

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ASSOCIADOS
A LIQUENS PRESENTES EM ECOSISTEMAS EXTREMOS**

Iara Furtado Santiago

Belo Horizonte, Minas Gerais

2015

Iara Furtado Santiago

**Diversidade e Bioprospecção de fungos associados a líquens
presentes em ecossistemas extremos**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de doutor em Microbiologia.

Orientador: Dr. Luiz Henrique Rosa.
Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG

Co-orientadores: Dr. Carlos Augusto Rosa.
Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG

Dr. Douglas Galante
Laboratório Nacional de Luz Síncroton, LNLS/CNPEM/SP.

Dr. Fabio Rodrigues
Laboratório de Astrobiologia Departamento de Química Fundamental,
USP.

Belo Horizonte

Abril de 2015

Colaboradores:

Dr. Carlos Leomar Zani¹

Dr. Tânia Maria de Almeida Alves¹

Dr. Marcelo P. Marcelli²

Dr. José Paulo Sampaio³

Dr. David Wedge⁴

Dr. Charles L. Cantrell⁴

¹Laboratório de Química de Produtos Naturais. Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ/MG.

²Instituto de Botânica /Micologia - Taxonomia e Ecologia de Fungos Liquenizados - São Paulo.

³Centro de Recursos Microbiológicos (CREM), Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal

⁴National Center for Natural Products Research University, United States Department of Agriculture (ARS/NPURU/USDA) - Oxford, MS, USA.

AGRADECIMENTOS

Encerra-se um ciclo... mais uma etapa vencida na busca de um sonho!!

Neste momento agradeço a todos e em especial aqueles que participaram das mais diversas maneiras, formas, jeitos, sorrisos, conselhos, gestos, admiração, atitudes, lágrimas e até mesmo “puxões de orelha”

Obrigada a Deus pois sem ele nada disto seria possível; a minha família que é tudo aquilo de mais importante na minha vida...

Ao meu orientador Luiz Henrique Rosa pela amizade, ensinamentos, confiança, incentivo, oportunidades inesquecíveis e por todos os bons momentos de convivência que me proporcionaram crescimento pessoal e profissional;

Ao meu co-orientador Carlos Rosa pelos conselhos e reflexões ao longo de todo trabalho;

Aos meus co-orientadores Douglas Galante e Fabio Rodrigues que me acolheram com muito carinho e dedicação;

Aos membros da banca examinadora Prof. Daniel de Assis Santos, Dr. Rachel Basques Caligiorme, Prof.^a Silvana de Queiroz Silva, Prof.^a Susana Johann e Prof.^a Vivian Pellizari pelas contribuições que certamente serão muito importantes para o enriquecimento do trabalho;

Aos colaboradores Carlos Zani, Tânia Alves, David Wedge, Charles Cantrell, pelo auxílio na parte química, ao Marcelo Marcelli e Adriano Spielmann pelo auxílio na identificação dos líquens e ao José Paulo Sampaio pelo auxílio na descrição da nova espécie;

Aos meus pais que sempre me ensinaram a acreditar e buscar os meus sonhos, sendo exemplos de persistência e coragem em encarar o novo;

Aos meus irmãos Ivo e Iran pela amizade e momentos de descontração quando tudo parecia perdido;

Aos anjinhos que estão lá do céu a me guiar, a tia Cici e a todos os meus tios, tias, primos e primas “Busca pé” que vibram, incentivam e me acolhem a todos momentos;

Ao meu pingu Rubens por todo amor, paciência, compreensão e companheirismo;

A galerinha do laboratório de hoje, de ontem e de sempre, as CUMPANHEIRAS, ao DESESPERO e as CURICAS pela amizade, ensinamentos, carinho e compreensão até mesmo nas segundas-feiras...

Aos companheiros de Astrolab, que me ensinaram a caminhar e me apaixonar pelo mundo da Astrobiologia;

Aos técnicos e apoio técnico que me incentivaram ao longo de todo trabalho em especial a Camila Silva, ao Ju, Jamil, Ísis e Hebert;

As minhas amigas irmãs que me acolhem, admiram e compreendem as minhas ausências Bu, Bula, Camilinha, Carol, Cateb, Gabinha, Júlia, Mel, Piló, Poli, Quel, Re, Rosa, Si e Tatá;

Ao grupo de pesquisa MycoAntar pelos conhecimentos, oportunidades e descobertas que me proporcionaram;

Aos funcionários, professores e colegas do curso de Pós-graduação em Microbiologia;

Ao CNPq e a FAPEMIG pelo apoio financeiro;

Obrigada a todos aqueles que de alguma forma ajudaram, estiveram ao meu lado e torceram para que este dia chegasse. Hoje vejo que tudo valeu a pena e que se pudesse voltar atrás faria tudo de novo, talvez mais cautelosa e segura, mas não deixaria de fazer!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE DE TABELAS.....	xviii
RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	21
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1 ECOSISTEMAS EXTREMOS.....	25
2.2 MICRO-ORGANISMOS EXTREMÓFILOS.....	26
2.3 FUNGOS LIQUENIZADOS “LIQUENS”.....	28
2.4 BIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR FUNGOS.....	29
2.5 ASTROBIOLOGIA.....	33
3 JUSTIFICATIVA.....	36
4 OBJETIVOS.....	37
4.1 OBJETIVO GERAL.....	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
5.1 ÁREAS DE COLETA.....	38
5.1.1 <i>Antártica</i>	38
5.1.2 <i>Campos de Altitude e afloramentos rochosos</i>	39
5.1.3 <i>Deserto do Atacama</i>	40
5.2 ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DOS FUNGOS.....	41
5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS.....	42
5.3.1 <i>Extração do DNA total</i>	42
5.3.2 <i>PCR microsatélite com o iniciador (GTG)5</i>	43
5.3.3 <i>Amplificação utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4</i>	44
5.3.4 <i>Amplificação da região parcial da β-tubulina</i>	44
5.3.5 <i>Amplificação fragmento gênico da RNA polimerase II</i>	45
5.4 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS.....	46
5.4.1 <i>Perfil fisiológico</i>	46
5.4.2 <i>Extração do DNA total</i>	46
5.4.3 <i>PCR microsatélite com os iniciadores E11 e (GTG)5</i>	47
5.4.4 <i>Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4</i>	48
5.5 PURIFICAÇÃO DOS AMPLICONS.....	48
5.6 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	49
5.7 PRECIPITAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	49
5.8 ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS SEQUÊNCIAS.....	50
5.9 CÁLCULO DE ÍNDICES DE DIVERSIDADE.....	51
5.10 PREPARO DOS EXTRATOS.....	52
5.11.1 <i>Fungos filamentosos</i>	52
5.11.2 <i>Leveduras</i>	52
5.11 PREPARO DOS EXTRATOS DE LIQUENS.....	53
5.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	53
5.12.1 <i>Ensaio com micro-organismos alvos</i>	53

5.12.2	<i>Ensaio antimicrobiano contra Cladosporium sphaerospermum</i>	Erro!	Indicador	não
	<i>definido.</i>			
5.13	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)		55
5.14	ANÁLISE DOS EXTRATOS PO RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)		56
5.15	DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA A RADIAÇÕES ULTRAVIOLETA		57
5.15.1	ENSAIO DE RESISTÊNCIA A RADIAÇÃO UVC		57
5.15.2	ENSAIO DE RESISTÊNCIA A RADIAÇÃO UV AMBIENTAL		58
5.16	ESPECTROSCOPIA DE RAMAN		59
6	RESULTADOS		60
6.1	COLETA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS		60
6.2	DIVERSIDADE DOS FUNGOS ASSOCIADOS AOS TALOS DE LÍQUENS		85
6.3	IDENTIFICAÇÃO DE NOVA ESPÉCIE DE LEVEDURA		90
6.4	ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS		97
6.5	ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS		102
6.6	ANÁLISE DA RESISTÊNCIA À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA		102
6.7	ANÁLISE DE PIGMENTOS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN		104
7	DISCUSSÃO		106
7.1	IDENTIFICAÇÃO E DIVERSIDADE DOS FUNGOS		106
7.2	BIOPROSPECÇÃO DOS FUNGOS		110
7.3	ASTROBIOLOGIA		112
	CONCLUSÕES		114
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		115
8	ANEXOS		133
9	PRODUÇÃO CIENTÍFICA		135

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANT: Antártica

Ar: Argônio

BHCB: Herbário do Departamento de Botânica da UFMG

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

cf: latim for confer =comparado com

CDCl_3 : Clorofórmio Deuterado

CI: Concentração Inibitória

CI_{50} : Concentração Inibitória a 50%

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: Manual Clinical and Laboratory Standards Institute

cm: Centímetro

CO: Monóxido de Carbono

CO_2 : Dióxido de Carbono

CPRG: cloro-phenol red beta-D-galactopyranoside

CREM: Centro de Recursos Microbiológicos

CTAB: Brometo de cetil trimetilamonio

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO: Densidade Optica

EACF: Estação Antártica Comandante Ferraz

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

g: Grama

g/L: Grama por litro

GPS: Global Positioning System

GYMP: glicose, extrato de levedura, extrato de malte, Na_2PO_4

h: Hora

H_2O : Água

HCl: Ácido clorídrico

ICB: Instituto de Ciências Biológicas
IRR/FIOCRUZ: Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz
ITS: Região transcrita interna
 J/m^2 : Joule/metro quadrado
 KH_2PO_4 : Dihidrogenofosfato de potássio
 KNO_3 : nitrato de potássio
LQPN: Laboratório de Química de Produtos Naturais
m: metro
M: molar
MEGA Molecular Evolutionary Genetics Analysis
 $MgCl_2$: cloreto de magnésio
 $MgSO_4$: Sulfato de magnésio
mg: miligrama
mg/mL: miligrama/mililitro
MHz: Mega Hertz
min: Minuto
mL: Mililitro
mm: Milímetro
mM: Milimolar
mol/L : mol por litro
MTT: Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólico
 μg : Micrograma
 $\mu g/mL$: micrograma/mililitro
 μl : Microlitro
 Na_2HPO_4 : dihidrogenofosfato de sódio
NaCl: Cloreto de sódio
NCBI: National Center for Biotechnology Information
NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards
NCI: National Cancer Institute
ng: nanograma
nm: Nanômetro
NO: Óxido Nitrico

O₂ : Oxigênio
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PEG: polietilenoglicol
pH: potencial hidrogeniônico
p.p.m: partes por milhão
pmol: Pico mol
p/v: peso por volume
rDNA: DNA ribossomal
RMN Ressonância magnética Nuclear
rRNA: RNA ribossomal
r.p.m.: Rotações por minuto
RPPN Reserva do Patrimônio Particular Natural
s: Segundo
S: sul
SDS: Dodecil sulfato de sódio
TBE: Tris borato
U: Unidade
UFC Unidade formadora de colônia
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
UFMGCB : Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais
USDA-ARS National Center for Natural Products Research do United States Department of Agriculture
UV: Ultravioleta
UVA: Ultravioleta A
UVB: Ultravioleta B
UVC: Ultravioleta C
UVambiental: Radiação Ultravioleta Ambiental
V: Volts
W: oeste
% : por cento
°C: graus Celsius

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Estruturas químicas da (1) psicrofilina A e (2) cicloaspeptídeo D (DALSGAARD *et al.*, 2004). 31
- Figura 2** Estruturas químicas das bis- antraquinonas com atividade citotóxica isoladas de *Penicillium* sp. coletado em lagos Antárticos (BRUNATI *et al.*, 2009). 32
- Figura 3** Derivados ativos de Ácido Úsnico (Seo *et al.*, 2008). 33
- Figura 4** Talos dos fungos liquenizados coletados na Antártica: A- *Usnea antarctica* Du Rietz e B- *Usnea aurantiaco-atra* (Jacq.) Bory coletados na Península Antártica. A barra na foto corresponde a 1 cm. 39
- Figura 5** Talos dos fungos liquenizados coletado na Reserva do Particular do Patrimônio Natural do Santuário do Caraça, Minas Gerais, Brasil. *Usnea* sp. A barra na foto corresponde a 1cm. 40
- Figura 6** Talos dos fungos liquenizados coletados no Atacama: A *Usnea* sp. e B *Ramalina* sp. 41
- Figura 7** Esquema da placa de ensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). 56
- Figura 8** Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna (ITS) entre os fungos obtidos na Antártica (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. (a) *Capnobotryella*, (b) *Catenulostroma*, (c) *Cladosporium*, (d) *Fusarium*, (e) *Leptosphaeriaceae* e (f) *Mortierella*. A sequência de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) foi utilizada como grupo externo. 66
- Figura 10** Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências do gene da β -tubulina entre os fungos dos gêneros *Fusarium* (a) e *Penicillium* (b) obtidos na

Antártica (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. A sequencia de *Mucor hiemalis* (AY633566) foi utilizada como grupo externo..... **68**

Figura 11 Árvore filogenética preparada a partir da análise de sequências do gene RNA polimerase II entre os isolados do gênero *Penicillium* obtidos na Antártica (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. A sequencia de *Mucor irregularis* (JX976282) foi utilizada como grupo externo. **68**

Figura 12 Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS entre os fungos obtidos no Campos de Altitude (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank (a) *Curvularia/ Cochliobolus/Bipolaris*, (b) *Alternaria* e (c) *Cladosporium*. A sequência de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) foi utilizada como grupo externo..... **73**

Figura 13 Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região **73**

Figura 14 Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS entre os fungos obtidos no Campos de Altitude (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank (i) *Paraconiothyrium*; (j) *Ochrocladosporium*; (l) *Paraphaeosphaeria*; (m) *Phaeobotryosphaeria* e (n) *Phoma*. A sequência de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) foi utilizada como grupo externo..... **74**

Figura 15 Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS entre os fungos obtidos no Campos de Altitude (em negrito)

em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank (o) *Pestalotiopsis/ Neopestalotiopsis*; (p) *Pseudopestalotiopsis*; (q) *Montagnula*; (r) *Microdiplodia* e (s) *Cosmospora*. A sequência de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) foi utilizada como grupo externo..... 75

Figura 16 Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS (a) e análise do gene da β -tubulina (b) entre os isolados do gênero *Arthrinium* obtidos no Campos de Altitude (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. A sequência de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) foi utilizada como grupo externo 75

Figura 17 Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna (ITS) (a) e análise do gene da β -tubulina (b) entre os isolados do gênero *Aspergillus* obtidos no Campos de Altitude (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. As sequências de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) e *Mucor hiemalis* (AY633566) foram utilizadas como grupos externos..... 76

Figura 18 Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS (a) e análise do gene da β -tubulina (b) entre os isolados do gênero *Fusarium* obtidos no Campos de Altitude (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. As sequências de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) e *Mucor hiemalis* (AY633566) foram utilizadas como grupos externos..... 76

Figura 19 Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS (a) e análise do gene da β -tubulina (b) entre os isolados do

gênero *Penicillium* obtidos no Campos de Altitude (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. As sequências de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) e *Mucor hiemalis* (AY633566) foram utilizadas como grupos externos..... 77

Figura 20 Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS (a) e análise do gene da β -tubulina (b) entre os isolados do gênero *Peyronellaea* obtidos no Campos de Altitude (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. As sequências de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) e *Mucor hiemalis* (AY633566) foram utilizadas como grupos externos..... 78

Figura 21 Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS entre os fungos obtidos no Atacama (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank (a) *Alternaria*; (b) *Acremonium*; (c) *Botrytis*; (d) *Coprinopsis* e (e) *Psathyrella*. A sequência de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) foi utilizada como grupo externo. 82

Figura 22 Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS (a) e análise do gene da β -tubulina (b) entre os isolados do gênero *Penicillium* obtidos no Atacama (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. As sequências de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) e *Mucor hiemalis* (AY633566) foram utilizadas como grupos externos..... 83

Figura 23 Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS (a) e análise do gene da β -tubulina (b) entre os isolados do

gênero *Aspergillus* obtidos no Atacama (em negrito) em comparação com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. As sequências de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) e *Mucor hiemalis* (AY633566) foram utilizadas como grupos externos..... **84**

Figura 24 Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS (a) e análise do gene da β -tubulina (b) entre os isolados do gênero *Cladosporium* obtidos no Atacama (em negrito) em comparação com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. As sequências de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) e *Mucor hiemalis* (AY633566) foram utilizadas como grupos externos..... **84**

Figura 25 Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS (a) e análise do gene da β -tubulina (b) entre os isolados do gênero *Fusarium* obtidos no Atacama (em negrito) em comparação com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. As sequências de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) e *Mucor hiemalis* (AY633566) foram utilizadas como grupos externos..... **85**

Figura 26 Curvas de acumulação de espécies das comunidades de fungos associados a líquens coletados na Antártica. (a) curva geral contendo toda a comunidade de fungos associados as espécies de *Usnea* coletadas; (b) da comunidade de fungos de *Usnea antarctica* na ilha Elefante; (c) da comunidade de fungos de *Usnea aurantiaco-atra* na Ilha Rei George, (d) da comunidade de fungos de *U. antarctica* na ilha Deception..... **86**

Figura 27 Dendograma de similaridade utilizando as análises de Sorensen e Bray-Curtis baseado na abundância de espécies coletadas em ilha Elefante, ilha Rei George e ilha Deception.	87
Figura 28 Tabela com índices de diversidade e curva de acumulação de espécies da comunidade de fungos associados a líquens coletados no Campos de Altitude da RPPN Santuário d Caraça, Brasil.	88
Figura 29 Curva de acumulação de espécies da comunidade de fungos associados a líquens coletados no Atacama. (a) dos fungos associados as espécies de <i>Usnea</i> sp. e (b) da comunidade de fungos de <i>Ramalina</i> sp.	89
Figura 30 Dendograma de similaridade utilizando as análises de Sorensen baseado na presença ou ausência de espécies coletadas na Antártica, Campo de Altitude, Brasil e Deserto do Atacama, Chile.	90
Figura 31 Micrografia de contraste de fase de células da linhagem UFMGCB ANT408 cultivada em caldo (YNB + 2% glicose) a 15 °C por sete dias.	94
Figura 32 Árvore filogenética da espécie <i>Tremella</i> sp. 1 , baseada no sequenciamento dos domínios D1/D2 do gene do rRNA.	95
Figura 33 Árvore filogenética da espécie <i>Tremella</i> sp. 1 , baseada no sequenciamento da região IT1-5.8S-ITS2 do gene do rRNA.	96
Figura 34 Gráfico mostrando a porcentagem de espécies testada em cada ilha Antártica com relação a sua capacidade de resistir a doses (a) < 300J/m ² , (b) entre 300 - 600J/m ² , (c) entre 600 - 900J/m ² e (d) > 900 J/m ²	103
Figura 35 Gráficos mostrando a resistência a UV ambiental das espécies testada numa visão geral, em cada ilha testada (a) Ilha Elefante, (b) Ilha Rei George e (c) Ilha	

Deception com relação a sua capacidade de resistir a doses durante 10, 20 e 30 min
de exposição. **104**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Áreas de coleta na Península Antártica.....	38
Tabela 2 Número de isolados de fungos não liquenizados por espécie de líquens e área de coleta.....	60
Tabela 3. Identificação molecular dos fungos obtidos na Antártica.....	62
Tabela 4. Identificação dos fungos associados a <i>Usnea</i> sp. obtidos no Campo de Altitude da RPPN Santuário do Caraça.....	70
Tabela 5. Identificação dos fungos obtidos de líquens coletados no Deserto do Atacama, Chile.	79
Tabela 6. Comparação entre os índices de diversidade das ilhas coletadas na Antártica.	86
Tabela 7. Comparação entre os índices de diversidade das amostra coletadas no Deserto do Atacama, Chile.	88
Tabela 8. Comparação entre os índices de diversidade entre as comunidades de fungos não liquenizados presentes nos talos liquênicos das áreas coletadas.	89
Tabela 9. Perfil fisiológico de assimilação de compostos de carbono e nitrogênio, e crescimento em diferentes temperaturas da espécie <i>Tremella</i> sp. 1 (linhagem ANT 408) e espécies próximas segundo resultado do alinhamento das sequencias dos domínios D1/D2 da subunidade 26S do DNAr.	92
Tabela 10. Atividade antimicrobiana dos extratos produzidos.....	99

RESUMO

Micro-organismos extremófilos são aqueles capazes de sobreviver em ambientes onde os parâmetros ambientais (físico e/ou químico) diferem da normalidade. Estes micro-organismos não só toleram condições extremas específicas com também requerem as mesmas para sobreviver. Este estudo teve como objetivo caracterizar as comunidades de fungos associados aos talos de líquens presentes em ecossistemas extremos, bem como avaliar seu potencial em produzir metabólitos bioativos e buscar táxons modelos eucariotos para estudos de astrobiologia. Amostras de líquens foram coletadas em três ilhas na Península Antártica (Elefante, Rei George e Deception), em Campo de Altitude no Brasil (Reserva do Particular do Patrimônio Natural do Santuário do Caraça) e no Deserto do Atacama, Chile. A partir destas amostras foram obtidos 919 isolados fúngicos (812 fungos filamentosos e 107 leveduras). Os fungos obtidos dos líquens presentes nas ilhas Antárticas foram identificados como pertencentes aos gêneros *Antarctomyces*, *Bensingtonia*, *Candida*, *Capnobotryella*, *Capnodiales*, *Catenulostroma*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Holtermanniella*, *Leptosphaeriaceae*, *Leucosporidiella*, *Mrakia*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Pseudogymnoascus*, *Purpureocillium*, *Rhodotorula*, *Thelebolus*, *Tremella* e *Yarrowia*. Já os isolados dos líquens dos Campos de Altitude foram identificados como pertencentes aos gêneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Arthrinium*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Cosmospora*, *Curvularia*, *Didymellaceae*, *Eurotium*, *Flavomyces*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Microdiplodia*, *Montagnula*, *Neopestalotiopsis*, *Ochrocladosporium*, *Paraconiothyrium*, *Paraphaeosphaeria*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phaeobotryosphaeria*, *Phoma* e *Trichoderma*. Nas amostras do Deserto do Atacama os gêneros encontrados foram *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Coniochaeta*, *Coprinopsis*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Gelasinospora*, *Lecythophora*, *Meyerozyma*, *Neopestalotiopsis*, *Penicillium*, *Preussia*, *Psathyrella*, *Rhodosporidium*, *Torulaspora* e *Ulocladium*. Os fungos foram cultivados e 919 extratos etanólicos foram preparados para os estudos de bioprospecção, os quais foram avaliados em ensaios de atividade antimicrobiana. Após triagem, 37 extratos apresentaram atividade contra pelo menos um dos micro-organismos alvos (seis extratos de fungos da Antártica, nove do Campo de Altitude e 22 do Deserto do Atacama). Treze extratos que apresentaram atividade foram, quimicamente, caracterizados por meio de

seus espectros de Ressonância Magnética Nuclear H¹ (RMN), indicando que nos
35 extratos de isolados dos gêneros *Antarctomyces* e *Leptosphaeriaceae* (obtidos na
Antártica), *Penicillium*, *Bipolaris* e *Pestalotiopsis* (do Campo de Altitude) e *Alternaria*,
Penicillium e *Ulocladium* (do Deserto do Atacama) podem possuir substâncias
aromáticas bioativas. Além disso, 102 isolados de leveduras antárticas foram avaliados
quanto sua capacidade de resistir à radiação ultravioleta (UVC e UV ambiental). As
40 espécies *Rhodotorula laryngis* e *Rhodotorula mucilaginosa* foram capazes de resistir a
intensidades maiores que 900J/m² de radiação UVC e *Rh. mucilaginosa* a mais que 30
minutos de exposição a radiação UV ambiental. Neste estudo observamos alta riqueza e
alta diversidade de fungos associados a líquens presentes na Antártica, Campo de
Altitude e Deserto do Atacama com abundância de espécies cosmopolitas, endêmicas e
45 de possíveis espécies novas. Atividade de bioprospecção e a resistência à radiação
foram relatadas para alguns táxons descritos.

