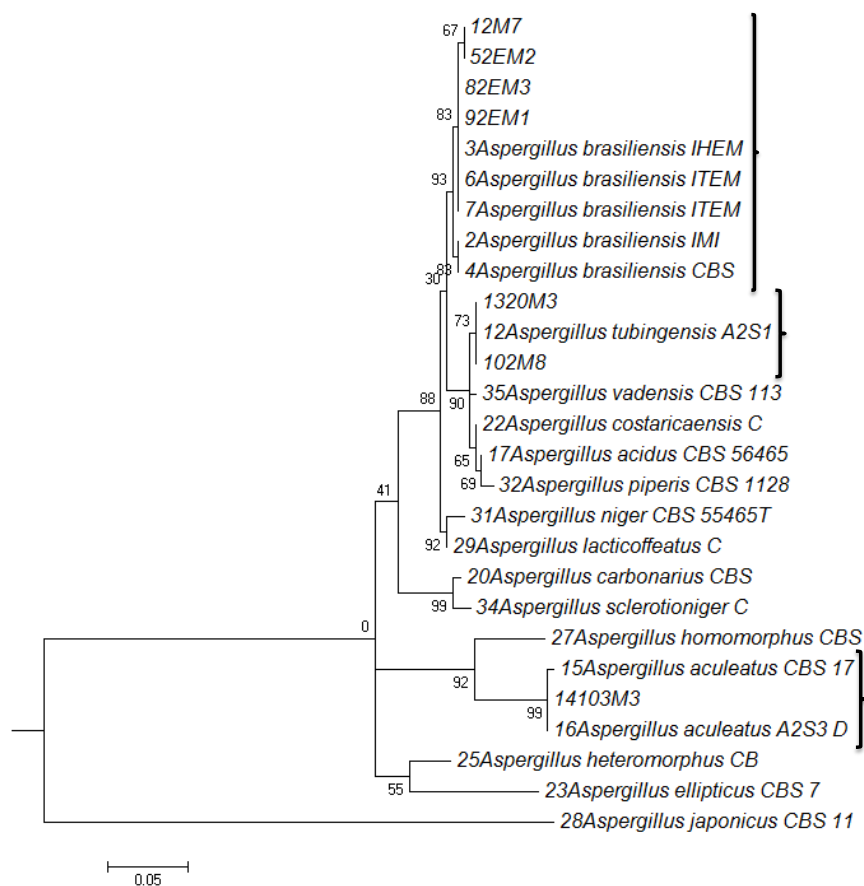
Apêndice 2. Árvore filogenética inferida do alinhamento das sequências do gene β tubulina. O melhor modelo para a substituição de nucleotídeos selecionada pelo MEGA 5.2 foi o modelo Kimura 2-parâmetros (K2 + G) mostrando a relação entre os isolados 19M2 e a espécie *P. guanacastense*. O *P. multicolor* foi utilizado como grupo externo.



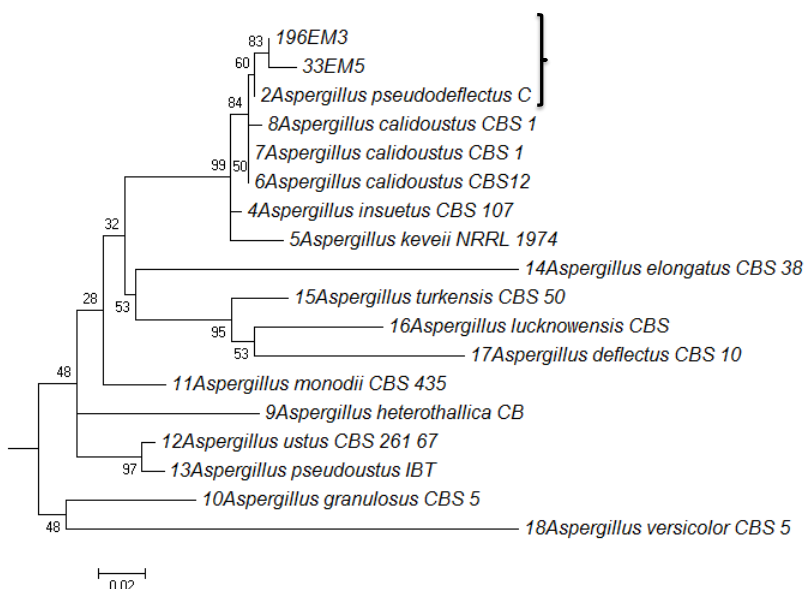
Apêndice 3. Árvore filogenética inferida do alinhamento das sequências do gene β tubulina. O melhor modelo para a substituição de nucleotídeos selecionada pelo MEGA 5.2 foi o modelo Kimura 2-parâmetros (K2 + I) mostrando as relações entre o isolado 83EM6 e a espécie *P. toxicarium*. O *P. vinaceum* foi utilizado como grupo externo.