ABSTRACT

50

Micro-organisms are extremophiles those able to survive in environments where environmental parameters (physical and/or chemical) differ from normality. These micro-organisms do not only tolerate too extreme conditions specific to require the same to survive and it is believed that this plasticity extreme condition affecting the primary and secondary metabolic pathways. This study aims to characterize the diversity of fungi associated with lichenized fungi present in extreme ecosystems, evaluate their potential to produce bioactive metabolites and seek eukaryotic models for studies of astrobiology. Lichenized fungi samples were collected on three islands on the Antarctic Peninsula (Elephant, King George and Deception), in Fields Altitude in Brazil and in the Atacama Desert, Chile. From these samples were obtained from a total of 919 fungal isolates (812 filamentous fungi and 107 yeasts). The fungi present in samples obtained from Antarctic islands belong to the genera *Antarctomyces*, *Bensingtonia*, *Candida*, *Capnobotryella*, *Capnodiales*, *Catenulostroma*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Holtermanniella*, *Leptosphaeriaceae*, *Leucosporidiella*, *Mrakia*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Pseudogymnoascus*, *Purpureocillium*, *Rhodotorula*, *Thelebolus*, *Tremella* and *Yarrowia*. The isolates from lichenized fungi in Altitude Fields were identified as belonging to the genera *Acremonium*, *Alternaria*, *Arthrinium*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Cosmospora*, *Curvularia*, *Didymellaceae*, *Eurotium*, *Flavomyces*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Microdiplodia*, *Montagnula*, *Neopestalotiopsis*, *Ochrocladosporium*, *Paraconiothyrium*, *Paraphaeosphaeria*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phaeobotryosphaeria*, *Phoma* and *Trichoderma*. The samples of the Atacama Desert the predominant genera were *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Coniochaeta*, *Coprinopsis*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Gelasinospora*, *Lecythophora*, *Meyerozyma*, *Neopestalotiopsis*, *Penicillium*, *Preussia*, *Psathyrella*, *Rhodosporidium*, *Torulaspota* e *Ulocladium*. Fungi were cultivated and 919 ethanol extracts were prepared for bioprospecting studies, which were evaluated in antimicrobial activity assays. After screening, 37 extracts showed activity against at least one target micro-organisms (six extracts of fungi of Antarctica, nine Field Elevation and 22 of the Atacama Desert) Thirteen extracts showed activity were chemically characterized through its Nuclear Magnetic Resonance H¹ (RMN),

80

indicating that the isolated extracts of *Antarctomyces* e *Leptosphaeriaceae* obtained from Antarctica; *Penicillium*, *Bipolaris* and *Pestalotiopsis* in Altitude Fields, *Alternaria*, *Penicillium* e *Ulocladium* the Atacama Desert have aromatic substances and can be promising sources of bioactive substances. One hundred and two Antarctic yeast
85 isolates were evaluated for their ability to resist ultraviolet radiation (UVC and UV environmental). The species *Rhodotorula laryngis* and *Rhodotorula mucilaginosa* were able to withstand intensities greater than 900J/m² UVC radiation, and *R. mucilaginosa* more than 30 minutes of exposure to radiation UV environmental. This study showed high richness and high diversity of fungi associated with lichens present in Antarctica,
90 Altitude field and Atacama Desert with plenty of cosmopolitan species, endemic and possible new species. Bioprospecting activity and radiation resistance have been reported for some taxa described.

1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos presentes em ambientes extremos, os quais incluem os
100 fungos, vem sendo investigados a respeito de sua distribuição, ecologia, aplicações
biotecnológicas e como modelos para estudos de astrobiologia. Adaptados a diferentes
condições extremas de radiação, dessecação, salinidade, pH, pressão e temperatura, os
micro-organismos extremófilos possuem características diferenciadas em relação a
outros organismos, o que lhes propiciam sobreviver em condições extremas
105 (GOSTINCAR *et al.*, 2010). Algumas espécies de extremófilos podem apresentar ampla
distribuição geográfica, entretanto, alguns táxons tem se mostrado endêmicos de
algumas regiões restritas do planeta. Estudos evolutivos como padrões compartilhados
em filogenia, morfologia e dinâmica de populações são observados em estudos de
fungos que habitam ambiente extremo de baixa temperaturas, pH, pressão, baixa
110 disponibilidade de água e elevada salinidade (GOSTINCAR *et al.*, 2010).

Entre os grupos microbianos, diferentes estudos demonstram que metabólitos
bioativos produzidos por fungos são importantes fontes para o desenvolvimento de
diferentes medicamentos (STROBEL, 2003; FERRARA, 2006; TAN & ZOU, 2006). A
utilização de produtos terapêuticos de origem microbiana teve início com a descoberta
115 penicilina (PEARCE, 1997; CRAGG & NEWMAN, 2005), a qual devido a eficácia
despertou o interesse na busca de outros micro-organismos produtores de substâncias
bioativas (BUTLER & BUSS, 2006). De acordo com Bérdy (2005), se conhece
aproximadamente 9 mil metabólitos bioativos produzidos por fungos (principalmente
Ascomycota e fungos anamorfos). Segundo Saleem et al. (2009), entre os anos de 2000
120 e 2008, mais de 300 novos metabólitos secundários foram relatados. Neste sentido,
diferentes estratégias podem ser adotadas para pesquisa e utilização biotecnológica de
fungos produtores de substâncias bioativas, dentre as quais se destaca a obtenção
daqueles presentes de ambientes inexplorados e que podem representar fontes de
moléculas de interesse farmacológico e agrícola.

125 Nos últimos anos tem crescido estudos que buscaram de alguma forma
evidências de vida fora do planeta (OARGA, 2009, OLSSON-FRANCIS & COCKELL,
2010, JOSEPH, 2014). Os estudos de astrobiologia utilizam como modelos de estudo

espécies de vegetais, cianobactérias (BILLI *et al.*, 2011 , NICHOLSON *et al.*, 2012),
arquéias (FENDRIHAN *et al.*, 2009), fungos (SANCHO *et al.*, 2007, ZAKHAROVA *et*
130 *al.*, 2014) e líquens (DE VERA *et al.*,2013). Entre os fungos, Onofri *et al.* (2008)
avaliaram as espécies *Cryomyces antarcticus* e *Cryomyces minteri*, isolados de rochas
coletadas na Antártica, quanto a capacidade de tolerar a exposição a condições do
espaço e os resultados demonstraram resistência em todas as amostras estudadas,
demonstrando desta forma que os fungos podem representar bons modelos eucariotos
135 para estudos de astrobiologia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ecossistemas extremos

140

Mudanças nas condições de disponibilidade de nutrientes, radiação, temperatura, pressão atmosférica e oxigenação são fatores que podem determinar um ambiente extremo (OARGA, 2009). Ecossistemas extremos são caracterizados por possuir limites superiores ou inferiores de parâmetros físicos e/ou químicos aos quais diferem das características encontradas em ambientes onde a maioria dos organismos habitam. (ROTHSCHILD & MANCINELLI, 2001). Estudos sobre ambientes extremos são de grande importância para investigações evolutivas, origem de novas espécies, vias metabólicas únicas e relações ecológicas entre os organismos que os habitam (OARGA, 2009). Diferentes regiões do planeta apresentam condições desfavoráveis a vida e são consideradas como ecossistemas extremos, entre as quais se destacam as regiões polares, ecossistemas de altitude, desertos e os oceanos.

145

150

155

160

165

O continente Antártico apresenta condições climáticas extremas e constitui um dos ambientes mais inóspitos do planeta (KOSTADINOVA *et al.*, 2009). Muitas das comunidades microbianas presentes neste continente desenvolveram adaptações que possibilitaram a sua permanência em condições desfavoráveis à vida. As baixas temperaturas, que induzem a formação de cristais de gelo no ambiente intracelular, provocam a redução da disponibilidade de água, fator limitante para as comunidades microbianas presentes em regiões polares (GUNDECIMERMAN *et al.*, 2003). A Antártica oferece condições exclusivas para estudar micro-organismos isolados geograficamente de outras comunidades microbianas do planeta em escala de tempo e evolução; além disso, as diferenças na estabilidade e pressão seletiva entre os ambientes antárticos são fatores que influenciam o grau de endemismo e adaptação dos micro-organismos presentes neste continente (VICENTE, 2000). A maioria dos micro-organismos presentes na Antártica estão na forma anamórfica, menor atividade metabólica (NONZOM & SUMBALI, 2015). Segundo Bridge & Spooner (2012) o primeiro fungo descrito na Antártica foi em 1898 o *Sclerotium antarcticum* foi coletado durante uma expedição Belga.

170 Ecosistemas de altitude são ambientes que caracterizam-se por forte incidência
de radiação solar, alta pressão atmosférica e clima seco (COCKELL *et al.*, 2008). Estas
tensões podem induzir pigmentação da célula dos organismos (como por exemplo
produção de melanina, carotenóides) ali presentes como mecanismos de proteção, os
tornando capazes de tolerar altos níveis de radiação UV (MOLINÉ *et al.*, 2010,
COCKELL *et al.*, 2008). Os afloramentos rochosos, que ocorrem em diferentes regiões
do planeta, são comuns nestes ecossistemas de altitude, estes solos apresentam baixo
175 teor de nutrientes sendo muitas vezes impróprios para a agricultura. Os Campos de
Altitude caracterizam-se por apresentar rochas expostas, ambiente seco, de solo bem
drenado e vegetação rasteira formada principalmente por gramíneas e líquens
(BENITES *et al.*, 2003).

De forma geral, os desertos são caracterizados pela baixa disponibilidade de
180 água, alternado a baixas e altas temperaturas e são expostos a condições extremas de
radiação solar, sendo estes fatores limitantes para os organismos residentes (OARGA
2009). Nos desertos, os habitantes primários são as microalgas, cianobactérias e fungos,
os quais podem ser epilíticos, capazes de sobreviver em associação na forma de líquens
ou sob a superfícies das rochas (GARVIE, 2008). Paulino-Lima et al.(2013) demonstrou
185 a presença de bactérias tolerantes a UVC em amostras de solo no Deserto do Atacama,
Chile. Neste sentido, os desertos são considerados regiões alvos para obtenção e estudo
de micro-organismos extremófilos.

2.2 Micro-organismos extremófilos

190 Os organismos que habitam ecossistemas extremos são denominados
extremófilos. Kristjansson e Hreggvidsson (1995) definiram extremófilos como
organismos que sobrevivem em ambientes onde os parâmetros ambientais físico
(temperatura, radiação, pressão) e geoquímicos (dessecação, salinidade, pH, oxigênio)
195 se encontram além da faixa normal. Organismos dos três domínios dos seres vivos
(*Archaea*, *Bacteria* e *Eukaria*) são encontrados em diferentes condições extremas
(SECKBACH & OREN, 2007). De acordo com Rothschild & Mancinelli (2001) e
Magan (2007), os extremófilos são denominados segundo a condição extrema em que
ocorrem, tais como:

200

- (a) psicrófilos - capazes de sobreviver em baixa temperatura (<20 °C) e crescimento ótimo na faixa de temperatura de 10° a 15 °C,
- (b) termófilos - capaz de sobreviver em alta temperatura (>50 °C),
- (c) acidófilos - crescem em pH < 4,0,
- 205 (d) alcalinófilos - crescem em pH > 8,5,
- (e) anaeróbios - crescem na ausência oxigênio,
- (f) halófilos - crescem em ambiente com alta salinidade,
- (g) osmófilos - crescem melhor em meios com uma alta pressão osmótica,
- (h) xerófilos - organismos adaptados à ambiente seco e com pouca humidade.

210

Diferentes espécies de micro-organismos presentes em regiões extremas do planeta vêm sendo caracterizados. Ambientes expostos a condições com intensos níveis de radiações UV e ionizantes, as quais causam inibição da fotossíntese e dano a ácidos nucleicos, vem sendo estudados quando a presença de vida microbiana (OARGA, 215 2009). Enzimas derivadas de micro-organismos extremófilos tem sido estudas pela a capacidade das mesmas em catalisar reações em processos industriais como em processos lignocelulolíticos, amilolítico, com propriedades específicas (ELLEUCHE *et al.*, 2014). Já se sabe que a bactéria *Deinococcus radiodurans* é capaz de resistir a radiação ionizante e radiação UV em até 1.000 Jm⁻² (TYRELL, 1991); espécies de 220 *Rubrobacter* (FERREIRA *et al.*,1999) e da microalga *Dunliella bardawil* (BEN-AMOTZ & AVRON, 1990) também apresentam resistência a diferentes faixas de radiação. *Chrisosporium* spp. foram isolados em condição de pH 11 a partir de amostras de ninhos de aves (MANGAN, 2007). Plemenitas et al. (2014) determinaram dois novos modelos para estudo de halotolerancia, os fungos *Hortaea werneckii* e *Wallemia 225 ichthyophaga* por se adaptarem a concentrações de 5M e 1,5M de NaCl respectivamente.

Gostincar et al. (2010) utilizaram-se de trabalhos que isolaram fungos que vivem em gelo e em ambientes hipersalinos buscando compreender a evolução de espécies cosmopolitas adaptadas a ambientes extremos (FLAMBAGEM *et al.*, 2003; AGOSTA 230 & KLEMENS, 2008). A adaptação de fungos extremófilos a baixas temperaturas foi observada em táxons isolados de amostras de gelo do Ártico, onde Gunde-Cimerman et al. (2003) obtiveram leveduras e fungos melanizados representados pelos gêneros

235 *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Penicillium*, *Astraeus*, *Myriostoma*, *Podaxis* e
na Groelândia. Já os fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Eurotium*,
Cladosporium, *Alternaria*, *Engyodontium*, *Aureobasidium*, *Cordyceps*, *Rhizopus* e
leveduras *Cryptococcus* e *Sporidiobolus* foram isoladas de permafrost em
profundidades de 1 a 17 metros no McMurdo Dry Valleys, Antártica (ZUCCONI *et al.*,
2012).

240

2.3 Fungos liquenizados: “Líquens”

Os fungos liquenizados, comumente chamados de líquens, são formados por
uma associação simbiótica de fungos com clorofíceas unicelulares e /ou cianobactérias,
245 e em alguns casos formado pelos três organismos (HAWKSWORTH *et al.*, 1995),
podem ser considerados como “ecossistemas” onde a interação de parceiros resulta em
comportamento e formas de vida que não são comumente encontradas nos parceiros
isolados (VRABLIKOVA *et al.*, 2006). A diversidade genética e fenotípica dos
organismos envolvidos na simbiose dos fungos liquenizados são alvos de constantes
250 investigações devido produção de metabólitos bioativos (OKSANEN, 2006).

Os fungos liquenizados eram considerados como um grupo taxonômico
denominado *Lichenes*, incluído no reino Fungi até 1981; a partir da proposta do Código
Internacional de Nomenclatura Botânica, o grupo *Lichenes* como grupo taxonômico
passou a ser descrito como um grupo biológico, denominado fungos liquenizados, com
255 características fisiológicas e ecológicas próprias (MARCELLI, 1997). Cerca de 19% de
todos os fungos descritos são liquenizados e a maioria (95-98%) das espécies pertencem
ao filo *Ascomycota* seguido por *Basidiomycota* e alguns fungos anamorfos
(HAWKSWORTH *et al.*, 1995). Entretanto, como se trata de fungos que vivem na
dependência da fotossíntese realizada pelo fotobionte da associação, a unidade biológica
260 chamada de fungo liquenizado apresenta um posicionamento ecológico diferente
daquele que normalmente é associado aos fungos: os fungos liquenizados apresentam
uma ecologia totalmente vegetal, ou seja, dependente de fatores como luz, água e CO₂ e
atuam no ecossistema como produtores (SANCHO & PINTADO, 2004). Assim,
embora seu estudo taxonômico seja estritamente micológico, o estudo de sua ecologia é
265 idêntico ao dos vegetais epífitos e espécies que vivem sobre as rochas (KRANNER *et*

al, 2005). Fungos liquenizados crescem normalmente à razão de milímetro por ano e as sucessões liquênicas podem levar de décadas a séculos. Morfologicamente a associação fungo e microalga/cianobactéria é denominada de talo, sendo estes representados por três formas básicas: crostosos, foliosos e fruticosos (HAWKSWORTH *et al.*, 1995, 270 BUDEL & SCHEIDEGGER 1996, MARCELLI, 1997, OKSANEN, 2006). Fungos liquenizados se reproduzem tanto por esporos que germinam quando encontram o fotobionte apropriado ou por propágulos vegetativos, micobionte e fotobionte (BUDEL & SCHEIDEGGER, 1996).

Líquens, tem ampla distribuição incluindo casca de árvore (líquens corticosos), 275 solo (líquens terrícolas), pedras (líquens saxícolas) e madeira em decomposição (líquens lignícolas) (BOCH *et al.*, 2013) Apesar dos fungos liquenizados serem organismos facilmente dispersos e capazes de colonizar diferentes substratos, eles desaparecem muito rapidamente de regiões sob impacto ambiental, e a eventual reconstituição da comunidade, quando possível, é extremamente lenta (MARCELLI, 1997). Apresentam 280 um crescimento lento (SANCHO & PINTADO, 2004) e frequentemente habitam regiões com alta radiação, temperatura extrema e clima seco.

A plasticidade de adaptação é observada em fungos liquenizados presentes na Antártica e a recuperação de seu aparato fotossintético após o período escuro do inverno é rapidamente re-composto com a presença da luminosidade (OKSANEN, 2006, 285 KAPPEN 2000); por outro lado, a adaptação ao frio e ativação metabólica em presença de água são algumas das estratégias de tolerância ao estresse osmótico (RICHARDSON, 2002). Victoria *et al.*, (2013) catalogaram com base em chaves taxonômicas e banco de dados, vinte e sete espécies de líquens em Hennequin Point , Ilha Rei George/ Antártica, durante o verão austral de 2004/2005 *Usnea antarctica*, *U.* 290 *aurantiaco-atra*, *Rhizocarpon geographicum*, *Cladonia* spp. e *Sphaerophorus globosus* foram as espécies mais abundantes nesta área.

2.4 Bioprospecção de metabólitos bioativos produzidos por fungos

295 Fungos constituem um grande grupo de micro-organismos encontrados, virtualmente, em todos os nichos ecológicos do planeta (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Os habitats, substratos ocupados e as funções desenvolvidas dos fungos são amplamente diversificados nos ecossistemas. Nos últimos anos o número de trabalhos realizados

com objetivo de conhecer a riqueza de espécies de fungos de regiões tropicais,
300 temperadas e polares vem aumentando, bem como o estudo de sua diversidade genética
e, conseqüentemente, utilização em processos biotecnológicos (SINGH *et al.*, 2006,
SANTIAGO *et al.*, 2011, CARVALHO *et al.*, 2012, SCHMIDT *et al.*, 2012,
GODINHO *et al.*, 2013, FURBINO *et al.*, 2014, FERREIRA *et al.*, 2015). Sabe-se que
305 algumas funções desenvolvidas pelos fungos nos ecossistemas podem gerar aplicações
biotecnológicas tais como a decomposição de matéria orgânica, acúmulo de substâncias
tóxicas, alteração da permeabilidade do solo e das trocas iônicas, produção de biomassa
(alimentos ou ração), maturação de alimentos, fermentação, produção de
imunossupressores e antibióticos (CHRISTENSEN, 1989).

Nos últimos anos tem crescido o interesse na diversidade e biotecnologia de
310 micro-organismos extremófilos, os quais são conhecidos por produzir enzimas e
metabólitos secundários com grande potencial biotecnológico (SINGH *et al.*, 2006,
SANTIAGO *et al.*, 2011, GONÇALVES *et al.*, 2012, FURBINO *et al.*, 2014,
GODINHO *et al.*, 2015). Para organismos que vivem em condições extremas são
necessárias diferentes adaptações morfo-fisiológicas para a sobrevivência, as quais
315 ocorrem por meio da síntese de diferentes moléculas, que variam de simples ou até
complexos metabólitos secundários (WILSON & BRIMBLE, 2009). Segundo Wilson e
Brimble (2009) as adaptações a condições extremas afetam as vias metabólicas primária
e secundária, os micro-organismos presentes nestes ambientes apresentam maior
probabilidade de expressar metabólitos originais. Mesmo quando estas moléculas
320 bioativas não apresentam a atividade esperada, ela pode servir como protótipo para o
desenvolvimento de novas moléculas, o que evidencia ainda a importância do estudo de
microrganismos como fonte de novos fármacos (WILSON & BRIMBLE, 2009).

Para que os organismos se desenvolvam em condições extremas de pH,
temperatura, exposição à radiação UV, salinidade e pressão, adaptações únicas como a
325 biossíntese de novas moléculas, que vão desde simples lipídios a complexos metabólitos
secundários, estão presentes nestes micro-organismos (WILSON & BRIMBLE 2009).
Particularmente, os fungos adaptados às condições extremas são frequentemente
investigados pela capacidade de produção de fotoprotetores (micosporinas e pigmentos),
antioxidantes e enzimas ativas a baixas temperaturas (GOMES *et al.*, 2000; LIBKIND
330 *et al.*, 2005; VAZ *et al.*, 2011, ZHAN *et al.*, 2011, GESSELER *et al.*, 2014). Duas

micosporinas, micosporina glicosídeo-glutaminol e micosporina glicosídeo-glutaminol e três metabólitos não identificados que absorvem luz ultravioleta foram obtidos de fungos isolados de águas hipersalinas e gelo polar glacial (KOG EJ *et al.*, 2006). A micosporina glicosídeo-glutaminol age como um soluto complementar em algumas
335 leveduras negras extremófilas expostas a condições salinas de crescimento, auxiliando-as a suportar o estresse osmótico (KOG EJ *et al.*, 2006).

A partir de estudos de bioprospecção e do uso de metabólitos secundários como marcadores químicos, Dalsgaard *et al.* (2004) isolaram dois novos metabólitos (Figura 1), psicofilina A e cicloaspeptídeo D, bem como a substância conhecida
340 cicloaspeptídeo A, a partir da espécie psicrotolerante *Penicillium ribium*. Anteriormente, os cicloaspeptídeos haviam sido obtidos somente a partir de uma espécie do gênero *Aspergillus* (KOBAYASHI *et al.*, 1987). Posteriormente, outras moléculas da mesma série foram isoladas, psicofilina B e C, a partir de outro novo fungo psicrotolerante *Penicillium rivulum* (DALSGAARD *et al.*, 2004). Segundo os mesmos
345 autores, o fungo *P. algidum*, encontrado no solo da Groelândia, produziu um novo metabólito denominado psicofilina D, o qual exibe moderada atividade citotóxica sobre linhagens de células leucêmicas P388 de camundongos. Zhang *et al.* (2009) isolaram do extrato bruto do fungo *Isaria farinosa*, além de substâncias conhecidas, os cicloaspeptídeos F e G, as quais apresentam atividade citotóxica contra células Hela e
350 linhagens de células tumorais de mama MCF-7.

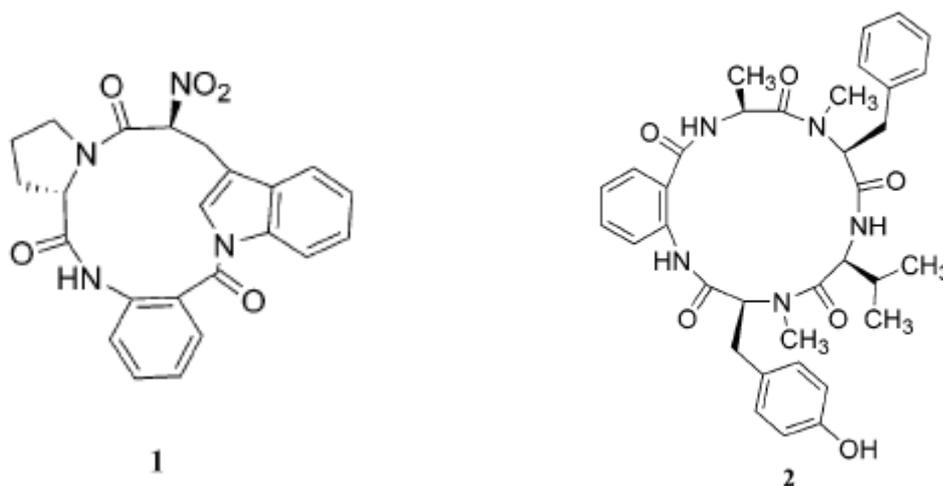


Figura 1. Estruturas químicas da (1) psicofilina A e (2) cicloaspeptídeo D (DALSGAARD *et al.*, 2004).

Brunati et al. (2009) caracterizaram duas moléculas (Figura 2) a partir do extrato
355 fúngico de *Penicillium chrysogenum*, obtido de sedimento do lago Highway, na
Antártica. O extrato apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*
faceum e *Escherichia coli*. As substâncias identificadas foram bis-antraquinonas, duas
micotoxinas conhecidas como rugulosina e esquirina, que possuem atividade
antimicrobiana, antiviral e antitumoral. Além desses metabólitos, duas espécies de
360 *Aspergillus* (*A. clavatus* e *A. niger*) apresentaram também extratos potencialmente
promissores com atividade antibacteriana (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faceum*
e *Escherichia coli*), antifúngica (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e
Aspergillus fumigatus) e citotóxica (contra linhagens de células de câncer de colo de
útero humano). O fracionamento dos componentes ativos indicou possíveis novas
365 substâncias ainda não descritas (BRUNATI et al., 2009).

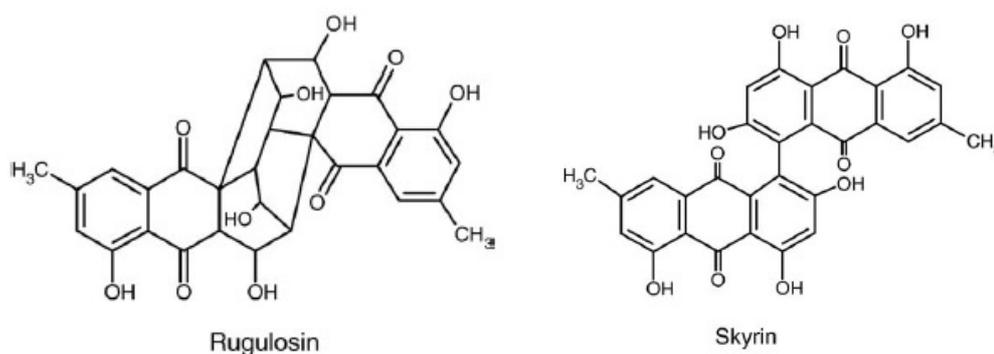


Figura 2. Estruturas químicas das bis- antraquinonas com atividade citotóxica isoladas de *Penicillium* sp. coletado em lagos Antárticos (BRUNATI et al., 2009).

370 A partir de extrato metanólico de *Stereocaulon alpinum*, fungo liquenizado
isolado próximo a estação coreana Rei Sejong na Ilha Rei George na Antártica, foram
isolados três novos derivados ativos de ácido úsnico (Figura 3) (SEO et al., 2008). Este
fungo liquenizado já havia sido descrito em outros trabalhos do grupo ativo a bactérias
gram positivas e apresentou atividade antioxidante (PAUDEL et al., 2008).

375

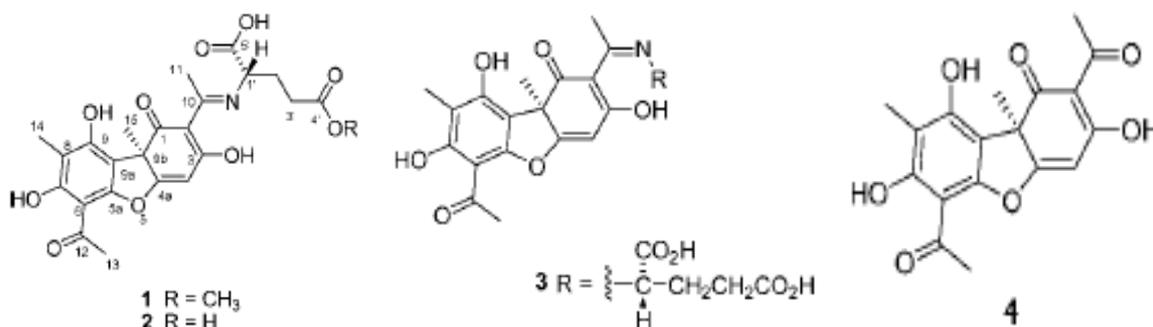


Figura 3. Derivados ativos de Ácido Úsnico (Seo *et al.*, 2008).

380 Svahn *et al.* (2015) isolaram anfotericina B a partir do fungo *Penicillium nalgiovense* isolado de solo de pinguineira na ilha Paulete na Antártica. Esta foi a primeira vez que isolaram anfotericina B a partir de um organismo diferente de bactéria *Streptomyces nodosus*.

2.5 Astrobiologia

385 O estudo de ambientes extremos e a caracterização dos organismos que os habitam motivou os estudos de vida fora da Terra (ROTHSCHILD & MANCINELLI, 2001). Até mesmo o estudo dos extremófilos motivou a possibilidade de compreender e comprovar panspermia, que consiste no transporte de vida de um planeta para outro (ARREHENIUS, 1999). A princípio, a capacidade de um organismo em sobreviver na atmosfera do espaço está relacionada às características como: a sua capacidade de resistir a dessecção, exposição a radiação UV baixas e altas temperatura e diferentes atmosferas química (O₂, CO₂, Ar, CO, NO, entre outros gases) (ISRAELI & LIGHTHART, 1994, GRIFFIN, 2007, OLOSSON-FRANCIS & COCKELL, 2010). A condição do espaço e de superfície de outros planetas do sistema solar são inóspitos para organismos terrestres devido a baixa pressão, vácuo, radiação solar, radiação cósmica. Apenas um pequeno grupo de organismos, conhecidos como anidrobiontes, apresentam potencial de sobreviver ao ambiente espacial ou a diferentes atmosferas de outros planetas (BAGLIONI *et al.*, 2007). A maioria dos experimentos de sobrevivência microbiana em ambientes extraterrestres tem sido realizado com organismos procariontes (OLOSSONFRANCIS & COCKELL, 2010). Alguns organismos submetidos a viagens espaciais são capazes de exibir um certo grau de sobrevivência após a exposição às condições espaciais (HORNECK, 1993; SANCHO *et al.*, 2007).

Horneck et al. (2001) observaram células vivas após a exposição, durante seis anos, dos esporos da bactéria *Bacillus subtilis* no espaço e, desta forma, propuseram que as células vivas foram protegidas por camadas de células superiores mortas da multicamadas do esporo.

Em estudos de simulação de condições espaciais, Billis et al. (2011) utilizaram linhagens da cianobactéria *Chroococcidiopsis* sp. obtidas na Antártica e Deserto do Atacama, Chile. Após diferentes simulações foi possível observar maior resistência da linhagem isolada do Deserto comparando os resultados da linhagem Antártica. A capacidade de deformação da membrana plasmática após exposição a radiação UV e de condições presentes na atmosfera de Marte do isolado da cianobactéria, obtida do Deserto, pode estar ligada a sua maior capacidade de resistência a estresse oxidativo e dissecação. Além disso, altas radiações causaram lesões na membrana plasmática das cianobactérias isoladas da Antártica. Frendrihan et al. (2009) avaliaram a capacidade de arqueias halofílicas capazes de resistir a dessecação (MCGENITY *et al.*, 2000) e as condições de radiações UV de Marte. As bactérias utilizadas foram *Halococcus dombrowskii*, *Halobacterium salinarum* e *Haloarcula japonica* e a resistência foi determinada pela quantidade de indivíduos remanecentes. Os resultados mostraram a diminuição da viabilidade celular a partir do aumento da dose de radiação, sugerindo danos na membrana celular e na permeabilidade e transporte de proteína causados pela radiação UV. Arqueias presente em meio de cultura contendo sais apresentaram maior resistência a radiação UV; esta condição pode ser explicada pelo fato dos cristais de sal terem absorvido parcialmente a luz de menor comprimento (FRIENDRIHAN *et al.*, 2009).

Muitas espécies de líquens são consideradas extremófilas por sobreviverem a condição extremas de temperatura, radiação e dessecação. Os fungos liquenizados tem sido sugeridos como um sistema de vida com maior probabilidade de resistir as condições espaciais, gerando especulações da possibilidade de transferência de vida entre planetas, denominada de teoria da Panspermia (SANCHO *et al.*, 2008). Diferentes espécies de líquens foram expostos ao espaço e a resistência destes organismos a estas condições foram avaliadas pela taxa fotossintética; todos os líquens apresentaram mesma atividade fotossintética medidas antes da exposição ao espaço, sugerindo que estes organismos podem permanecer vivos mesmo sob condição de radiação e

435 dessecação no espaço (SANCHO *et al.*, 2007). Kappenand & Valladares (2007)
mostraram que os líquens apresentam capacidade de recuperação metabólica após
desidratação e congelamento em nitrogênio líquido. Alguns substâncias encontradas nos
líquens, tais como carotenóides e ácido úsnico, podem ser responsáveis pela resistências
destes organismos a altas doses de radiação UV. Além das substâncias químicas, a
440 estrutura do talo do líquens, particularmente o córtex superior, pode proporcionar um
efetiva proteção a radiação UV (GAUSLAA & SOLHAUG, 2004).

3 JUSTIFICATIVA

445

Devido a presença, e em alguns casos predominância, de diferentes espécies de líquens em ecossistemas extremos e sua resistência a condições inóspitas a vida, estes organismos podem se apresentar como um substrato único para a obtenção e caracterização de comunidades de fungos associados, as quais podem incluir táxons novos e/ou endêmicos. Além disso, as espécies presentes nestas comunidades de fungos podem representar uma promissora fonte de metabólitos bioativos, bem como modelos eucariotos para estudos de astrobiologia devido a sua adaptação e sobrevivência à condições extremas. A partir destas proposições, este trabalho visa responder as seguintes perguntas:

455

- Qual a composição, diversidade e similaridade das comunidades de fungos associados aos talos de líquens habitantes de ecossistemas extremos?
- Fungos associados aos talos de líquens são fontes de metabólitos bioativos?
- Fungos associados aos talos de líquens presentes em ecossistemas extremos representam bons modelos eucariotos para estudos de astrobiologia?

460

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

465

Caracterizar a comunidade de fungos associados a talos de líquens presentes em ecossistemas extremos quanto a sua composição, diversidade, similaridade e potencial como fonte de metabólitos bioativos, bem como modelos para estudos de astrobiologia.

470 4.2 Objetivos específicos

- Isolar fungos associados a talos de líquens presentes em Ilhas da Antártica, Campo de Altitude no Brasil e Deserto do Atacama no Chile;
- Depositar todos os isolados obtidos na Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG na forma de contribuir para coleção temática de cultura de micro-organismos presentes em ecossistemas extremos, para preservação *ex-situ* da biodiversidade de fungos extremófilos;
- Identificar todos os fungos obtidos por meio de técnicas morfológicas, fisiológicas e moleculares;
- 480 • Determinar a diversidade e similaridade das comunidades de fungos encontrados;
- Cultivar todos os fungos obtidos e preparar seus extratos para depósitos em uma coleção de extratos;
- Testar todos os extratos produzidos em ensaios biológicos utilizando micro-organismos de interesse clínico e na agricultura,
- 485 • Testar a resistência a diferentes intensidades de radiação (UVC e UV ambiental);

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Áreas de coleta

490 As amostras de talos dos fungos liquenizados foram obtidas em ilhas da
Península Antártica, em Campo de Altitude no Brasil e no Deserto do Atacama, Chile.
As localizações das áreas de coleta foram determinadas por coordenadas geográficas
obtidas por meio do *Global Positioning System* (GPS).

495 5.1.1 Antártica

Na Antártica as temperaturas médias variam entre 0 °C a temperaturas negativas,
nos meses de inverno e a temperatura média em torno dos 15°C no verão, baixa
precipitação e incidência de fortes correntes de vento (ROSA et al., 2010). A ilha
Deception é considerada o local com maior atividade vulcânica na Antártica (LLAMES
500 & VINOCUR 2007) com temperaturas que variam de 11 a -28 °C, enquanto a
temperatura média anual é de -3 °C. Além disso, os ventos predominantes do nordeste e
oeste e a média anual de precipitação de 500 mm condicionam um clima seco
(<http://www.deceptionisland.aq/climate.php>).

Os pontos de amostragens se deram nas Ilhas Elefante, Rei George e Deception
505 situadas no Arquipélago Shetland do Sul, na Península Antártica durante o verão
antártico em janeiro de 2011. Foram coletados fragmentos do talo de 150 indivíduos de
fungos liquenizados (Tabela 1), sendo 100 amostras de *Usnea antarctica* Du Rietz e 50
amostras de *Usnea aurantiaco-atra* (Jacq.) Bory (Figura 4).

510 **Tabela 1** Áreas de coleta na Península Antártica.

Ilhas	Coordenadas	Espécies de líquens	Nº de espécies
Antárticas			
Elefante	61°08'S, 55°07'W	<i>Usnea antarctica</i> Du Rietz	50
Rei George	62°09'S, 58°28'W	<i>Usnea aurantiaco-atra</i> (Jacq.) Bory	50
Deception	62°57'S, 60°38'W	<i>Usnea antarctica</i>	50

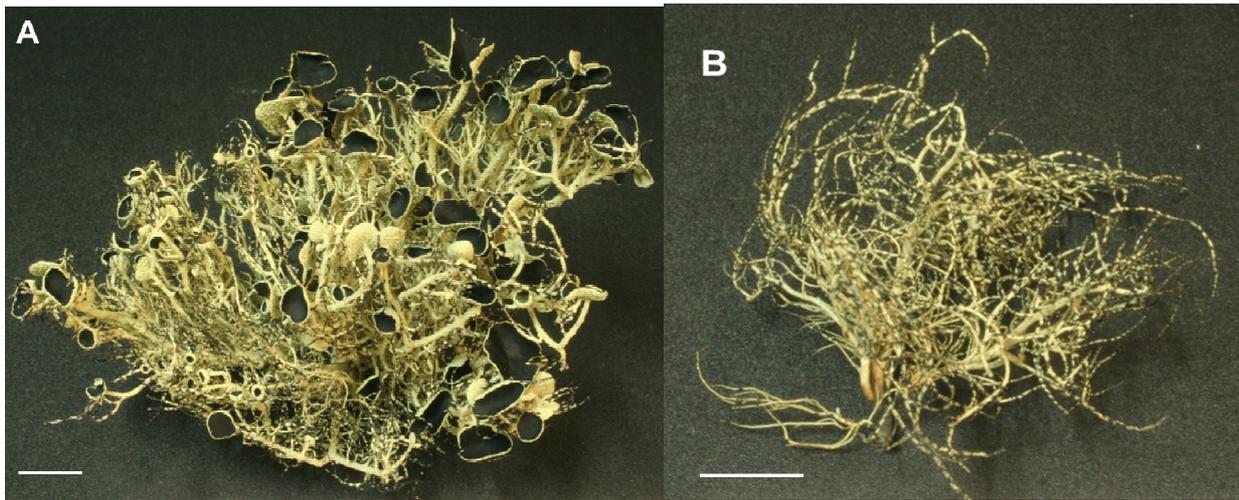


Figura 4. Talos dos fungos liquenizados coletados na Antártica: A- *Usnea antarctica* Du Rietz e B- *Usnea aurantiaco-atra* (Jacq.) Bory coletados na Península Antártica. A barra na foto corresponde a 1 cm.