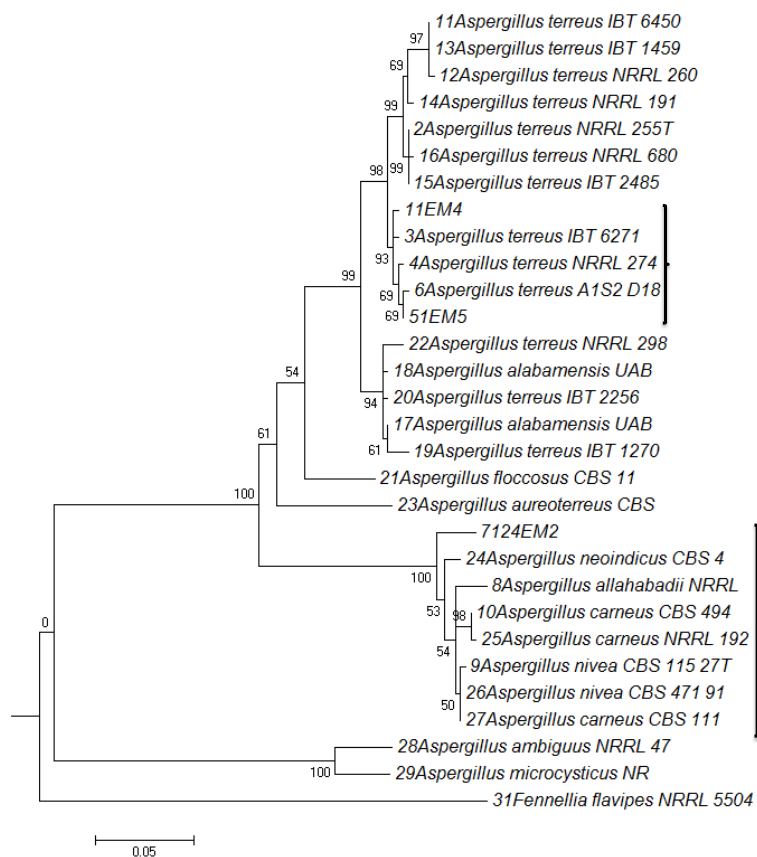
Apêndice 4. Árvore filogenética inferida do alinhamento das sequências do gene β tubulina. O melhor modelo para a substituição de nucleotídeos selecionada pelo MEGA 5.2 foi o modelo Kimura 2-parâmetros (K2 + I) mostrando as relações entre o isolado 102M3 e a espécie *A. flavipes*.



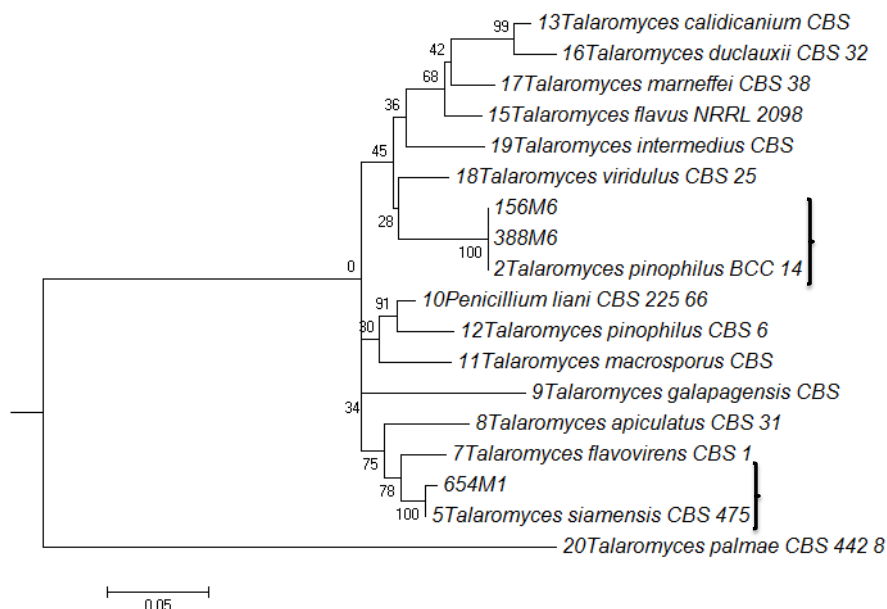
Apêndice 5. Árvore filogenética inferida do alinhamento das sequências do gene β tubulina. O melhor modelo para a substituição de nucleotídeos selecionada pelo MEGA 5.2 foi o modelo Kimura 2-parâmetros (K2 + G + I) mostrando as relações entre os isolados 2M7, 2EM2, 2EM3 E 2EM1 e a espécie *A. brasiliensis*, 20M3, 2M8 e a espécies *A. tubingensis*, 103M3 e a espécie *A. aculeatus*.