515

5.1.2 Campos de Altitude e afloramentos rochosos

A Reserva do Patrimônio Particular Natural (RPPN) do Santuário do Caraça foi criada em 1994 e está localizada ao sul da Cadeia do Espinhaço, no extremo leste do Quadrilátero Ferrífero, entre os Municípios de Catas Altas e Santa Bárbara, Minas Gerais e apresenta um área de 11.233 ha. Segundo Dutra et al. (2002), nessa região predominam temperaturas amenas durante todo o ano (18° a 19 °C), com a máxima raramente ultrapassando os 30 °C e a mínima podendo alcançar valores negativos, principalmente nas maiores altitudes. A RPPN do Santuário do Caraça está incluído no bioma Mata Atlântica e possui, predominantemente, formações campestres rodeadas e encravadas por formações florestais típicas da Mata Atlântica com altitudes que variam de 750 a 2.090 metros. Nesta área o ponto de coleta se concentra nos campos de altitude onde estão localizados os afloramentos rochosos e apresenta grande concentração de líquens. O Pico do Sol (20°06'692S, 43°26'658W) a 2.085 m de altitude é caracterizado por apresentar alta incidência de radiação e baixa precipitação. A coleta foi realizada em junho de 2011, durante o inverno e foram amostrados 50 indivíduos de *Usnea* sp. (Figura 5).

530

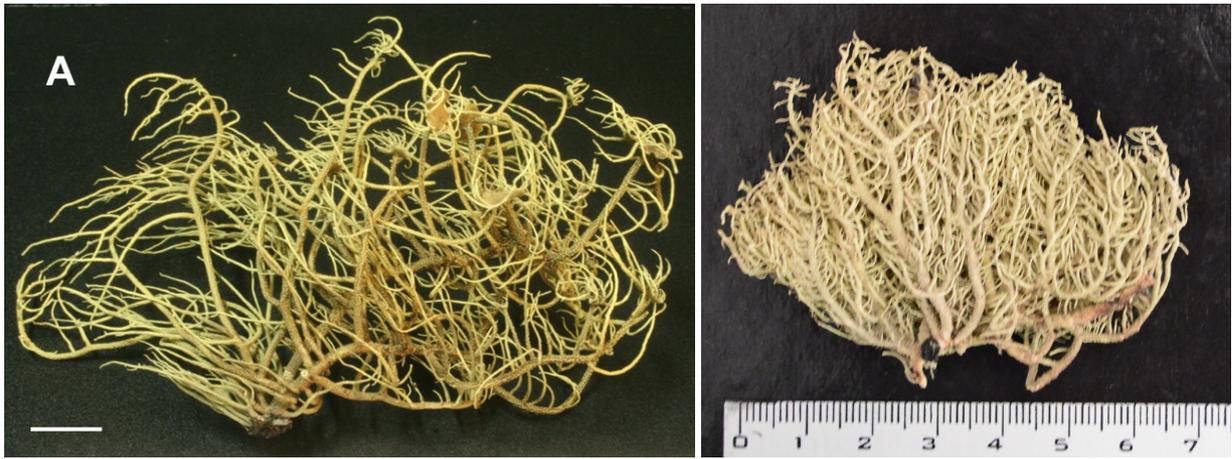


Figura 5. Talos dos fungos liquenizados coletado na Reserva do Particular do Patrimônio Natural do Santuário do Caraça, Minas Gerais, Brasil. *Usnea* sp. A barra na foto corresponde a 1 cm.

535

5.1.3 Deserto do Atacama

O Deserto do Atacama está localizado na região norte do Chile com cerca de 1.000 km de extensão e é considerado o deserto mais alto e árido do mundo. Segundo Ericksen (1983), baseado em medições da composição do solo e de evidências geológicas, determinou que esta região é caracterizada como permanentemente seca no últimos 10-15 milhões anos, a topografia do local, uma vez que o deserto é cercado por cadeias de montanhas, o que influencia diretamente as características climáticas desta região (MACKAY *et al.*, 2003). As temperaturas no Deserto do Atacama variam entre 0° (à noite) e 40 °C durante o dia com alta radiação solar. O Deserto do Atacama apresenta terreno rochoso com altitudes que variam de 2.300 a 6.893 metros e pouca vegetação, com predominância de plantas de pequeno porte e líquens. A coleta dos líquens foi realizada em janeiro de 2012, sendo indivíduos do gênero *Usnea* sp. e *Ramalina* sp. em dois pontos em diferentes altitudes respectivamente: Reserva do Paposo (25°016'158S, 70°422'553W) a 746 m e Parque Pan de Azucar (26°295'352S, 70°659'348W) a 83 m em relação ao nível do mar. Nestas áreas foram coletados fragmentos de um total de 39 líquens (12 de *Usnea* sp. e 27 de *Ramalina* sp.) (Figura 6).

540

550



555 **Figura 6.** Talos dos fungos liquenizados coletados no Deserto do Atacama. A *Usnea* sp. e B *Ramalina* sp.

5.2 Isolamento e preservação dos fungos

Os fragmentos dos talos dos indivíduos coletados foram picotados com auxílio
560 de pinça e/ou tesoura esterilizadas e em seguida inoculados diretamente em placas de
Petri contendo Agar YM (glicose 1%, peptona 0,5%, extrato de malte 0,3%, extrato de
levedura 0,3% e ágar 2%) suplementado com 200 µg/mL de cloranfenicol
(Sigma/EUA). As amostras de líquens do Deserto do Atacama passaram, antes de ser
565 fragmentadas, por um processo de lavagem com água destilada esterilizada devido a
presença de grande depósito de poeira. As placas foram incubadas em temperaturas
médias de cada região de coleta (15 °C para Antártica e 25 °C para o Caraça e Deserto
do Atacama, respectivamente) por um período de até 60 dias. Após o crescimento os
isolados foram purificados em novas placa de Petri contendo YM. Os isolados de
570 fungos filamentosos obtidos foram preservados em duplicata em glicerol 15% a -80 °C
e em água destilada esterilizada (CASTELLANI 1967). Os isolados de leveduras foram
preservados em caldo GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte
1% Na₂PO₄ 0,2%) com 15% de glicerol a -80 °C. Todos os isolados obtidos durante o
trabalho foram depositados na Coleção de Micro-organismos e Células do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

575

5.3 Identificação dos fungos filamentosos

580 Todos os isolados de fungos filamentosos tiveram as colônias fotografadas (frente e verso) e agrupadas de acordo com suas características macromorfológicas como cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso), aspecto da borda e tempo de crescimento. Posteriormente os grupos formados por meio das características citadas foram submetidos à análise de perfis moleculares pela técnica de PCR microsatélite (MSP-PCR), utilizando o oligonucleotídeo sintético (GTG)₅. Os
585 isolados com padrões de banda de DNA idênticos foram confirmados como pertencentes ao mesmo grupo. Um isolado de cada agrupamento foi selecionado para identificação molecular por meio de sequenciamento da região espaçadora transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do RNA ribossomal. As identificações de alguns grupos foram confirmadas por meio do sequenciamento parcial do gene da β -tubulina
590 e/ou do fragmento gênico da RNA polimerase II.

5.3.1 Extração do DNA total

A extração de DNA total foi realizada de acordo com metodologia descrita por Rosa et al. (2009). Os fungos filamentosos foram crescidos por sete dias em YM,
595 fragmentos do micélio foram raspados e colocados em tubo de 1,5 mL até completar metade do tubo, acrescidos de 400 μ L de tampão de lise (Tris-HCl – trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS – sódio dodecil sulfato 1%) e deixado a – 20 °C por aproximadamente 10 minutos. O micélio foi triturado em extrator de células (Bullet
600 Blender™ 24 – Uniscience) com o auxílio de 3 esferas de aço inox esterilizadas (3,175 mm de diâmetro). Em seguida, foram adicionados 162 μ L de CTAB (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização no vortex e incubação por 10 minutos a 65 °C. Posteriormente, foram acrescentados 570 μ L da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização, o tubo foi incubado por 30
605 minutos em gelo. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 13.200 rpm por 15 minutos e o líquido sobrenadante transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Ao novo tubo foram acrescentados 10% do volume de uma solução de acetato de sódio 3 M. O tubo foi vertido para homogeneização, em gelo por 30 minutos e centrifugado a 13.200 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados

610 50% do volume de isopropanol (Merck) e mantido a temperatura ambiente por 15 minutos. Foi realizada uma centrifugação a 13.200 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi desprezado por inversão e em seguida, adicionados 200 µL de etanol (Merck) 70% frio e a suspensão foi gentilmente homogeneizada. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 13.200 rpm por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão. A amostra foi deixada 24 horas para secagem e após este período foi adicionados 50 µL de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M). A amostra foi incubada a 65 °C por 60 minutos para hidratação do DNA. O produto obtido foi quantificado em espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop ND 1000 Thechnologies, EUA) e armazenado a -20 °C até utilização.

620

5.3.2 PCR microsatélite com o iniciador (GTG)₅

O DNA total extraído foi submetido à PCR utilizando o iniciador (GTG)₅ (LIECKFELDT et al., 1993) para a análise de identidade genética dos isolados obtidos. Para a reação, foi utilizado 2,5 µL de tampão 10X (MBI Fermentas), 1 µL de dNTP 0,05 mM (Invitrogen, EUA), 1,5 µL de MgCl₂ 1,5 mM (MBI Fermentas), 2 µL do iniciador (GTG)₅ 10 µmol⁻¹ (Invitrogen, EUA), 0,2 µL de taq DNA polimerase 1,25 U (MBI Fermentas) e 1 a 5 µL de DNA (de maneira que a reação final contenha entre 50 a 500 ng/µL de DNA). O volume final da reação foi completado com água para injeção esterelizada, para 25 µL. A PCR foi realizada em um termociclador PCR Express (Vapo.protect - Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por dois minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 50 °C por um minuto e extensão a 72 °C por um minuto, seguidos de extensão final a 72 °C por seis minutos.

Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1,5% em tampão TBE 0,5% (54 g de Tris Base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0) a 80 V por 60 minutos para a obtenção de bandas. Os géis foram corados com uma solução de agente intercalante GelredTM (Biotium, EUA) a 0,2%, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação de gel (Vilber Lourmat, França).

640

5.3.3 Amplificação utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4

Um a dois isolados de cada agrupamento foram amplificados utilizando os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e foram utilizados para amplificação da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do rRNA, conforme descrito por White et al. (1990). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 50 μ L contendo 5,0 μ L de tampão 10X (Fermentas), 3,0 μ L de $MgCl_2$ 25 mM (Fermentas), 2,0 μ L de dNTP 10 mM (Invitrogen, EUA), 1,0 μ L de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 μ mol⁻¹ (Invitrogen, EUA), 0,2 μ L de *Taq* DNA polimerase 1,25U (Fermentas), de 1,0 a 5,0 μ L de DNA, de acordo com a dosagem obtida em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Thecnologies), a qual deve estar entre 50-500 ng/ μ L; e o volume final completado com água para injeção autoclavada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR (Vapo.protect - Eppendorf). O programa consiste de uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto da anelamento a 55 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os produtos de amplificação foram analisados após aplicação em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1% em tampão TBE 0,5% (54 g de Tris Base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0) a 120 V para a obtenção de bandas. Os géis foram corados com solução de GelRed (Biotium, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta (UV) por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França).

5.3.4 Amplificação da região parcial da β -tubulina

Para amplificação parcial do gene da β -tubulina foram utilizados os iniciadores BT2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e BT2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC), conforme descrito por Glass & Donaldson (1995). A PCR foi realizada em um volume final de 50 μ L contendo de 1,0 a 5,0 μ L de DNA (de modo que a reação contenha entre 50-500 ng/ μ L), 1,0 μ L de cada iniciador BT2a e BT2b 10 μ mol⁻¹ (MWG Biotech), 5,0 μ L de tampão de PCR 10X (Fermentas), 2,0 μ L de $MgCl_2$ 25 mM, 2,0 μ L de dNTP 10 mM, 0,2 μ L de *Taq* DNA polimerase 1.25U (Fermentas) e o volume final completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycle proS

(Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 59 °C e 90 segundos de extensão a 72 °C e uma extensão final por 7 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0), eluídos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. As bandas foram coradas com solução de agente intercalante GelredTM (Biotium, EUA) e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação de gel (Vilber Lourmat, França).

5.3.5 Amplificação fragmento gênico da RNA polimerase II

Para amplificação parcial da RNA polimerase II (RPB2) foram utilizados os iniciadores RBP2 5F (5' GATGACCGTGACCACTTCGG 3') e RPB2 7R (5' CCCATGGCTTGTGGCCCAT 3') conforme descrito por Malkus *et al.* (2006). A PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo de 1,0 a 5,0 µL de DNA (de modo que a reação contenha entre 50-500 ng/µL), 1,0 µL de cada iniciador RBP2 5F e RPB2 7R 10 µmol-1 (MWG Biotech), 5,0 µL de tampão de PCR 10X (Fermentas), 2,0 µL de MgCl₂ 25mM, 2,0 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de Taq DNA polimerase 1.25U (Fermentas) e o volume final completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycle proS (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 96 °C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 20 segundos de desnaturação a 94 °C, 55 segundos de anelamento a 55 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C e uma extensão final por 10 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0), eluídos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. As bandas foram coradas com solução de agente intercalante GelredTM (Biotium, EUA), e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação de gel (Vilber Lourmat, França).

5.4 Identificação de Leveduras

705 Todos os isolados de leveduras tiveram suas colônias descritas de acordo com as
características macromorfológicas de: cor da colônia, textura da superfície, aspecto da
borda e tempo de crescimento e micromorfológicas de: tamanho da célula, tipo de
brotamento, forma da célula. Todos os agrupamentos foram confirmados por perfis
fisiológicos e técnicas moleculares de PCR microsatélite utilizando os oligonucleotídeos
sintéticos EII, para as leveduras ascomicéticas e (GTG)₅, para as basideomicéticas; em
710 seguida um a dois isolados de cada agrupamento foram selecionados para identificação
molecular por meio de sequenciamento da região D1/D2 do gene do RNA ribossomal.
Segundo Kurtzman *et al.* (2011) linhagens de uma mesma espécie possuem de 0 a 3
nucleotídeos de diferença numa mesma região, já linhagens que apresentam mais de três
nucleotídeos de diferentes não contínuos podem representar uma espécie nova.

715

5.4.1 Perfil fisiológico

Características fisiológicas foram utilizadas para o agrupamento das leveduras
segundo Kurtzman *et al.* (2011). A assimilação de fontes oferecidas no teste fisiológico
auxilia no agrupamento de gêneros e espécies de levedura, foram realizados ensaios
720 utilizando 36 fontes de carboidratos (glicose, galactose, L-sorbose, maltose, sacarose,
celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melizitose, inulina, amido, D-xilose, L-
arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-raminose, etanol, glicerol, eritritol, ribitol,
galactitol, D-manitol, glucitol, salicina, DL-lactato, suocinato, citrato de sódio, M-
inositol, metanol, xilitol, acetona, isopropanol, gluconato, N acetil glucosamina), três
725 fontes de nitrogênio (nitrato, nitrito e lisina), condição de fermentar glicose, capacidade
de crescer em meio sem fonte de aminoácidos, capacidade de crescer em meios com
10% de NaCl e com 50% de glicose, resistência a ácido acético, condição de
crescimento em duas diferentes temperaturas, produção de ácidos e formação de
composto amilóides.

730

5.4.2 Extração do DNA total de leveduras

Para extração do DNA total, os isolados representantes do agrupamento de
levedura foram crescidos em agar YM. Após crescimento, as colônias foram
ressuspendidas em todos de 0,6 mL com 100 µL de tampão de lise (Tris-HCL –

735 trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA – ácido etilenodiamino tetraacético 0,005
M, NaCl 0,1M e SDS – sódio dodecil sulfato 1%) e incubadas em banho seco a 65 °C
por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool
isoamílico (25:24:1 – Sigma) aos tubos e os mesmo vedados com parafilme,
homogeneizados em vórtex durante 4 minutos e centrifugado a 14.000 rpm durante 15
740 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para novo tudo de 0,6 mL,
adicionados 100 µL de etanol 70% (Merck) refrigerado. O conteúdo foi homogeneizado
e centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos
de 0,6 mL incubados em temperatura ambiente para evaporação do etanol. O DNA total
foi ressuscitado em 50 µL de Tris-EDTA (Tris-HCL 0,01M e EDTA 0,001M) e
745 armazenado em freezer a -20 °C.

5.4.3 PCR microsatélite com os iniciadores EI1 e (GTG)₅

Para confirmação da identificação morfológica das leveduras, os isolados foram
submetidos à análise molecular, por meio de PCR microsatélite utilizando o iniciador
750 EI1 para as leveduras ascomicética e GTG₅ para as leveduras basiomicética (LOPES *et*
al. 1998). A reação de PCR com o iniciador EI1 foi realizada com um volume final de
25 µL contendo 1,5 µL de DNA, 1,5 µL do iniciador EI1 µmol⁻¹ (MWG Biotech), 2,0
µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 1,2 µL de MgCl₂ 25mM, 1 µL de dNTP 10 mM,
0,2 µL de TaqDNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água
755 para injeção estéril. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador
PCR (Vapo.protect - Eppendorf) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94
°C por 3 minutos, seguido por 33 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 2 minutos
da anelamento a 45 °C e 1,5 minutos de extensão a 74 °C, e uma extensão final por 5
minutos a 74 °C.

760 Já a reação de PCR microsatélite para as leveduras basideomicéticas com o
iniciador GTG₅ teve um volume final de 25 µL contendo 1,5 µL de DNA, 2 µL do
iniciador GTG₅ µmol⁻¹ (MWG Biotech), 2,5 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 1,5
µL de MgCl₂ 25mM, 1 µL de dNTP 10 mM, 0,3 µL de TaqDNA polimerase 5U
(Fermentas) e o volume final completado com água para injeção estéril. As reações de
765 PCR foi realizadas utilizando o termociclador PCR (Vapo.protect - Eppendorf) sob as
seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos

de 45 segundos de desnaturação a 93 °C, 1 minuto de anelamento a 50 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 6 minutos a 72 °C.

770 Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 0,5X, eluídos, em tampão de corrida 6X e Gel Red, durante aproximadamente 60 minutos a 120V. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, France).

5.4.4 Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4

775 Dentre as leveduras que apresentaram perfis moleculares distintos, um isolado foi selecionado para o sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA utilizando os iniciadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') segundo Lachance et al. (1999). A reação foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 2 µL de DNA, 1 µL de cada iniciador NL1 e NL4 10 µmol⁻¹ (MWG Biotech), 5 µL de tampão de PCR 10X (Fermentas), 2 µL de MgCl₂ 25mM, 2 µL de dNTP 10 mM, 0,3 µL de TaqDNA polimerase 1.25U (Fermentas) e o volume final completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR (Vapo.protect - Eppendorf). O programa consiste de uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 95 °C, 25 segundos de anelamento a 54 °C e 20 segundos de extensão a 72°C, e uma extensão final por 10 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, eluídos, em tampão de corrida 6X e Gel Red, durante aproximadamente 30 minutos a 120V. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, France).

5.5 Purificação dos amplicons

795 Os amplicons gerados pelas reações de PCR foram purificados utilizando-se a metodologia EDTA- Etanol. Ao produto de PCR (47 µL) foi adicionado 11,25 µL de EDTA e 141 µL de Etanol, que foi mantido em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida o tubo foi centrifugado a 13.500 rpm por 25 minutos e o sobrenadante retirado por inversão, foram adicionado ao tubo 120 µL de etanol 70% resfriado a 4 °C.

O tubo foi novamente centrifugado a 13.200 r.p.m. por 10 minutos e o etanol foi retirado por inversão. O tubo foi deixado à temperatura ambiente para evaporação de todo o excesso de etanol, e após, foram adicionados 10 µL de água para injeção estéril e o conteúdo do tubo foi homogenizado em vórtex por 15 segundos. Em seguida, o tubo foi incubado em banho- seco a 37 °C por 60 minutos. O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) e aqueles que apresentaram dosagens entre 80 e 150 ng/µL foram então utilizados nas reações de sequenciamento.