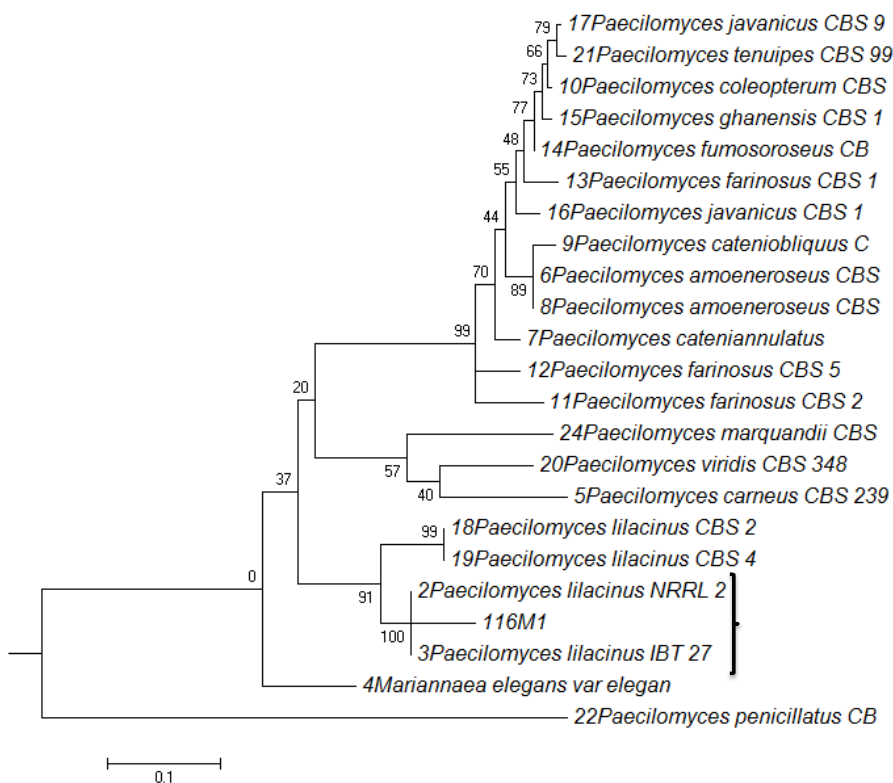
Apêndice 6. Árvore filogenética inferida do alinhamento das sequências do gene β tubulina. O melhor modelo para a substituição de nucleotídeos selecionada pelo MEGA 5.2 foi o modelo Kimura 2-parâmetros (K2 + G) mostrando as relações entre os isolados 96EM3 e 3EM5 com a espécie *A. pseudodeflectus*.