5.6 Reação de sequenciamento

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730. Para a reação de sequenciamento foram utilizados 5-20 ng do DNA purificado, os reagentes presentes no kit e os iniciadores. A reação de PCR foi realizada em uma placa de sequenciamento de 96 poços em um volume final de 1 µL do tampão (presente no kit de sequenciamento) , 1 µL de Big Dye e 1 µL do iniciador ($5 \mu\text{mol}^{-1}$), de 1 a 5 µL de DNA, de acordo com a dosagem do DNA purificado, e o volume final foi completado com água para injeção autoclavada. O programa consiste de uma desnaturação inicial a 36 °C por 1 minuto, 36 ciclos de uma desnaturação inicial a 96 °C por 15 minutos, seguido por 15 segundos de anelamento a 50 °C e 4 minutos de extensão a 60 °C.

5.7 Precipitação da reação de sequenciamento

Para precipitação das reações de sequenciamento, acrescentou 1 µL de EDTA a 125 mM, 1 µL de acetato de amônio e 50 µL de etanol 96% (Merck) foi adicionado em cada poço da placa de 96 poços. As soluções foram dispensada na parede lateral dos poços e a placa levemente batida sobre a bancada para que as gotas se misturassem à reação. Em seguida, a placa foi submetida à agitação em vórtex e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Após período de incubação, a placa foi centrifugada por 45 minutos a 3700 rpm e o sobrenadante foi descartado por inversão. Em seguida, foram adicionados 100 µL de etanol 70% (Merck/EUA). A placa foi novamente centrifugada por 15 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante foi então descartado. Para remoção do excesso de etanol, a placa foi invertida sobre um papel

absorvente, e submetida a um pulso em centrifuga a 900 rpm durante 1 segundo. Em seguida a placa foi mantida em repouso durante 20 minutos, protegida da luz, para evaporação do etanol. Ao DNA das amostras precipitado em cada poço da placa foi adicionado 10 µL de Formamida HI DI (Applied Biosystems, EUA). Em seguida a
835 placa foi armazenada a 4 °C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3730.

5.8 Análise computacional das sequências

As sequências de DNA foram comparadas com as sequências de espécies tipo ou
840 referência de fungos depositadas no GenBank, utilizando o programa BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool* – versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), desenvolvido pelo *National Center For Biotechnology*. Os fungos que apresentaram sequências com cobertura, valor de $E = 0$ e identidade $\geq 99\%$ em comparação às sequências de fungos depositadas no GenBank,
845 bem como proximidade quando analisadas filogeneticamente utilizando o programa MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA *et al.*, 2013) foram considerados como pertencentes à mesma espécie. Para fungos com sequências com cobertura, valor de E diferente de 0, e identidade $\leq 98\%$ foram identificados em gênero ou níveis hierárquicos mais altos de acordo com a análise filogenética realizada com o
850 programa MEGA 6. Além disso, o termo ‘cf.’ (latim for confer =comparado com) foi utilizado para indicar a espécie a qual se assemelha, mas apresenta pequenas diferenças com a espécie referência.

Para identificação molecular foram utilizadas as sequências que possuíam acima de 350 nucleotídeos e a análise filogenética foi conduzida utilizando-se o programa
855 MEGA. O alinhamento para cada gênero estudado foi preparado incluindo sequências de espécies tipo ou referência depositadas em coleções de cultura obtidas do GenBank para aumentar a acurácia das identificações. As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o algoritmo de *Neighbor-joining*. O modelo *Maximum composite likelihood* foi usado para estimar a distância evolucionária. Uma análise de *bootstrap* foi feita com
860 1.000 repetições utilizando os programas incluídos no Mega 6. Informações sobre os níveis hierárquicos utilizados na taxonomia fúngica foram obtidos no MycoBank

(<http://www.mycobank.org/>) e Index Fungorum (<http://www.Índexfungorum.org/>) e Kirk et al. (2008).

865 **5.9 Cálculo de índices de diversidade**

As contagens de isolados obtidos foram utilizadas para cálculo das densidades de cada local de coleta e espécies de líquen amostrado. Além disso, a abundância de cada táxon foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: porcentagem de abundância do táxon A = número de isolados do táxon A x 100/soma de isolados de todos os
870 táxons. Estes dados foram utilizados para determinar a prevalência de cada táxon em comparação com o total de táxons presente nas comunidades fúngicas de cada área de coleta.

Para avaliar a diversidade de espécies dos diferentes locais de coleta foram utilizados índices de riqueza, diversidade e dominância de Margalef, Fisher α e Simpson
875 respectivamente. Para avaliar a similaridade entre as comunidades fúngicas de cada local de coleta foi utilizado o coeficiente de Sorensen (QS) e Bray-Curtis (B). O coeficiente de Sorensen (QS) é representado pela fórmula: $QS = 2C/(A+B)$, 15 onde A e B representam o número de espécies nas amostras A e B , respectivamente, e C o número de espécies compartilhadas pelas duas amostras. O índice de Bray-Curtis (B) varia de 0
880 a 1, sendo que 0 significa que as comunidades não compartilham nenhuma espécie e 1 que compartilham todas as espécies na mesma frequência.

Uma curva de rarefação foi traçada utilizando o índice de Mao Tau, o qual interpola valores entre zero e o número de amostras analisadas, e calcula a riqueza esperada e o intervalo de confiança. Para a construção dessas curvas foi utilizada a 20
885 densidade de cada táxon obtido. Este cálculo permite uma comparação estatística direta entre a riqueza e os conjuntos de dados (COLWELL et al., 2004). Todos os resultados foram obtidos com 95% de confiança, e os valores de bootstrap calculados a partir de 1.000 repetições. Todos os índices foram calculados 25 utilizando o programa PAST 1.90 (HAMMER et al., 2001).

890

5.10 Preparo dos extratos

Os extratos fúngicos foram preparados a partir do crescimento micelial dos fungos filamentosos e crescimento das colônias de levedura, fermentação sólida, e a extração dos possíveis metabólitos secundário se deram através de extração etanólica.

895

5.11.1 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos obtidos foram cultivados em placas de Petri contendo meio YM incubados segundo a temperatura de isolamento, 15°C para os fungos isolados da Antártica e 25°C para os fungos isolados do Caraça e do Deserto do Atacama. Após 15 dias de crescimento todo o meio de cultura e crescimento micelial de cada fungo foi macerado e transferido para tubo cônico de 50 mL. Para a obtenção dos extratos brutos, foi adicionado 25 mL de etanol P.A (Vetec) em cada tubo contendo o meio de cultura com o crescimento fúngico, os mesmos foram triturados com auxílio de uma espátula esterilizada o que auxilia facilitando a penetração do solvente. Os tubos foram incubados por 48 horas ao abrigo da luz refrigerado a 4 °C, em seguida o sobrenadante foi filtrado com auxílio de papel de filtro estéril e transferido para novos frascos. Todos os extratos obtidos foram secos em concentrador a vácuo (Savant) com temperatura inferior a 35 °C e em seguida foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), a uma concentração de 20 mg/mL e mantidos a -20 °C até utilização no ensaios biológicos.

905

5.11.2 Leveduras

Para obtenção dos extratos foram utilizadas microplacas de 24 poços contendo em cada poço 1 mL de meio YM. Em cada poço foram inoculados as leveduras isoladas em duplicata e incubadas por 15 dias. Após o período de incubação, o meio de cultura com crescimento das leveduras foi macerado com auxílio de um pistilo esterilizado e adicionado 1,5 mL de etanol PA em cada poço. Todas as microplacas foram incubadas por 48 horas, em seguida o sobrenadante cada poço foi transferido para tubos novos de 1,5 mL. Os extratos obtidos foram secos em concentrador a vácuo (Savant) com temperatura inferior a 35 °C e em seguida solubilizados em DMSO, a uma concentração de 20 mg/mL e mantidos a -20 °C até utilização nos ensaios biológicos. Todos os extratos obtidos (fungos filamentosos e leveduras) foram depositados na Extratoteca do Laboratório de Química de Produtos Naturais do CPqRR/FIOCRUZ para futuros estudos de bioprospecção.

910

925 **5.11 Preparo dos extratos de líquens**

Os talos dos líquens foram coletados aleatoriamente nos pontos de coleta, macerados e inoculados em tubos cônicos de 50 mL com 25 mL de etanol. Os tubos foram mantidos ao abrigo da luz e, após 15 dias, o sobrenadante foi filtrado e transferido para frascos de cintilação. Todos os extratos brutos obtidos foram secos em 930 concentrador a vácuo (Savant) com temperaturas inferior a 35 °C, solubilizados em DMSO, a uma concentração de 20 mg/mL para realização de ensaios biológicos.

5.12 Determinação da atividade biológica

A determinação da atividade biológica dos extratos foi realizada por método 935 colorimétrico utilizando os seguintes alvos: micro-organismos alvos de interesse na saúde pública, na indústria de alimentos e na agricultura. Todos os ensaios serão realizados em triplicata.

5.12.1 Ensaio com micro-organismos alvos

940 A determinação da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos foi avaliada pelo método de microdiluição em placa de acordo com metodologia descrita no Documento 7.1 *Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (AFTS-EUCAST, 2002, Rodríguez-Tudela *et al.* 2003) com modificações (CARVALHO *et al.*, 2012), o qual é baseado nos 945 procedimentos de referência CLSI M27-A2, com modificações. Inicialmente a triagem foi realizada com uma linhagem de bactéria gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 12600), duas gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 11775 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145), duas leveduras (*Candida albicans* ATCC 60193 e *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*) ATCC 6258) e um fungo filamentoso (*Cladosporium sphaerosperum* CCT 1740). 950

Para a realização dos ensaios, as leveduras e bactérias foram obtidas de colônias previamente crescidas em agar Sabouraud (Difco/EUA) a 37 °C e as bactérias em agar Mueller-Hinton (Difco/EUA) a 35 °C, ambos por 24 horas. Cinco colônias distintas com diâmetro de aproximadamente 1 mm foram suspensas em solução salina estéril 955 0,85% (0,145 mol/L). A suspensão resultante foi homogeneizada em agitador tipo

vórtex durante 15 segundos. A densidade celular foi padronizada em espectrofotômetro (Bioespectro SP-22) para 70% de transmitância a 530nm, o que corresponde a 106 UFC/mL (CLSI, 2003). A padronização é feita acrescentando-se solução salina, quando necessário. Posteriormente, a suspensão obtida foi diluída 10 vezes em meio de cultura (RPMI 1640 acrescido de 2% de glicose) para utilização no ensaio.

Para a realização do ensaio antimicrobiano foi utilizado o meio de cultura sintético RPMI 1640 (INLAB Diagnóstica) tamponado com ácido morfolinepropano sulfônico (MOPS - Sigma, EUA), suplementado com 2% glicose para as leveduras e Mueller-Hinton para as bactérias, e placas de 96 poços de fundo chato (TPP, Suíça). Os extratos foram testados na concentração de 100 mg /mL, e todos os testes foram realizados em duplicata. Em cada poço utilizado para teste foram inoculados 25 µL do extrato (dissolvidos em DMSO e água deionizada autoclavada para a concentração de 1 mg/mL), 25 µL do meio de cultura e 50 µL de inóculo. Como controles positivos foram utilizados a anfotericina B (Sigma, EUA) a 2 µg/mL para as leveduras, e cloranfenicol (Sigma, EUA) a 32 µg/mL para as bactérias. Ao final, o volume de cada poço foi de 100 µL e as concentrações de DMSO 0,1% e extrato 250 mg /mL.

As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Após incubação, em cada poço foi acrescentado 10 µL de Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólico (MTT/ AMRESCO - 5 mg/mL), homogeneizado e as placas novamente incubadas a 35 °C por 4 horas. O MTT, sal tetrazólio amarelo, é convertido à azul de formazan por desidrogenases das células vivas (SOUSA, 2007), revelando a presença daquelas metabolicamente ativas. Posteriormente, foram acrescentados a cada poço 100 µL de SDS/Isopropanol 5% (50 g de Dodecil Sulfato de Sódio, 200 mL água deionizada autoclavada, 500 mL q.s.p. Isopropanol PA, pH 5,4), e então as placas foram homogeneizadas rigorosamente. O SDS/Isopropanol rompe a membrana celular dos micro-organismos alvos e disponibiliza no meio o formazan.

A leitura foi realizada por meio do método colorimétrico do MTT em um leitor de microplaca VERSAmax (Molecular Devices) pelo programa Softmax[®] Pro 5 (Molecular Devices), com a absorvância de 570 nm para bactérias e leveduras.

Para o ensaio contra *Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740, este foi crescido previamente em BDA a 25 °C por 7 a 10 dias. Para o preparo da solução uma alçada bem carregada do esporos foi suspensa em solução salina estéril 0,85%. A

suspensão resultante foi homogeneizada em agitador tipo vórtex durante 15 segundos. A densidade celular da suspensão foi padronizada em espectrofotômetro (Bioespectro SP-22) para 15% de transmitância a 620 nm, o que corresponde a 10^6 esporos/mL (NCCLS M38 - A, v. 22, n° 16). Posteriormente, a suspensão obtida foi diluída 50 vezes em meio de cultura (RPMI 1640 - INLAB Diagnóstica) para utilização no ensaio.

Os extratos foram testados na concentração de 250 mg/mL, e todos os testes foram realizados em duplicata. Em cada poço utilizado para teste foram inoculados 25 μ L do extrato (dissolvidos em DMSO e diluídos em água deionizada autoclavada para a concentração de 1 mg/mL), 25 μ L do meio de cultura e 50 μ L do inóculo. Como controle positivo foi utilizado Benomyl a 1,16 μ g/mL. Ao final, o volume de cada poço foi de 100 μ L e as concentrações de DMSO 0,1% e extrato 250 mg/mL.

Ao final do processo as placas foram colocadas em um agitador (Uniscience OS-10) por 20 minutos a 200 rpm. Posteriormente, foram incubadas a 25 °C por 48 horas. A leitura foi realizada em um leitor de microplaca VERSAmax (Molecular Devices) pelo programa Softmax[®] Pro 5 (Molecular Devices), com a absorvância de 620 nm.

A absorvância dos poços testes foi comparada com a absorvância do controle de micro-organismo, sendo a porcentagem de inibição calculada por meio da fórmula abaixo, em que DO* refere-se à densidade ótica dos poços.

$$\text{Porcentagem de Inibição: } \frac{\text{Densidade ótica poço controle} - \text{DO poço tratado}}{\text{Densidade ótica do poço controle}} \times 100$$

Arbitrariamente, foram considerados ativos os extratos com valor de inibição maior ou igual que 60%, os quais foram submetidos ao cálculo da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

1010

5.13 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Todos os extratos ativos foram submetidos à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando o programa SoftMax Pro 5 (Figura 7). Na primeira coluna do poço teste (coluna 2) foram inoculados 100 μ L do extrato (dissolvidos em DMSO e diluídos em meio de cultura para a concentração de 500 μ g/mL), 50 μ L do meio de cultura (coluna 3 a 11) e 50 μ L do inóculo (coluna 2 a 11). Posteriormente, foram realizadas diluições sucessivas a partir da coluna 2 até a coluna 11. Ao final, o

1020 volume de cada poço foi de 100 μ L, as concentrações de DMSO 0,1% e os extratos
 variaram de 250 μ g/mL a 0,488 μ g/mL. O meio de cultura, a padronização do inóculo,
 os controles positivos e negativos e a leitura dos resultados foram realizados conforme
 descrito acima na triagem da atividade antimicrobiana, para os respectivos micro-
 organismos alvos. Os extratos ativos foram testados em diferentes concentrações de 100
 a 0,2 para cálculo da Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) em comparação as
 1025 respectivas drogas controle.

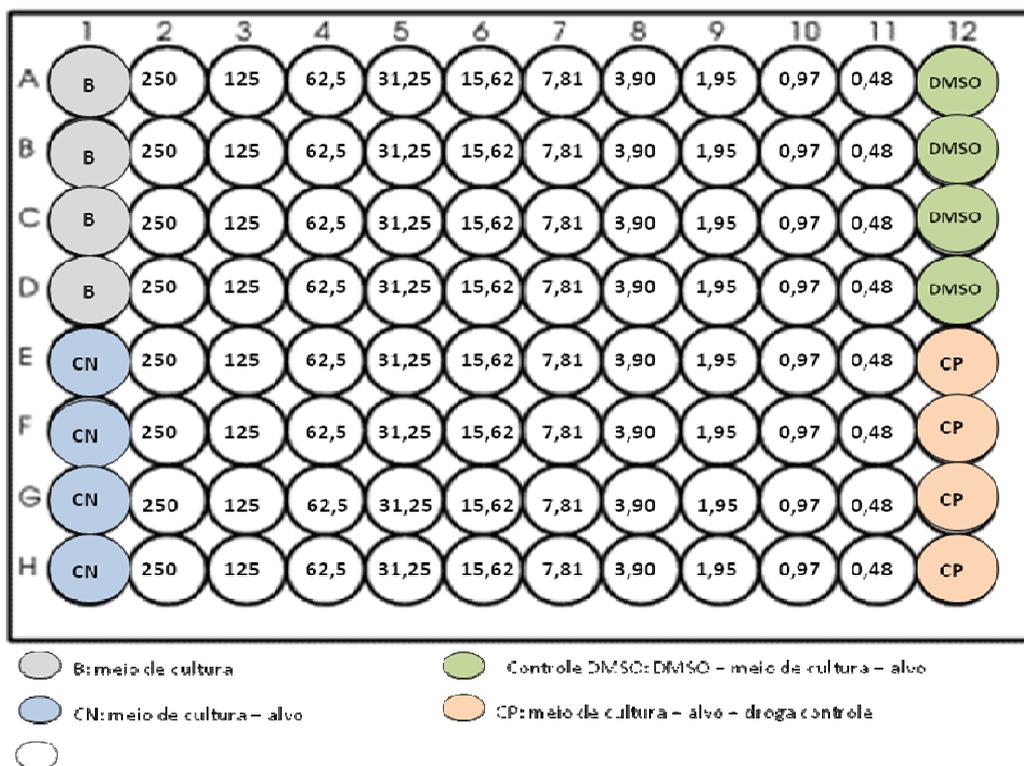


Figura 7. Esquema da placa de ensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

1030

5.14 Análise dos extratos po Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Após a realização dos ensaios onde foram avaliados as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) os extratos fúngicos que mantiveram atividade contra os micro-organismos alvos foram selecionados para partição com o solvente diclorometano P.A. (Vetec) afim de reduzir a quantidade de açúcares e impurezas presente nos extratos
 1035 bruto. Após a partição os extratos foram submetidos a Ressonância magnética Nuclear (RMN) na Unidade de Pesquisa de Produtos Naturais em Oxford (USDA-ARS), pertencente ao *National Center for Natural Products Research* do *United States*

1040 *Department of Agriculture (ARS/NPURU/USDA)*, sob orientação de Dr. Charles
Cantrell (Químico), e colaboração de técnicos especializados. As frações dos extratos
fúngicos foram analisadas por espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H
e ^{13}C foram obtidos em um aparelho Inova 600 MHz da fabricante Varian (Palo Alto,
CA). As amostras foram preparadas a aproximadamente 10 mg/mL em clorofórmio
deuterado (CDCl_3) e analisadas em tubos de RMN de 3 mm. Todos os espectros de
1045 RMN foram processados pelo programa MestReNova v8.1.2-11880 (Mestrelab
Research, S. L., 2013), um programa padrão de pulso de H^1 . Todos os espectros de ^{13}C
foram registrados em experimentos de DEPT de 90° e 135°C . (ROSA *et al.*, 2012)

5.15 Determinação de resistência a radiações ultravioleta

1050 Todos as de leveduras Antártica foram triadas quanto a capacidade de resistir a
radiações UVC e UV ambiental. Posteriormente os isolados que apresentaram o mesmo
perfil de resistência foram analisados quanto a possível produção de pigmentos
(melanina e/ou carotenoides) por meio da espectroscopia de Raman.

1055 5.15.1 Ensaio de resistência a radiação UVC

As leveduras isoladas de líquens da Antártica foram avaliadas quanto a
resistência à radiação UVC. Os ensaios foram realizados em duplicata de acordo com o
protocolo proposto por Pulschen *et al.* (2015), com algumas modificações. As leveduras
foram crescidas em caldo GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de
1060 malte 1% Na_2PO_4 0,2%) sob agitação de 150 rpm a 15°C . As células foram crescidas
até uma densidade óptica de $\text{OD}_{600} = 0,8$ a 1, e após dosagem estas células foram
lavadas com solução salina 0,9% de NaCl. O inóculo testado foi ajustado para a
concentração final de 10^6 a 10^7 células/mL, 10 mL da suspensão de células foram
transferidos para placas de Petri (70mm de diâmetro) e a suspensão irradiada utilizando
1065 lâmpadas Philips TUV-20W, baixa pressão Hg (com o pico de emissão em 253,7 nm),
sob agitação de 150 rpm. A radiação foi monitorada durante todo o experimento por
meio do dosímetro calibrado RMX-3W (Vilber Lourmat, França) e fotocélulas de UV-C
CX-254 (Vilber Lourmat, França). O fluxo de UV-C medido durante o experimento foi
de $6,0 \text{ W/m}^2$ e as amostras foram colocadas a uma distância de 25 cm da lâmpada.
1070 Nenhuma variação significativa de temperatura que poderia afetar a sobrevivência das

células foi detectada na solução, durante o experimento. Após as diferentes doses de exposição (300, 600 e 900 J/m²), 10 µL da suspensão de células foram inoculadas em meio YM e as placas foram incubadas a 15 °C.