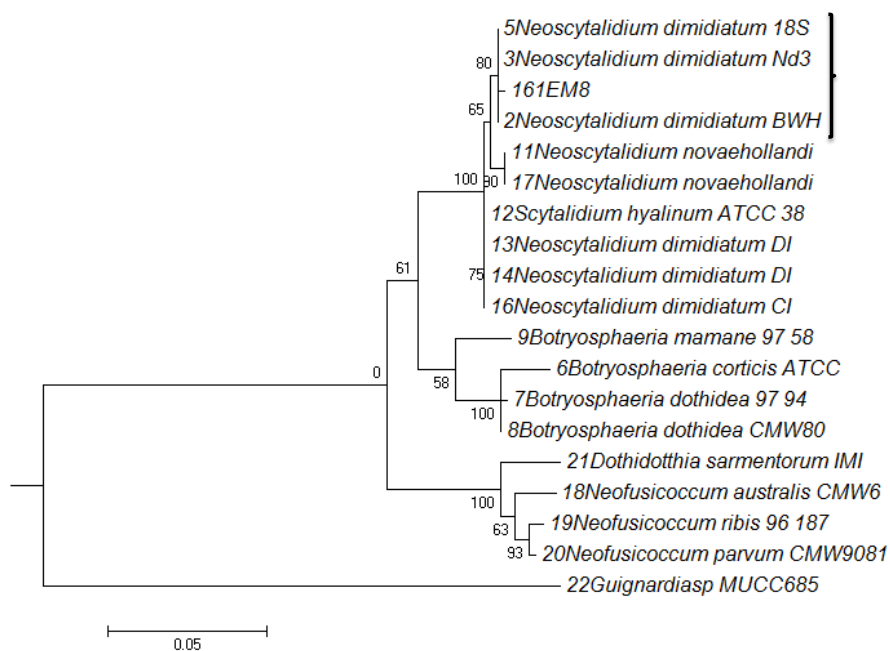
Apêndice 7. Árvore filogenética inferida do alinhamento das sequências do gene β tubulina. O melhor modelo para a substituição de nucleotídeos selecionada pelo MEGA 5.2 foi o modelo Kimura 2-parâmetros (K2 + I) mostrando a relação entre os isolados 1EM4 e 1EM5 com a espécie *A. terreus* e 124EM2 com a espécie *A. neoindicus*.



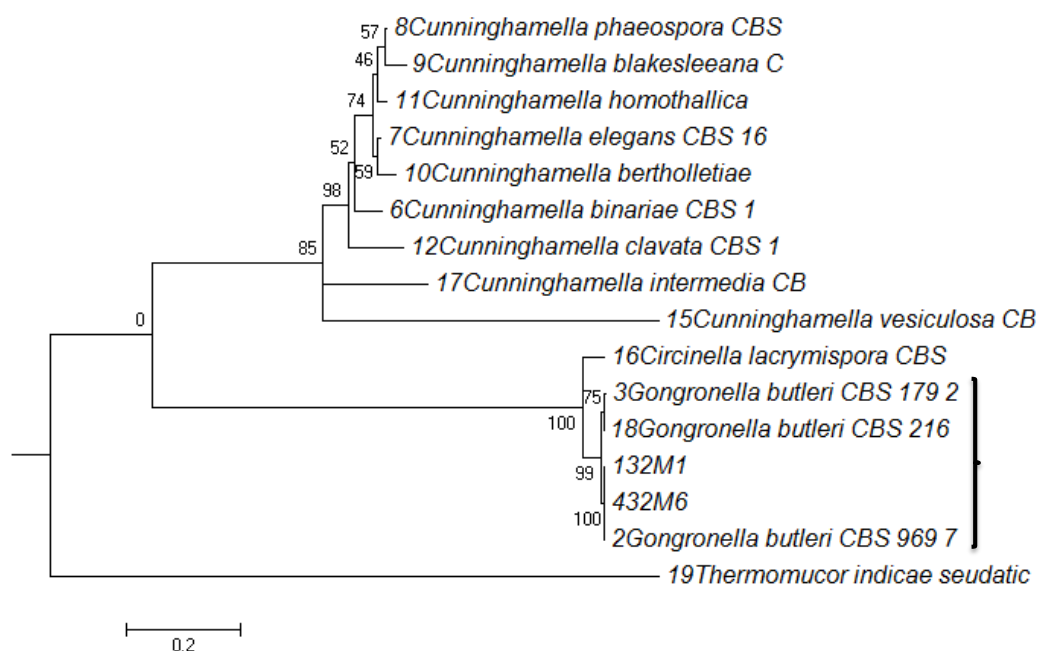
Apêndice 8. Árvore filogenética inferida do alinhamento das sequências do gene β tubulina. O melhor modelo para a substituição de nucleotídeos selecionada pelo MEGA 5.2 foi o modelo Kimura 2-parâmetros (K2 + G) mostrando a relação entre os isolados 56M6 e 88M6 com a espécie *T. pinophilus* e 54M1 e a espécie *T. siamensis*.



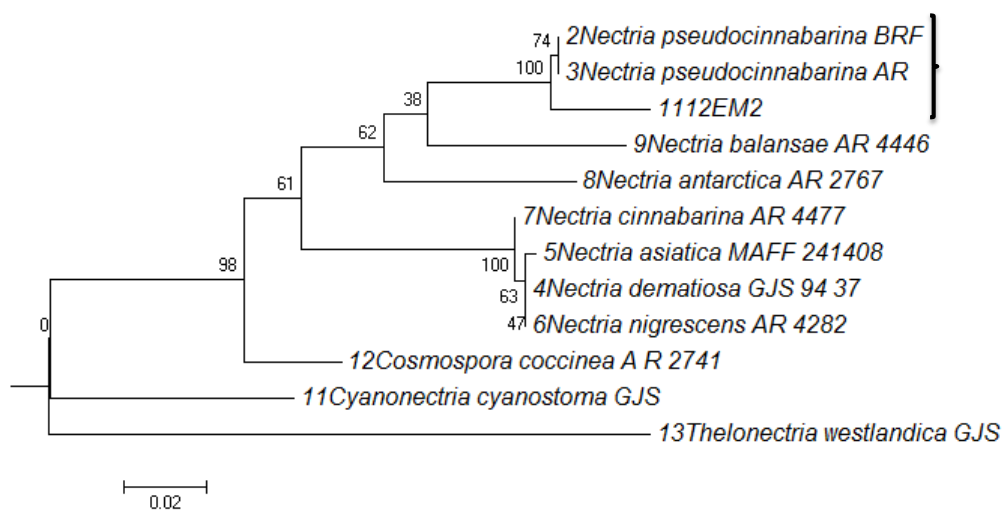
Apêndice 9. Árvore filogenética inferida do alinhamento das sequências do gene β tubulina. O melhor modelo para a substituição de nucleotídeos selecionada pelo MEGA 5.2 foi o modelo Kimura 2-parâmetros (K2 + G) mostrando a relação entre o isolado 16M1 com a espécie *P. lilacinus*.



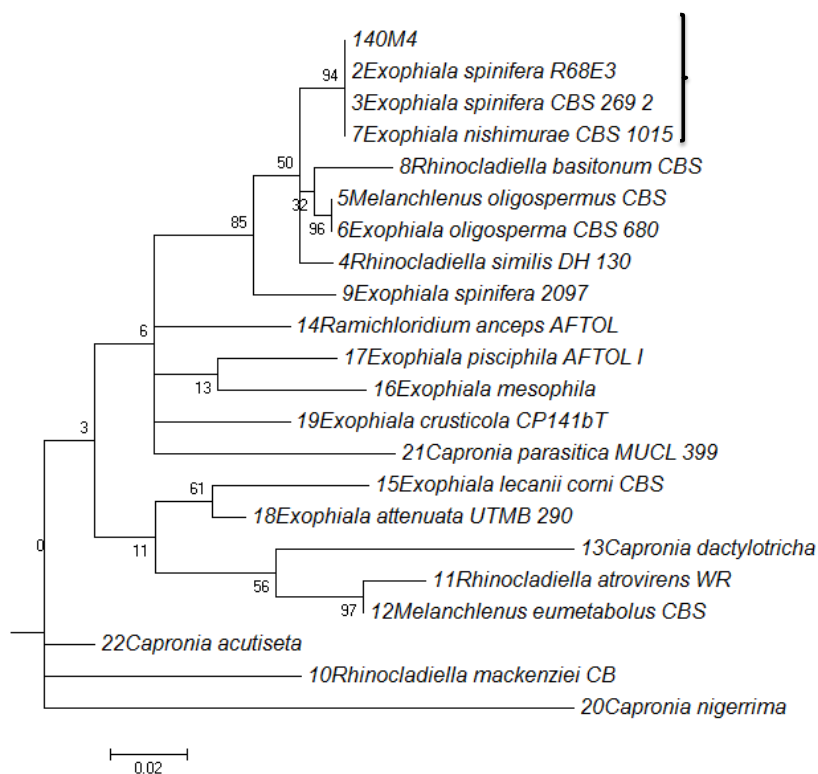
Apêndice 10. Árvore filogenética inferida do alinhamento das sequências do gene β tubulina. O melhor modelo para a substituição de nucleotídeos selecionada pelo MEGA 5.2 foi o modelo Kimura 2-parâmetros (T92 + I) mostrando a relação entre o isolado 61EM8 e a espécie *N. dimidiatum*.