1075 O crescimento das colônias foi comparado ao crescimento do controle negativo *Saccharomyces cerevisiae* BY4742, utilizada como um modelo de baixa resistência, e ao controle positivo *Exophiala* sp. 15LV1 (Pulschen et al., 2015) utilizada como um modelo de alta resistência. Os resultados foram expressos pela média da razão entre a contagem de unidade formadora de colônia (UFC) após a irradiação e a contagem de UFC no tempo de exposição igual a 0 (N/N₀), controle não irradiado.

1080

5.15.2 Ensaio de resistência a radiação UV ambiental

1085 Todas as leveduras isoladas da Antártica foram avaliadas quanto sua capacidade a resistir a diferentes tempos de exposição a radiação UV encontrada na Terra. Para a triagem das leveduras foi utilizado o simulador solar SOL UV-2 (Oriel, Newport-EUA), com emissão a partir de 280 nm, sendo que 85,7% da emissão é de radiação UV-A, 11% de UV-B e 3,3% de luz visível. O fluxo durante o experimento foi de 96 W/m² para 312nm e 131,5 W/m² para 365nm, medido pelo dosímetro (Vilber Lourmat, França) com fotocélulas de UV-B CX-312 nm e UV-A CX-365 (Vilber Lourmat, França). Ao contrário da lâmpada de UV-C, que possui emissão em linha, o simulador solar possui um espectro contínuo, simulando a irradiação solar que chega na superfície da Terra. Como os dosímetros são calibrados para medir em uma faixa ao redor de 312 e 365 nm, os valores medidos correspondem apenas a essas regiões, e não ao fluxo total de UV-A e B.

1090 Os controles negativos e positivos utilizados também foram os mesmos utilizados no ensaio de resistência a radiação UV-C, *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 e *Exophiala* sp. 15LV1, respectivamente. A suspensão de células expostas no ensaio equivale a 10⁶ a 10⁷ células/mL, sendo as mesmas determinadas após crescimento em GYMP, dosagem da D.O. e lavagem das células em salina 0,9%. As placas foram expostas a 15, 30, 45 e a 60 minutos em temperatura ambiente (~20 °C) sob agitação de 1100 150 rpm em solução salina 0,95 NaCl. Após a exposição 10 µL da suspensão de células foram plaqueadas em meio YM e as placas foram incubadas a 15 °C. Estes experimentos foram feitos em duplicata. A resistência foi calculada pela contagem de UFC, e os resultados expressos conforme descrito para ensaio de UVC.

1105 **5.16 Espectroscopia de Raman**

Dentre as leveduras que apresentaram, após triagem, diferentes perfis de atividade frente as radiações UVC e UV ambiental, foram selecionadas leveduras para avaliação de possíveis pigmentos (melanina e/ou carotenóides) produzidos por meio da análise de espectroscopia de Raman, esta técnica tem sido bastante utilizada para estudos astrobiológicos sobretudo por sua portabilidade e por ser uma técnica não destrutiva e que não necessita de preparo prévio da amostra. Foi utilizado para esta análise um espectrômetro micro-Raman Renishaw modelo InVia com laser para excitação em (633 e 785 nm), objetiva de 20X e detector CCD, e um equipamento Bruker RFS 100/S FT-Raman, com laser de excitação em 1064 nm e detector de Ge resfriado por LN₂. As amostras foram analisadas por meio de estregaço da colônia das leveduras selecionadas em lâminas de vidro. Para evitar danos térmicos e fotodegradação das amostras, utilizou-se baixa potência no laser incidente.

1110

1115

6 RESULTADOS

6.1 Coleta, isolamento e identificação dos fungos

Após o processo de purificação foram obtidos 919 isolados fúngicos, dos quais 812 definidos como fungos filamentosos e 107 como leveduras (Tabela 2). Na Antártica, a frequência de isolamento dos fungos, a partir de cada exemplar de líquen, variou de zero a 12 indivíduos e foram obtidos 336 fungos filamentosos e 102 leveduras. Dos talos dos líquens coletados no Campo de Altitude na RPPN Santuário do Caraça foram obtidos 302 isolados de fungos filamentosos e nenhuma levedura. Dos talos de líquens coletados no Deserto do Atacama foram obtidos 174 fungos filamentosos e cinco leveduras.

Tabela 2 Número de isolados de fungos não liquenizados por espécie de líquens e área de coleta.

Área/Espécie de líquen	Nº de espécimes de líquens amostrados	Nº de isolados	
		Fungos filamentosos	Leveduras
Ilha Elefante/Antártica			
<i>Usnea antarctica</i> Du Rietz	50	148 (18%)	48 (45%)
Ilha Rei George/Antártica			
<i>Usnea aurantiaco-atra</i> (Jacq.) Bory	50	74 (9%)	22 (20%)
Ilha Deception/Antártica			
<i>Usnea antarctica</i>	50	114 (14%)	32 (30%)
Campo de Altitude/Brasil			
<i>Usnea</i> sp.	50	302 (37%)	0
Deserto do Atacama/Chile			
Reserva do Paposó			
<i>Usnea</i> sp.	12	61 (8%)	2 (2%)
Parque Pan de Azúcar			
<i>Ramalina</i> sp.	27	113 (14%)	3 (3%)
Total	239	812	107

1135

As espécies de fungos não-liquenizados identificadas neste trabalho pertencem aos filos *Ascomycota* (78%), *Basidiomycota* (18%), *Deuteromycota* (2%) e *Zygomycota* (2%). Houve predominância do filo *Ascomycota* em todas as regiões estudadas.

Dentre os fungos obtidos dos líquens antárticos, 13 espécies foram obtidas na
1140 Ilha Elefante, 15 da Ilha Rei George e 18 da Ilha Deception. Entre os 102 isolados de
leveduras, 14 espécies foram obtidas na Ilha Elefante, cinco na Ilha Rei George e nove
na Ilha Deception (Tabela 3; Figuras 8-11). Todos os isolados fúngicos obtidos na
Antártica foram distribuídos em 21 gêneros dentro de 11 classes, filo *Ascomycota*
classes *Dothideomycetes* (5), *Sordariomycetes* (2), *Saccharomycetes* (2), *Leotiomyces*
1145 (2), *Eurotiomyces* (1) e *Ascomycetes* (1), três classes no filo *Basidiomycota* classes
Agaricostilbomycetes (1), *Microbotryomycetes* (2) e *Tremellomycetes* (4), uma classe no
filo *Deuteromycota* classe *Blastomycetes* (1) e uma classe no filo *Zygomycota* classe
Mortierellales (1).

Dos talos de *Usnea antarctica* foram identificadas espécies dos gêneros
1150 *Antarctomyces*, *Bensingtonia*, *Candida*, *Capnobotryella*, *Capnodiales*, *Catenulostroma*,
Cladosporium, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Holtermanniella*, *Leucosporidiella*, *Mrakia*,
Mortierella, *Penicillium*, *Pseudogymnoascus*, *Rhodotorula*, *Thelebolus*, *Tremella* e
Yarrowia. Já dos talos de *Usnea aurantiaco-atra* foram obtidas espécies dos gêneros
Bensingtonia, *Candida*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Leptosphaeriaceae*,
1155 *Mrakia*, *Penicillium*, *Pseudogymnoascus*, *Purpureocillium* e *Thelebolus*.

As leveduras *Bensingtonia yamatoana*, *Cryptococcus victoriae* e *Debaryomyces*
hansenii, bem como os fungos filamentosos dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium*,
Pseudogymnoascus e *Thelebolus* foram obtidos em comum das dos talos líquênicos das
três ilhas amostradas. A espécie *Antarctomyces psychrotrophicus*, descrita como
1160 endêmica da Antártica, foi abundantemente obtida das amostra de *Usnea antarctica*
coletados nas Ilhas Elefante e Deception. As espécies *Holtermanniella watticus*,
Leucosporidiella creatinivora, *Mortierella* sp. e *Yarrowia lipolytica* tiveram ocorrência
exclusiva na Ilha Efeante; *Purpureocillium lilacinum* ocorreu apenas na Ilha Rei
George; e *Catenulostroma* sp., *Capnobotryella* sp. e *Capnodiales* sp. foram obtidas
1165 apenas na dos líquens coletados na Ilha Deception.

Tabela 3. Identificação molecular dos fungos obtidos na Antártica.

Ilha/licuen	N° de		Resultado Top BLAST (n° de acc. GenBank)	Cobertura (%)	Identidade (%)	N° de bp analisados	Espécie ou grupo taxonômico proposto
	^a UFMGCB	isolados					
Ilha Elefante							
<i>Usnea antarctica</i>	8462 ^b	23	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> (AM489755)	100	100	452	<i>A. psychrotrophicus</i> (KP73162)
	8460 ^{b,c}	19	<i>Fusarium annulatum</i> (AY213654)	99	99	506	<i>Fusarium</i> sp. 1 (KP903300)
	8424 ^{b,d}	17	<i>Penicillium chrysogenum</i> (HQ026745)	100	99	434	<i>Penicillium chrysogenum</i> (KP903304)
	8488 ^b	17	<i>Thelebolus globosus</i> (DQ028268)	98	99	473	<i>Thelebolus</i> sp. 1 (KP903311)
	8521 ^b	14	<i>Mortierella gamsii</i> (HQ630340)	96	99	570	<i>Mortierella</i> sp. (KP903302)
	8526 ^b	13	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> (NR111838)	100	99	480	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 7 (KP903306)
	8474 ^{b,c}	9	<i>Penicillium rubens</i> (NR111815)	100	100	552	<i>Penicillium</i> sp. 2 (KP903305)
	8503 ^b	9	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> (NR111838)	96	99	544	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 10 (KP903308)
	Ant387 ^d	7	<i>Candida parapsilosis</i> (KF619555)	100	100	549	<i>C. parapsilosis</i> (KP994241)
	Ant388 ^d	7	<i>Cryptococcus victoriae</i> (KC433849)	100	100	516	<i>Cr. victoriae</i> (KP994236)
	8516 ^b	6	<i>Fusarium fujikuroi</i> (NR111889)	100	99	529	<i>Fusarium</i> sp. 2 (KP903301)
	8441 ^{b,d}	6	<i>Penicillium chrysogenum</i> (AY373902)	100	99	508	<i>Penicillium</i> sp. 1 (KP903303)
	8562 ^b	6	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> (NR111838)	97	99	426	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 1 (KP903307)
	Ant420 ^d	5	<i>Cryptococcus aquaticus</i> (AY052487)	100	99	562	<i>Cr. aquaticus</i> (KP994240)
	Ant424 ^d	5	<i>Debaryomyces hansenii</i> (KC111444)	100	99	541	<i>D. hansenii</i> (KR062070)
	8532 ^b	5	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> (NR111838)	98	98	446	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 5 (KP903310)
	Ant394 ^d	5	<i>Rhodotorula laryngis</i> (KC433872)	100	100	540	<i>Rh. laryngis</i> (KP994233)
	8435 ^b	4	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> (NR111838)	98	98	499	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 9 (KP903309)
	Ant395 ^d	3	<i>Bensingtonia yamatoana</i> (AF444634)	100	98	509	<i>B. yamatoana</i> (KP994242)
	Ant408 ^d	3	<i>Cryptococcus laurentii</i> (FN689393)	100	97	544	<i>Tremella</i> sp.1 (KP994221, KP994243)

Ant411 ^d	3	<i>Holtermanniella watticus</i> (KC433858)	100	99	542	<i>H. watticus</i> (KP994235)
Ant419 ^d	3	<i>Yarrowia lipolytica</i> (HF545658)	100	99	423	<i>Y. lipolytica</i> (KP994232)
Ant392 ^d	2	<i>Cryptococcus gilvescens</i> (KC433837)	100	100	487	<i>Cr. gilvescens</i> (KP994238)
Ant412 ^d	2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (AF070432)	100	99	539	<i>Rh. mucilaginosa</i> (KR062071)
Ant430 ^d	1	<i>Cryptococcus friedmannii</i> (NR111047)	100	99	568	<i>Cr. friedmannii</i> (KP994239)
Ant415 ^d	1	<i>Cryptococcus terricola</i> (KF181971)	99	99	575	<i>Cr. terricola</i> (KP994237)
Ant413 ^d	1	<i>Leucosporidiella creatinivora</i> (KC433859)	100	100	511	<i>L. creatinivora</i> (KP994234)
Ilha Rei George						
<i>Usnea aurantiaco-atra</i>						
8587 ^b	18	<i>Fusarium annulatum</i> (AY213654)	100	99	483	<i>Fusarium</i> sp. 3 (KP903315)
Ant451 ^d	12	<i>Cryptococcus victoriae</i> (AY040650)	100	100	604	<i>Cr. victoriae</i> (KP994229)
8639 ^b	7	<i>Cladosporium halotolerans</i> (NR119605)	98	99	473	<i>Cladosporium</i> sp. 1 (KP903313)
8607 ^b	7	<i>Thelebolus globosus</i> (DQ028268)	89	99	480	<i>Thelebolus</i> sp. 2 (KP903325)
8618 ^b	6	<i>Geomyces destructans</i> (EU884921)	100	98	491	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 8 (KP903316)
8574 ^{b,d}	5	<i>Penicillium chrysogenum</i> (AY373902)	100	100	500	<i>Penicillium</i> sp. 3 (KP903321)
8557 ^b	4	<i>Acicuseptoria rumicis</i> (KF251144)	70	93	528	<i>Leptosphaeriaceae</i> sp. (KP903312)
Ant432 ^d	4	<i>Debaryomyces hansenii</i> (KC111444)	100	99	552	<i>D. hansenii</i> (KR062073)
8626 ^b	4	<i>Geomyces destructans</i> (EU884921)	100	99	484	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 12 (KP903317)
8594 ^{b,c,d}	4	<i>Penicillium crustosum</i> (AY373907)	100	99	496	<i>Penicillium crustosum</i> (KP903322)
8572 ^b	4	<i>Penicillium crustosum</i> (NR077153)	100	99	512	<i>Penicillium</i> sp. 4 (KP903323)
8599 ^b	4	<i>Thelebolus globosus</i> (DQ028268)	98	100	437	<i>Thelebolus</i> sp.3 (KP903326)
Ant440 ^d	3	<i>Bensingtonia yamatoana</i> (AF444634)	100	98	596	<i>B. yamatoana</i> (KP994231)
8637 ^b	3	<i>Geomyces destructans</i> (EU884921)	96	98	509	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 3 (KP903318)

	Ant436 ^d	3	<i>Mrakia frigida</i> (AF075463)	100	100	607	<i>M. frigida</i> (KP994228)	
	8570 ^b	3	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (AY213665)	99	99	526	<i>Purpureocillium lilacinum</i> (KP903320)	
	8642 ^b	2	<i>Cladosporium phaenocomae</i> (NR119950)	100	100	423	<i>Cladosporium</i> sp. 2 (KP903314)	
	8577 ^b	2	<i>Penicillium kongii</i> (KC427191)	99	99	430	<i>Penicillium</i> sp. 5 (KP903324)	
	Ant446 ^d	1	<i>Candida davisiana</i> (AF536563)	100	100	458	<i>C. davisiana</i> (KP994230)	
	8598 ^b	1	<i>Geomyces destructans</i> (EU884921)	100	98	481	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 4 (KP903319)	
Ilha Deception								
	<i>Usnea antarctica</i>	8660 ^{b,d}	16	<i>Penicillium chrysogenum</i> (AY373902)	100	99	509	<i>Penicillium</i> sp.6 (KP903340)
		8664 ^b	13	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> (NR111197)	100	99	479	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 2 (KP903342)
		8757 ^b	12	<i>Geomyces destructans</i> (EU884921)	95	97	491	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 6 (KP903333)
		8753 ^b	11	<i>Geomyces destructans</i> (EU884921)	100	99	485	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 11 (KP903335)
		8655 ^b	9	<i>Geomyces destructans</i> (EU884921)	99	99	492	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 12 (KP903334)
	Ant460 ^d	8	<i>Debaryomyces hansenii</i> (GQ458041)	100	99	739	<i>D.hansenii</i> (KR062072)	
		8683 ^b	7	<i>Cladosporium halotolerans</i> (NR119605)	98	99	485	<i>Cladosporium</i> sp. 1 (KP903329)
		8739 ^b	6	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> (GU004189)	100	99	472	<i>A. psychrotrophicus</i> (KP903327)
	Ant481 ^d	6	<i>Cryptococcus victoriae</i> (AY040650)	100	100	610	<i>Cr. victoriae</i> (KP994220)	
		8668 ^b	6	<i>Geomyces destructans</i> (EU884921)	100	97	491	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 5 (KP903337)
		8646 ^b	6	<i>Thelebolus globosus</i> (DQ028268)	96	99	501	<i>Thelebolus</i> cf. <i>globosus</i> (KP903344)
		8730 ^b	5	<i>Geomyces pannorum</i> var. <i>asperulatus</i> (DQ117444)	98	99	486	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 3 (KP903339)
	Ant458 ^d	5	<i>Rhodotorula laryngis</i> (KC433872)	100	99	569	<i>Rh. laryngis</i> (KP994223)	
		8710 ^b	4	<i>Capnobotryella</i> sp. (AJ972847)	99	99	472	<i>Capnobotryella</i> sp. (KP903328)
		8746 ^b	4	<i>Fungal</i> sp. (AF243135)	97	91	463	<i>Catenulostroma</i> sp. (KP903330)

8685 ^b	4	<i>Fusarium fujikuroi</i> (NR111889)	100	99	532	<i>Fusarium</i> sp. 5 (KP903332)
8750 ^b	4	<i>Penidiellae llipsoidea</i> (JF499843)	100	91	467	<i>Capnodiales</i> sp. (KP903341)
Ant477 ^d	4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (JN091167)	100	100	576	<i>Rh. mucilaginosa</i> (KP994222)
8735 ^b	3	<i>Geomyces destructans</i> (EU884921)	100	98	503	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 4 (KP903336)
Ant478 ^d	3	<i>Rhodotorula arctica</i> (AB478858)	100	99	580	<i>Rh. arctica</i> (KP994224)
Ant463 ^d	2	<i>Bensingtonia yamatoana</i> (AF444634)	100	98	595	<i>B. yamatoana</i> (KP994227)
8719 ^b	2	<i>Geomyces destructans</i> (EU884921)	88	98	498	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 1 (KP903338)
Ant462 ^d	2	<i>Mrakia frigida</i> (NR111044)	100	99	546	<i>M. frigida</i> (KP994225)
Ant454 ^d	1	<i>Cryptococcus foliicola</i> (AY557600)	100	98	559	<i>Cr. foliicola</i> (KP994226)
8680 ^b	1	<i>Fusarium annulatum</i> (AY213654)	100	99	486	<i>Fusarium</i> sp. 4 (KP903331)
Ant469 ^d	1	<i>Rhodotorula creatinivora</i> (AF189925)	100	99	546	<i>Rh. creatinivora</i> (KP994219)
8695 ^b	1	<i>Thelebolus globosus</i> (DQ028268)	100	98	352	<i>Thelebolus</i> sp. 4 (KP903343)

^aUFMGCB = Código da Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. Isolado sujeito a análise filogenética baseada em sequências das regiões ^bITS, ^c β -tubulina e ^dNL para elucidação da posição taxonômica. ^ePosição taxonômica sugerida.