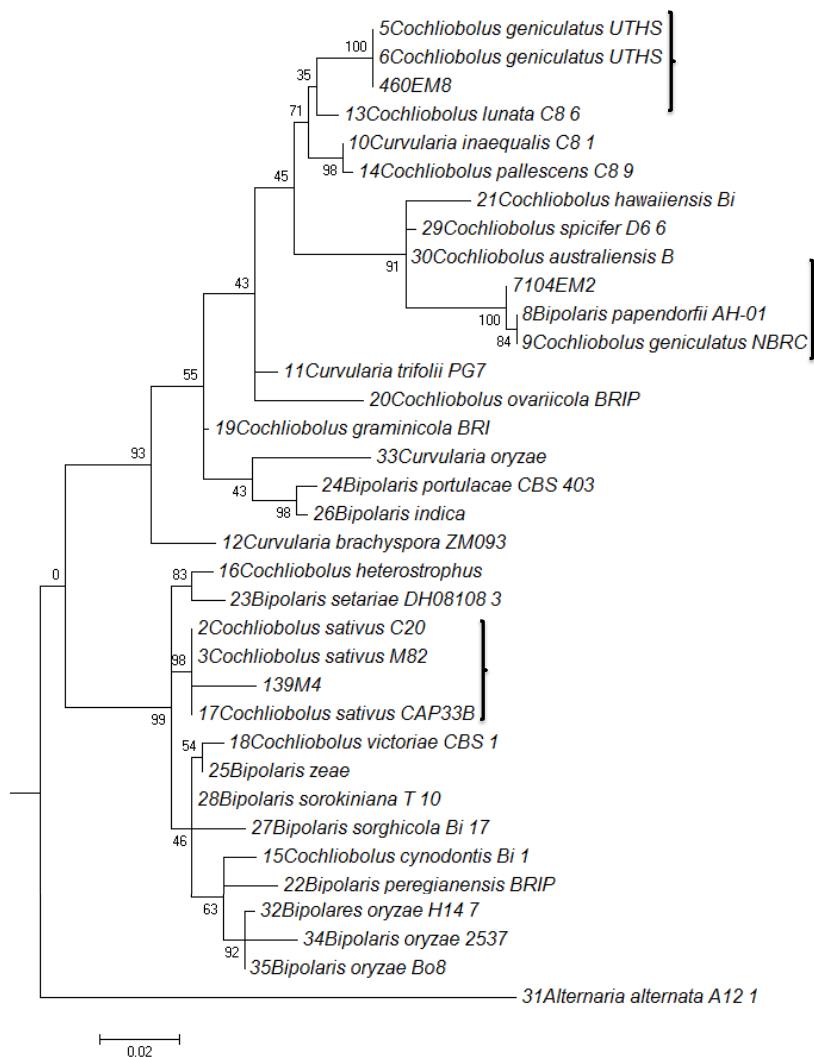
Apêndice 11. Árvore filogenética inferida do alinhamento das sequências do gene β tubulina. O melhor modelo para a substituição de nucleotídeos selecionada pelo MEGA 5.2 foi o modelo Kimura 2-parâmetros (GTR + G) mostrando a relação entre o isolado 32M1 e 32M6 e a espécie *G. butleri*.



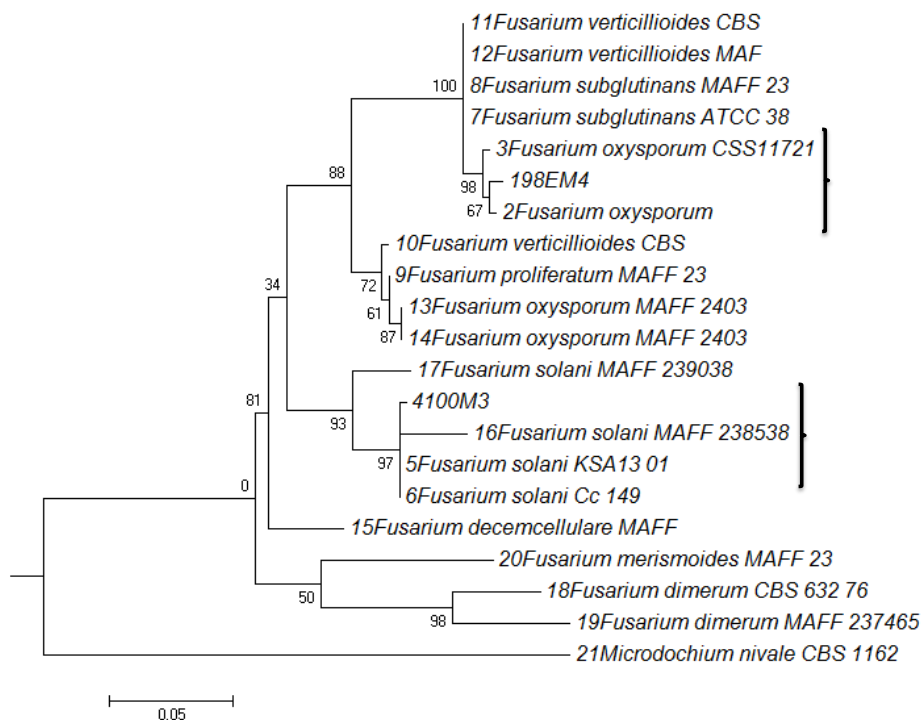
Apêndice 12. Árvore filogenética inferida do alinhamento das sequências do gene β tubulina. O melhor modelo para a substituição de nucleotídeos selecionada pelo MEGA 5.2 foi o modelo Kimura 2-parâmetros (K2 + G) mostrando a relação entre o isolado 112EM2 e a espécie *N. pseudocinnabarina*.



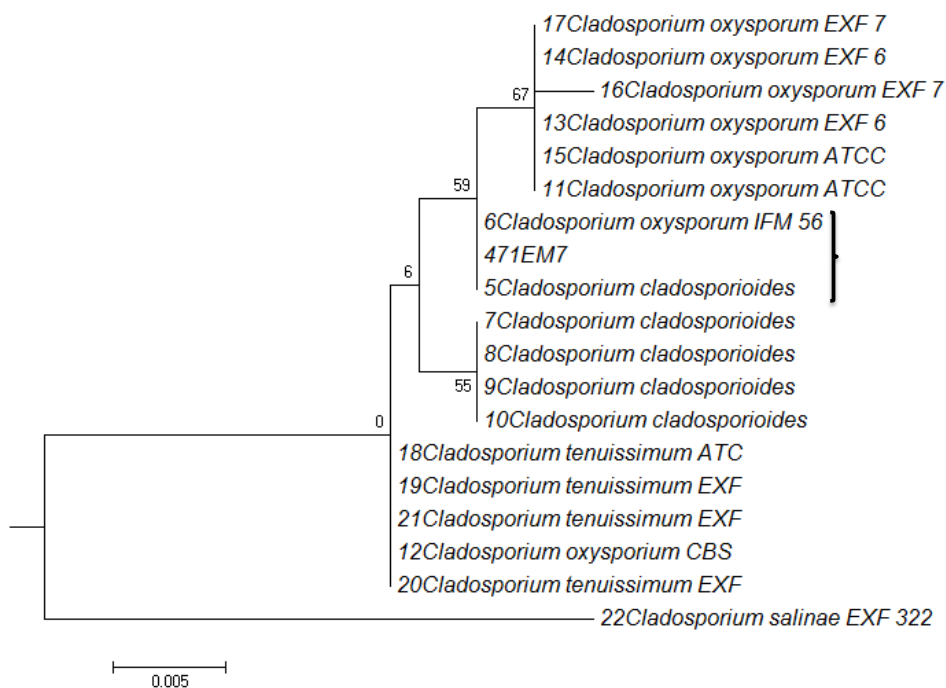
Apêndice 13. Árvore filogenética inferida do alinhamento das sequências do gene β tubulina. O melhor modelo para a substituição de nucleotídeos selecionada pelo MEGA 5.2 foi o modelo Kimura 2-parâmetros (K2 + G + I) mostrando a relação entre o isolado 40M4 e a espécie *E. spinifera*.