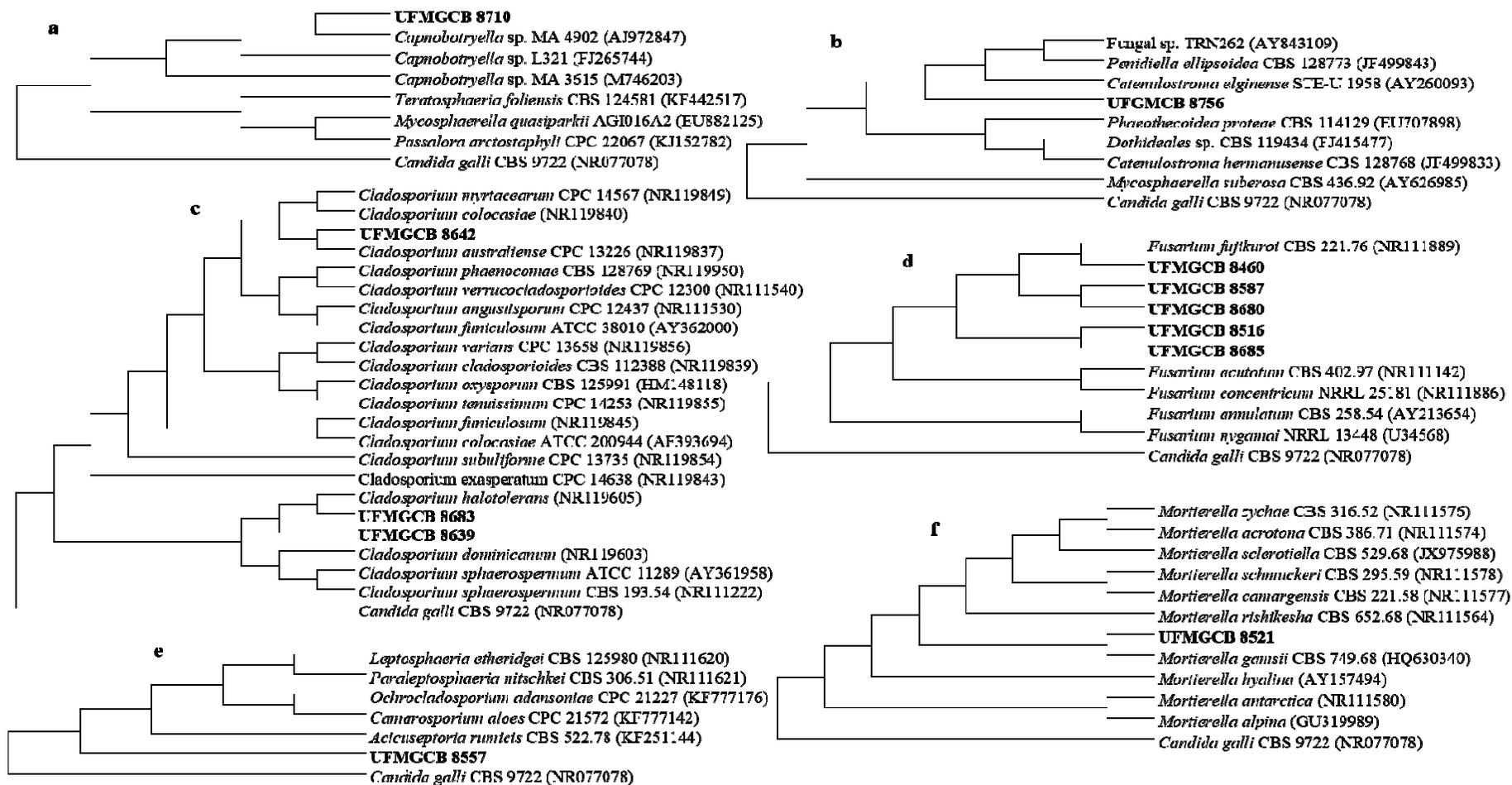
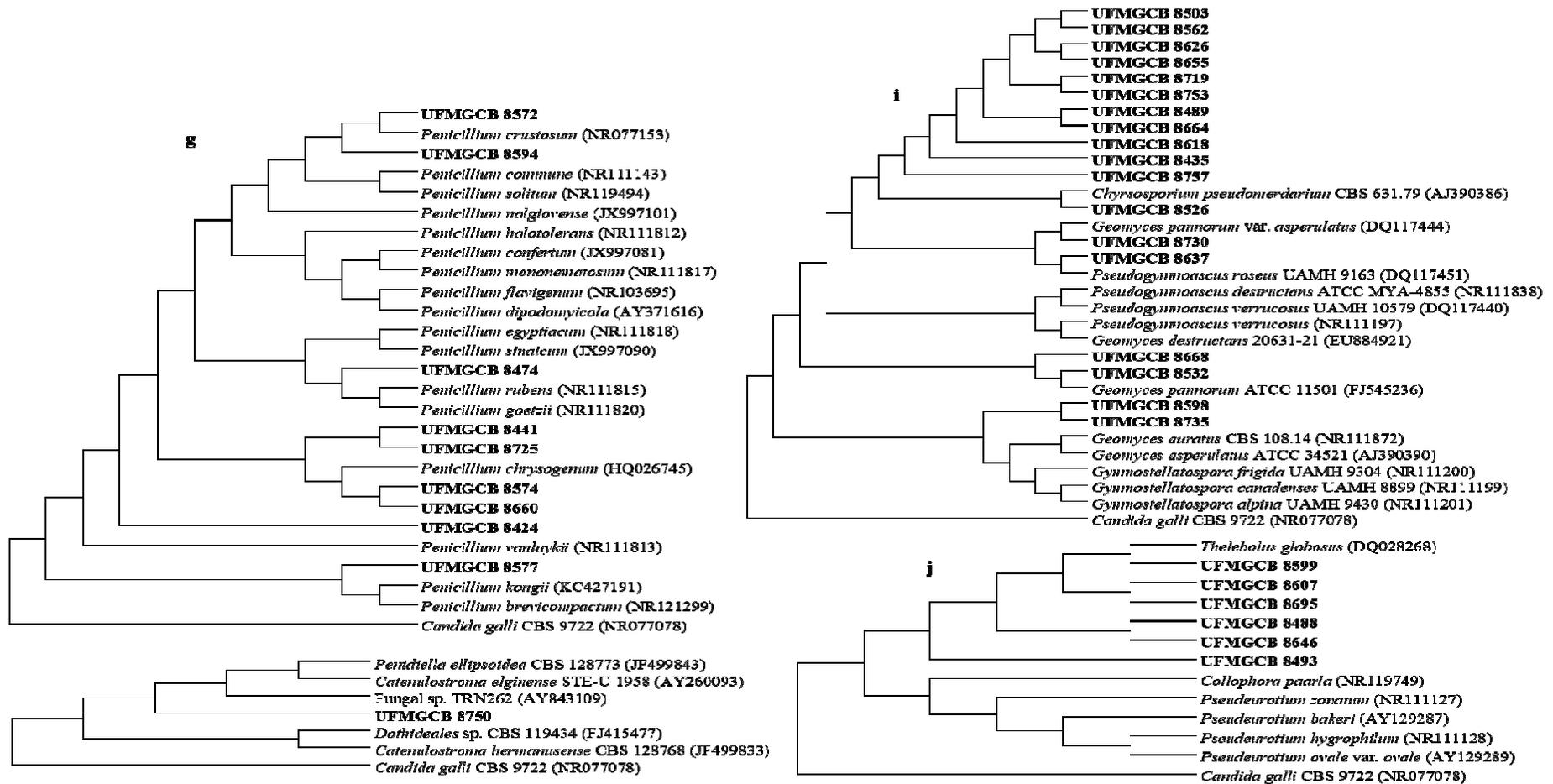
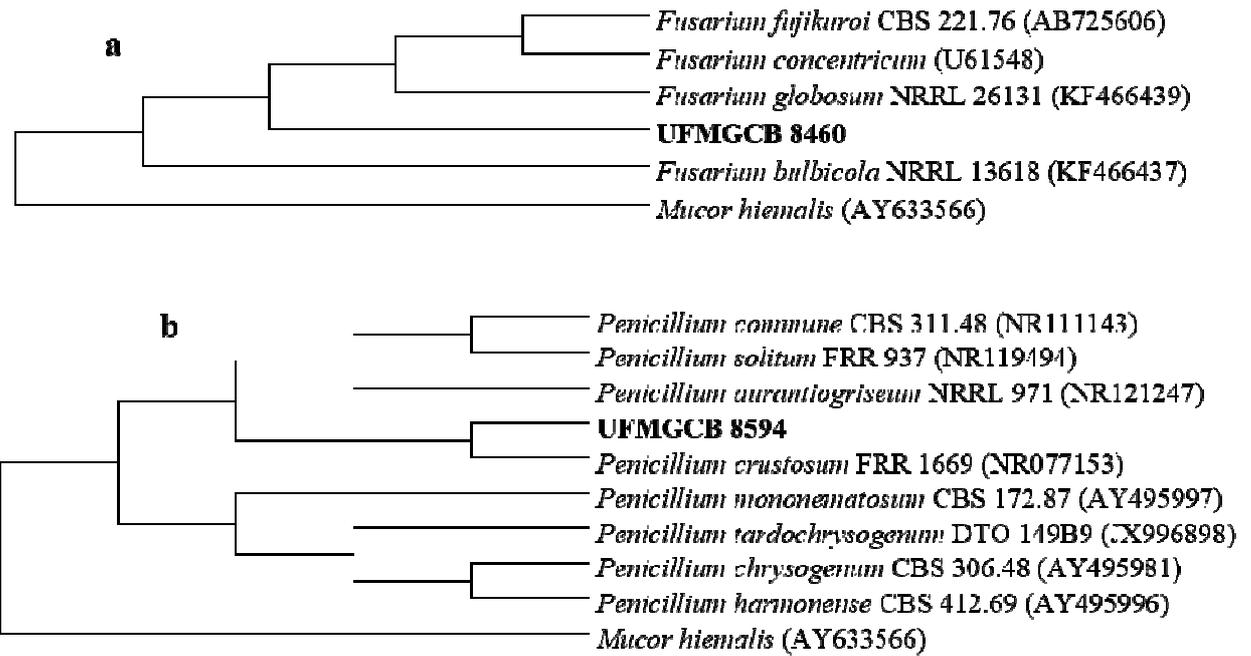


Figura 8. Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna (ITS) entre os fungos obtidos na Antártica (em negrito) em comparação com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. (a) *Capnobotryella*, (b) *Catenulostroma*, (c) *Cladosporium*, (d) *Fusarium*, (e) *Leptosphaeriaceae* e (f) *Mortierella*. A sequência de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) foi utilizada como grupo externo.



1175

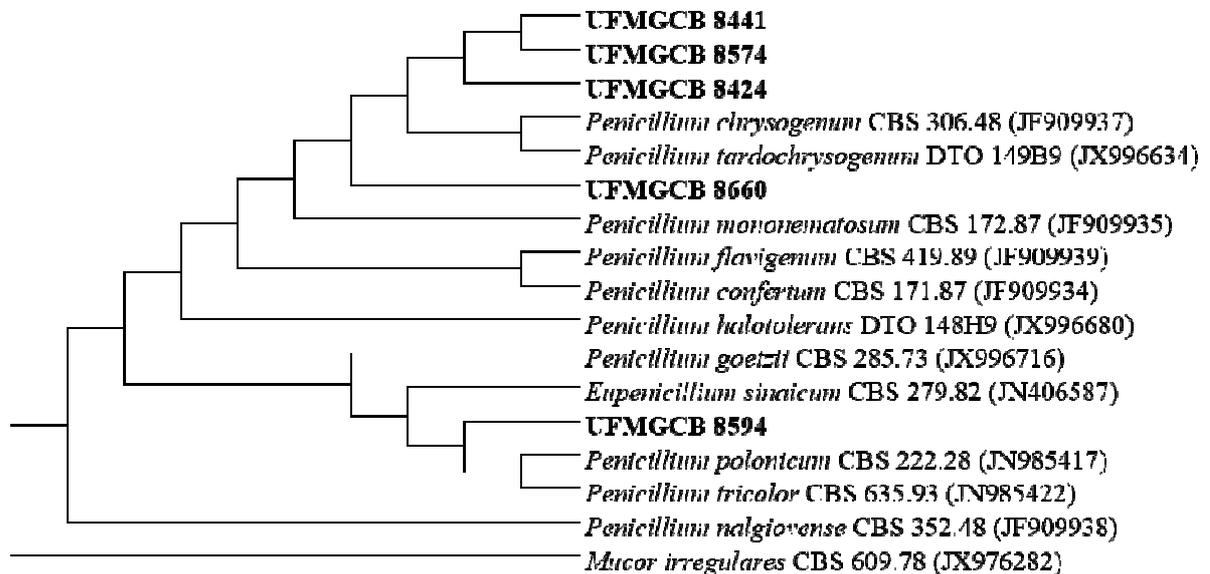
Figura 9. Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna (ITS) entre os fungos obtidos na Antártica (em negrito) em comparação com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank (g) *Penicillium*; (h) *Capnodiales*; (i) *Pseudogymnoascus* e (j) *Thelebolus*. A sequência de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) foi utilizada como grupo externo.



1180

Figura 10. Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências do gene da β -tubulina entre os fungos dos gêneros *Fusarium* (a) e *Penicillium* (b) obtidos na Antártica (em negrito) em comparação com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. A sequência de *Mucor hiemalis* (AY633566) foi utilizada como grupo externo.

1185



1190

Figura 11. Árvore filogenética preparada a partir da análise de sequências do gene RNA polimerase II entre os isolados do gênero *Penicillium* obtidos na Antártica (em negrito) em comparação com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. A sequência de *Mucor irregularis* (JX976282) foi utilizada como grupo externo.

Os fungos filamentosos associados a *Usnea* sp., coletadas no Campo de Altitude na RPPN Santuário do Caraça, foram identificados em 24 táxons distintos (Tabela 4; 1195 Figuras 12-20), distribuídos 4 classes, pertencentes ao filo *Ascomycota* com representantes das classe *Ascomycetes* (1) família *Amphisphaeriaceae* na classe *Dothideomycetes* (12) gêneros *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Lasiodiplodia*, *Microdiplodia Montagnula*, *Ochrocladosporium*, *Paraconiothyrium*, *Phaeobotryosphaeria*, *Paraphaeosphaeria* e *Phoma* e um representante da família 1200 *Didymellaceae* a classe *Eurotiomycetes* (3) *Aspergillus*, *Eurotium* e *Penicillium* na classe *Sordariomycetes* (8) *Acremonium*, *Arthrinium*, *Cosmospora*, *Flavomyces*, *Fusarium*, *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* e *Trichoderma*.

Além disso, os gêneros com maior número de isolados foram *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Curvularia* e *Bipolaris*, sucessivamente. Por outro lado, alguns táxons 1205 ocorreram como singletos (*Cosmospora* sp., *Flavomyces* sp., *Microdiplodia* sp. e *Phaeobotryosphaeria porosa*).

Tabela 4. Identificação dos fungos associados a *Usnea* sp. obtidos no Campo de Altitude da RPPN Santuário do Caraça.

Código UFMGCB ^a	Nº de isolados	Resultado Top BLAST (nº de acc. GenBank)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Nº de bp analisados	Espécie ou grupo taxonômico proposto
8902	17	<i>Bipolaris drechsleri</i> (KF500530) ^b	100	97	515	<i>Bipolaris</i> cf. <i>drechsleri</i>
8780	15	<i>Penicillium chrysogenum</i> (AY373902) ^b	100	100	554	<i>Penicillium</i> sp. 1
8789		<i>Penicillium chrysogenum</i> (AY495981) ^c	100	98	417	
8765	15	<i>Pestalotiopsis kenyaana</i> (KM199302) ^b	99	99	483	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
8847		<i>Pestalotiopsis australasiae</i> (KM199409) ^c	99	99	455	
8792	14	<i>Penicillium mariae-crucis</i> (NR111506) ^b	95	99	542	<i>Penicillium</i> cf. <i>mariae-crucis</i>
8946	13	<i>Penicillium rubens</i> (NR111815) ^b	100	100	497	<i>Penicillium</i> sp. 3
8853		<i>Penicillium tardochrysogenum</i> (JX996898) ^c	100	99	195	
8809	10	<i>Penicillium thomii</i> (NR077159) ^b	100	100	511	<i>Penicillium_fusisporum</i>
8976		<i>Penicillium fusisporum</i> (KF769400)	97	97	439	
8939	10	<i>Trichoderma hispanicum</i> (JN715595) ^b	100	99	573	<i>Trichoderma</i> sp.
9001	9	<i>Aspergillus niger</i> (AY373852) ^b	100	100	563	<i>Aspergillus niger</i>
		<i>Aspergillus laticoffeatus</i> (AY819998) ^c	100	99	518	
8844	9	<i>Bipolaris subpapendorffii</i> (KJ909777) ^b	100	96	516	<i>Curvularia</i> sp. 1
9056	9	<i>Curvularia aerea</i> (NR130689) ^b	98	93	548	<i>Curvularia</i> sp. 2
9053	9	<i>Penicillium herquei</i> (AF033405) ^b	100	99	518	<i>Penicillium herquei</i>
9004		<i>Penicillium herquei</i> (JN625970) ^c	100	96	455	
9049	8	<i>Neopestalotiopsis natalensis</i> (KM199377) ^b	100	86	523	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.
8768	8	<i>Penicillium solitum</i> (NR119494) ^b	100	100	551	<i>Penicillium solitum</i>
8791	8	<i>Pestalotiopsis biciliata</i> (KM199308) ^b	100	99	550	<i>Pestalotiopsis australasiae</i>
8900		<i>Pestalotiopsis biciliata</i> (KM199399) ^c	100	98	444	

8763	7	<i>Aspergillus glaucus</i> (AY373887) ^b	100	99	471	<i>Eurotium rubrum</i>
8805	7	<i>Penicillium citrinum</i> (NR121224) ^b	99	100	482	<i>Penicillium</i> sp. 2
8983		<i>Penicillium hetheringtonii</i> (GU944538) ^c	96	97	460	
9058	6	<i>Arthrinium kogelbergense</i> (NR120272) ^b	100	100	547	<i>Arthrinium kogelbergense</i>
8882	6	<i>Cladosporium halotolerans</i> (NR119605) ^b	94	99	408	<i>Cladosporium</i> cf. <i>halotolerans</i>
8968	6	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (NR111264) ^b	100	100	521	<i>Lasiodiplodia</i> cf. <i>parva</i>
9003	6	<i>Paraconiothyrium estuarinum</i> (AY642530) ^b	97	99	517	<i>Paraconiothyrium estuarinum</i>
8892	6	<i>Paraphaeosphaeria neglecta</i> (JX496039) ^b	77	95	385	<i>Paraphaeosphaeria</i> sp. 1
9039	6	<i>Peyronellaea prosopidis</i> (KF777180) ^b	100	97	500	<i>Didymellaceae</i> sp.
		<i>Cladosporium velox</i> (EF101456) ^c	100	95	307	
8788	6	<i>Phoma brasiliensis</i> (GU237760) ^b	100	98	424	<i>Phoma brasiliensis</i>
8884	6	<i>Pseudopestalotiopsis cocos</i> (KM199378) ^b	100	87	520	<i>Amphisphaeriaceae</i> sp.
8933	5	<i>Acremonium fusidioides</i> (NR130687) ^b	91	99	459	<i>Acremonium</i> sp. 1
8889	5	<i>Curvularia tuberculata</i> (JN192374) ^b	100	95	388	<i>Curvularia</i> sp. 3
8857	5	<i>Fusarium ramigenum</i> (NR111888) ^b	100	98	290	<i>Fusarium</i> cf. <i>ramigenum</i>
		<i>Fusarium ramigenum</i> (KF466445) ^c	96	95	271	
8866	5	<i>Penicillium camerunense</i> (KC411743) ^b	100	100	353	<i>Penicillium rubens</i>
8845	5	<i>Penicillium commune</i> (NR111143) ^b	100	100	564	<i>Penicillium</i> cf. <i>biforme</i>
8770	4	<i>Alternaria daucifolii</i> (KC584193) ^b	100	100	362	<i>Alternaria daucifolii</i>
9035 ^c	4	<i>Arthrinium pseudospegazzinii</i> (NR121560) ^b	100	97	606	<i>Arthrinium</i> sp. 1
		<i>Arthrinium marii</i> (KF144993) ^c	100	97	471	
8850	4	<i>Cladosporium pini-ponderosae</i> (NR119730) ^b	100	99	517	<i>Cladosporium asperulatum</i>
9026	4	<i>Montagnula aloes</i> (NR111757) ^b	100	91	530	<i>Montagnula</i> sp.