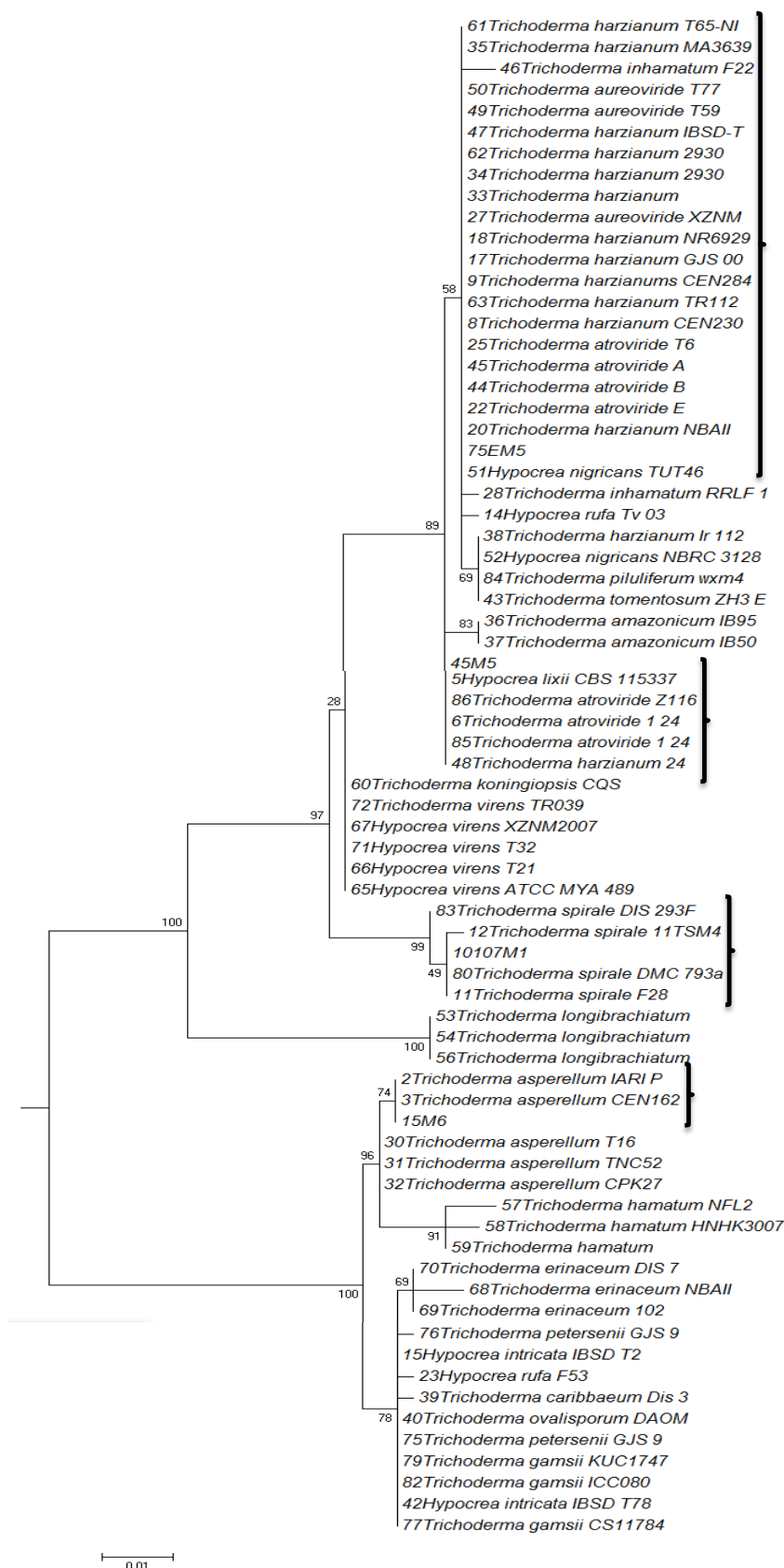
Apêndice 14. Árvore filogenética inferida do alinhamento das sequências do gene β tubulina. O melhor modelo para a substituição de nucleotídeos selecionada pelo MEGA 5.2 foi o modelo Kimura 2-parâmetros (K2 + G + I) mostrando a relação entre os isolados 39M4 e a espécie *B. sativus*; 104EM2 e a espécie *B. papendorffii*; 60EM8 e a espécie *B. geniculatus*.



Apêndice 15. Árvore filogenética inferida do alinhamento das sequências do gene β tubulina. O melhor modelo para a substituição de nucleotídeos selecionada pelo MEGA 5.2 foi o modelo Kimura 2-parâmetros (K2 + G) mostrando a relação entre os isolados 98EM4 e a espécie *F. oxysporum*; 100M3 e a espécie *F. solani*.



Apêndice 16. Árvore filogenética inferida do alinhamento das sequências do gene β tubulina. O melhor modelo para a substituição de nucleotídeos selecionada pelo MEGA 5.2 foi o modelo Kimura 2-parâmetros (K2 + G) mostrando a relação entre os isolados 71EM7 e a espécie *C. oxysporum*.



Apêndice 17. Árvore filogenética inferida do alinhamento das sequências do gene β tubulina. O melhor modelo para a substituição de nucleotídeos selecionada pelo MEGA 5.2 foi o modelo Kimura 2-parâmetros (K2 + I) mostrando a relação entre os isolados 107M1 e a espécie *T. spirale*; 5EM5 e a espécie *T. harzianum*; 5M6 e a espécie *T. asperellum*; 5M5 e a espécie *T. atroviride*.