9043	4	<i>Penicillium fusisporum</i> (KF769424) ^b	99	99	506	<i>Penicillium</i> cf. <i>thomii</i>
8775	4	<i>Penicillium melinii</i> (NR077155) ^b	100	100	555	<i>Penicillium melinii</i>
8878	3	<i>Cladosporium phaenocomae</i> (NR119950) ^b	99	99	398	<i>Cladosporium</i> cf. <i>australiense</i>
8786	3	<i>Curvularia heteropogonicola</i> (AF163080) ^b	97	98	488	<i>Curvularia</i> cf. <i>heteropogonicola</i>
8920	3	<i>Curvularia lunata</i> (JX256429) ^b	92	99	388	<i>Bipolaris</i> sp.
8974	3	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (KF766193) ^b	100	100	433	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
8955	3	<i>Paraphaeosphaeria parmeliae</i> (KP170654) ^b	98	100	550	<i>Paraphaeosphaeria</i> sp. 2
8951	2	<i>Cochliobolus melinidis</i> (JN601035) ^b	100	98	455	<i>Bipolaris</i> cf. <i>drechsleri</i>
8918	2	<i>Curvularia affinis</i> (KJ909780) ^b	100	98	464	<i>Curvularia affinis</i>
8985	1	<i>Arthrimum malaysianum</i> (NR120273) ^b	97	97	473	<i>Arthrimum</i> cf. <i>malaysianum</i>
8827	1	<i>Arthrimum xenocordella</i> (NR120274) ^b	75	91	441	<i>Arthrimum</i> sp. 2
8926	1	<i>Cladosporium ossifragi</i> (EF679381) ^b	100	99	440	<i>Cladosporium ossifragi</i>
9054	1	<i>Cosmospora cymosa</i> (NR111605) ^b	99	89	553	<i>Cosmospora</i> sp.
9009	1	<i>Flavomyces fulophazii</i> (KP184001) ^b	95	93	522	<i>Flavomyces</i> sp.
8964	1	<i>Geosmithia eupagioceri</i> (AM947666) ^b	100	88	553	<i>Acremonium</i> sp. 2
8945	1	<i>Microdiplodia hawaiiensis</i> (DQ885897) ^b	100	92	450	<i>Microdiplodia</i> sp.
8759	1	<i>Neopestalotiopsis cubana</i> (KM199347) ^b	100	100	389	<i>Neopestalotiopsis</i> cf. <i>formicarum</i>
9059	1	<i>Ochrocladosporium adansoniae</i> (KF777176) ^b	99	91	518	<i>Ochrocladosporium</i> sp.
8989	1	<i>Paraphaeosphaeria viridescens</i> (JX496085) ^b	80	89	534	<i>Paraphaeosphaeria</i> sp. 3
8813	1	<i>Phaeobotryosphaeria porosa</i> (KF766210) ^b	100	99	478	<i>Phaeobotryosphaeria porosa</i>

^aUFMGCB = Código da Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. Isolado sujeito a análise filogenética baseada em sequências das regiões ^bITS e ^c β -tubulina para elucidação da posição taxonômica. ^dPosição taxonômica sugerida.

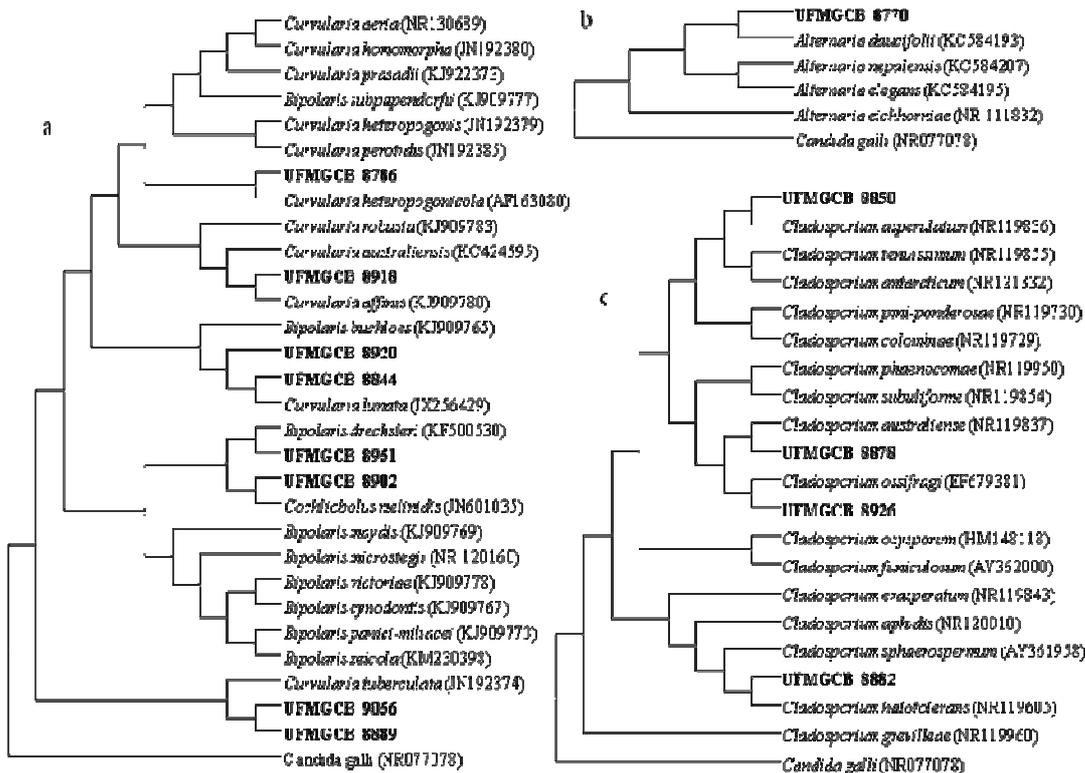
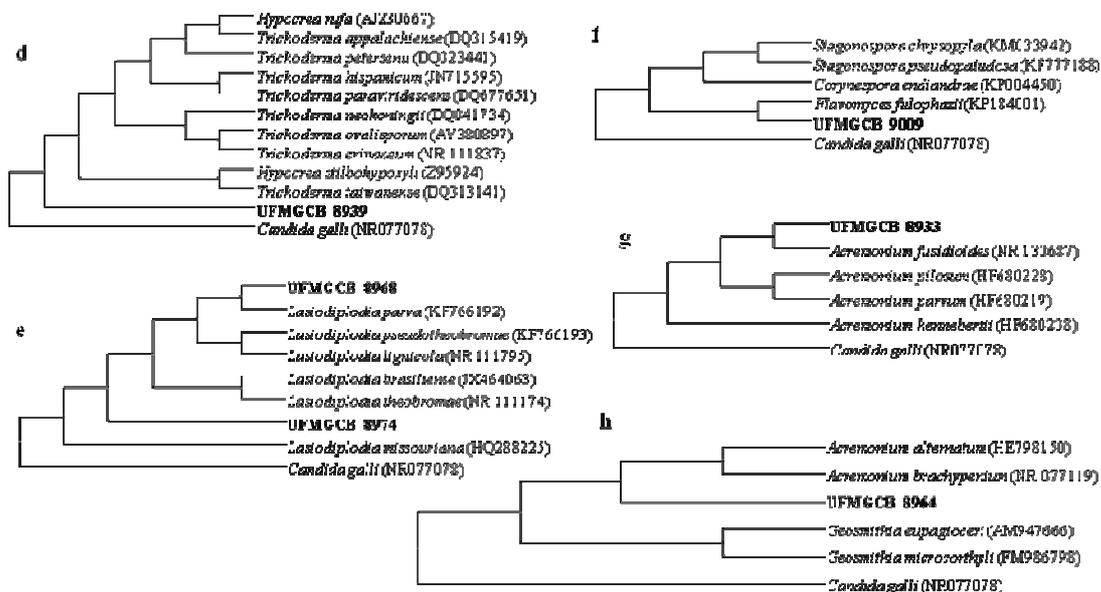


Figura 12. Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS entre os fungos obtidos no Campos de Altitude (em negrito) em comparação com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank (a) *Curvularia/ Cochliobolus/Bipolaris*, (b) *Alternaria* e (c) *Cladosporium*. A sequência de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) foi utilizada como grupo externo.

1215



1220

Figura 13. Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS entre os fungos obtidos no Campos de Altitude (em negrito) em comparação com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank (d) *Trichoderma*; (e) *Lasiodiplodia*; (f) *Flavomyces*; (g) *Acremonium* e (h) *Geosmithia*. A sequência de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) foi utilizada como grupo externo.

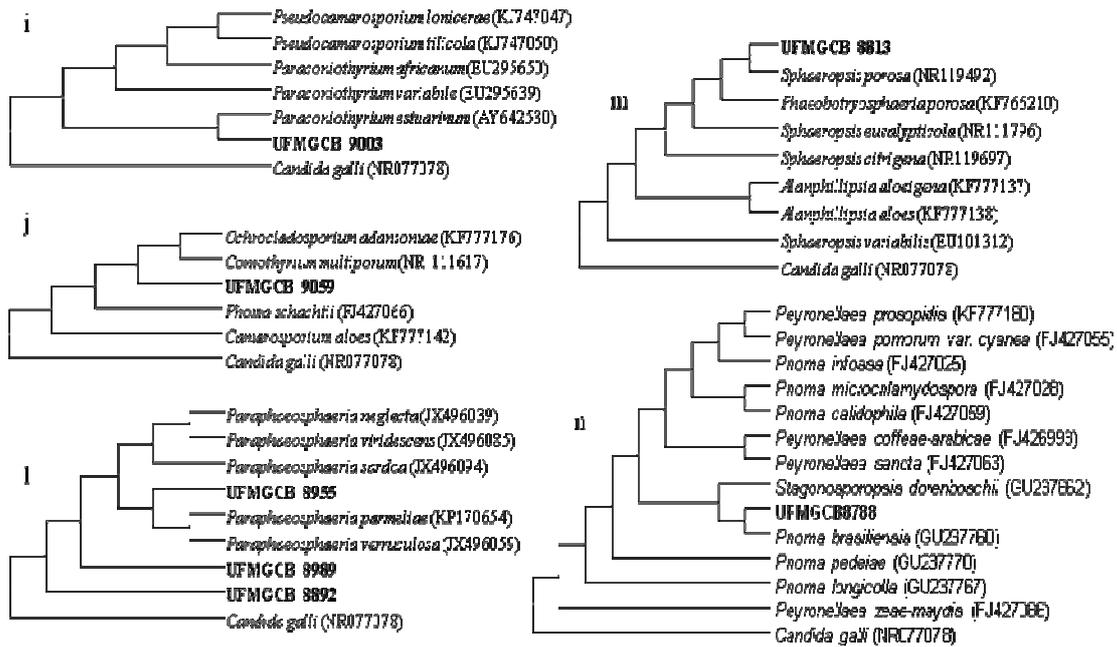
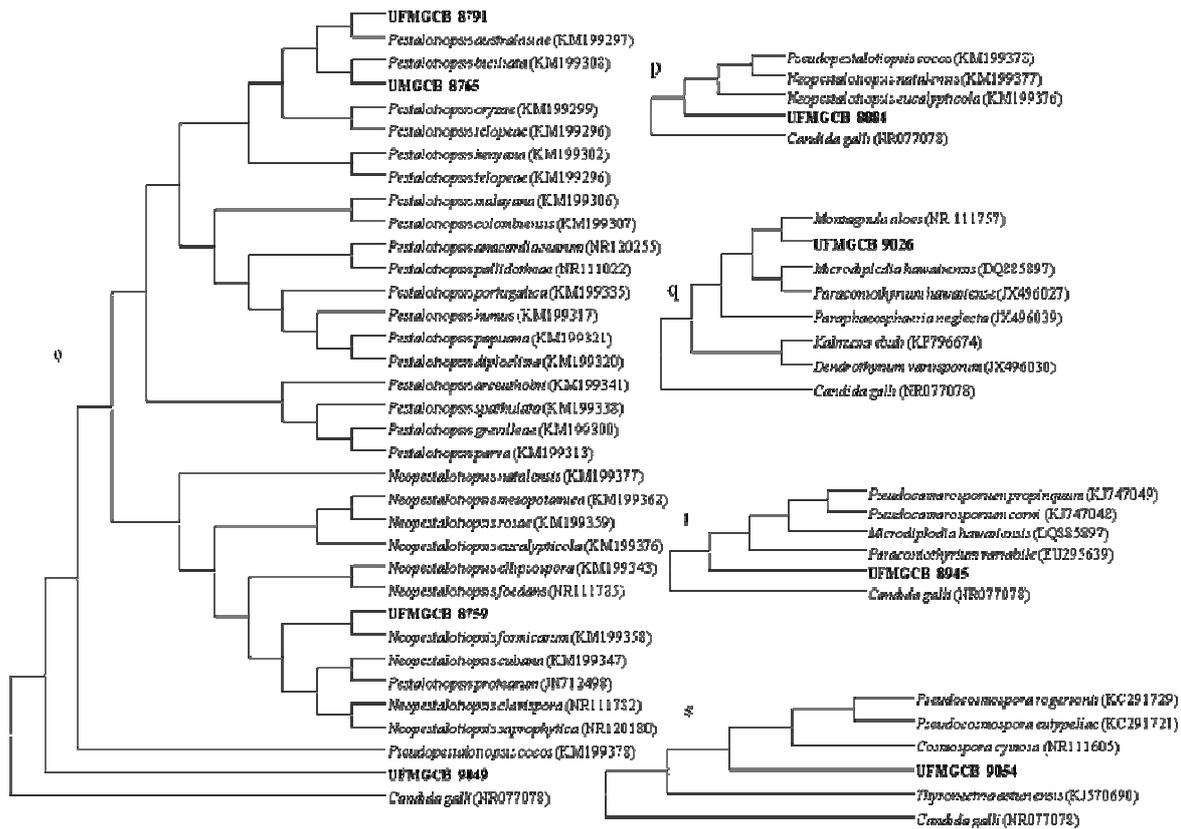


Figura 14. Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de seqüências da região transcrita interna ITS entre os fungos obtidos no Campos de Altitude (em negrito) em comparação com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank (i) *Paraconiothyrium*; (j) *Ochrocladosporium*; (l) *Paraphaeosphaeria*; (m) *Phaeobotryosphaeria* e (n) *Phoma*. A seqüência de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) foi utilizada como grupo externo.



1235

Figura 15. Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS entre os fungos obtidos no Campos de Altitude (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank (o) *Pestalotiopsis/ Neopestalotiopsis*; (p) *Pseudopestalotiopsis*; (q) *Montagnula*; (r) *Microdiplodia* e (s) *Cosmospora*. A sequência de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) foi utilizada como grupo externo.

1240

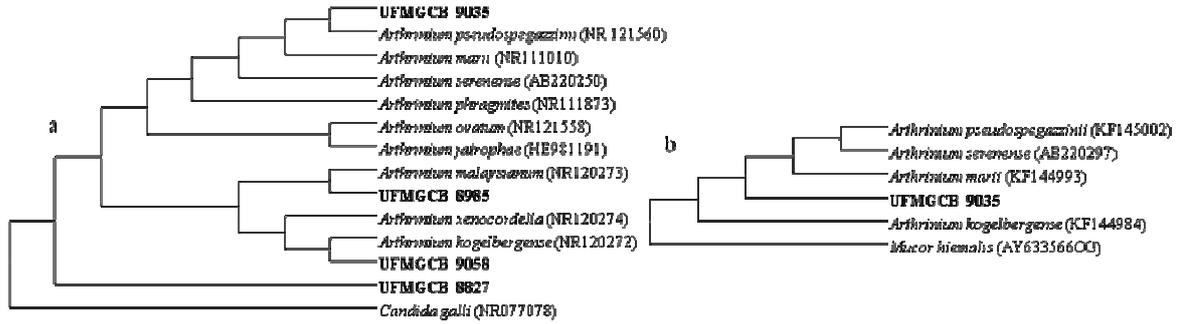


Figura 16. Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS (a) e análise do gene da β -tubulina (b) entre os isolados do gênero *Arthrimum* obtidos no Campos de Altitude (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. A sequência de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) foi utilizada como grupo externo.

1250

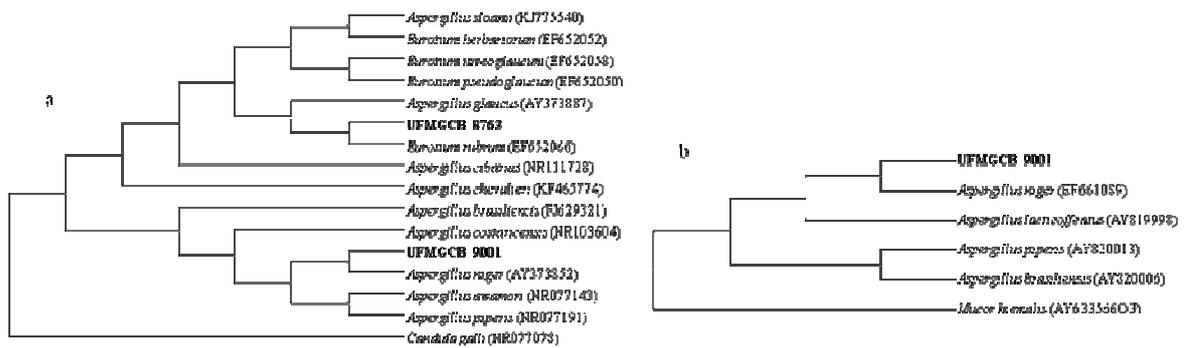


Figura 17. Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna (ITS) (a) e análise do gene da β -tubulina (b) entre os isolados do gênero *Aspergillus* obtidos no Campos de Altitude (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. As sequências de *Candida glabrata* CBS 9722 (NR077078) e *Mucor hiemalis* (AY633566) foram utilizadas como grupos externos.

1260

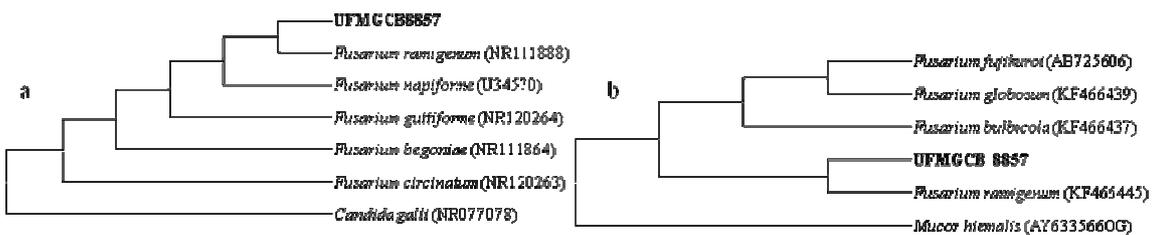
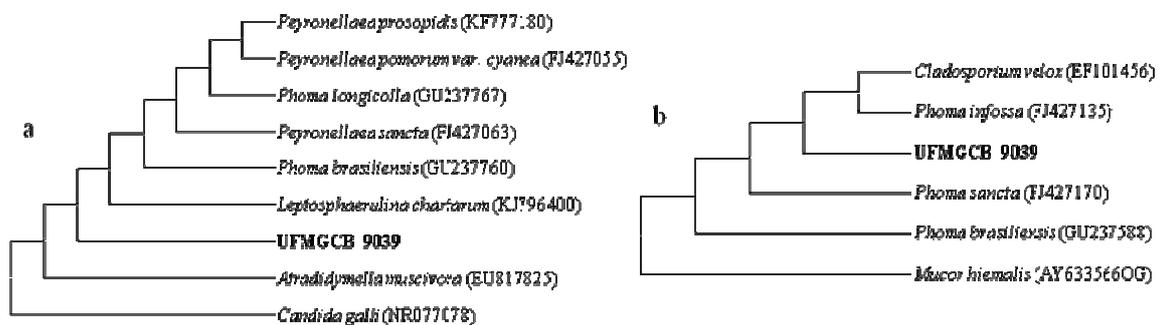


Figura 18. Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS (a) e análise do gene da β -tubulina (b) entre os isolados do gênero *Fusarium* obtidos no Campos de Altitude (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. As sequências de *Candida glabrata* CBS 9722 (NR077078) e *Mucor hiemalis* (AY633566) foram utilizadas como grupos externos.



1280

Figura 20. Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS (a) e análise do gene da β -tubulina (b) entre os isolados do gênero *Peyronellaea* obtidos no Campos de Altitude (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. As sequências de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) e *Mucor hiemalis* (AY633566) foram utilizadas como grupos externos.

1285

Dos líquens *Usnea* sp. e *Ramalina* sp., coletados no Deserto do Atacama, foram identificados fungos dos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Coprinopsis*, *Neopestalotiopsis*, *Penicillium*, *Preussia*, *Rhodosporidium* e *Ulocladium* e dos gêneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Coniochaeta*, *Coprinopsis*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Gelasinospora*, *Lecythophora*, *Meyerozyma*, *Penicillium*, *Preussia*, *Psathyrella*, *Torulaspora* e *Ulocladium* (Tabela 5; Figuras 21-25), pertencentes aos filos *Ascomycota* com representantes das classes *Dothideomycetes* (2), *Sordariomycetes* (6), *Saccharomycetes* (2), *Leotiomycetes* (1) e *Eurotiomycetes* (1) e o filo *Basidiomycota* com as classes *Agaricomycetes* (2), *Exobasidiomycetes* (1) e *Tremellomycetes* (1). Os 63 fungos associados a *Usnea* sp. foram identificados em 14 espécies fungos filamentosos e uma espécie de levedura; já os 116 fungos de *Ramalina* sp. foram identificados 27 espécies fungos filamentosos e três espécies de leveduras. Do talo de *Usnea* sp., os gêneros que tiveram maior número de isolados foram *Preussia* e *Alternaria*; já a partir de *Ramalina* sp. os gêneros *Penicillium*, *Alternaria* e *Preussia* foram os mais abundantes.

1305

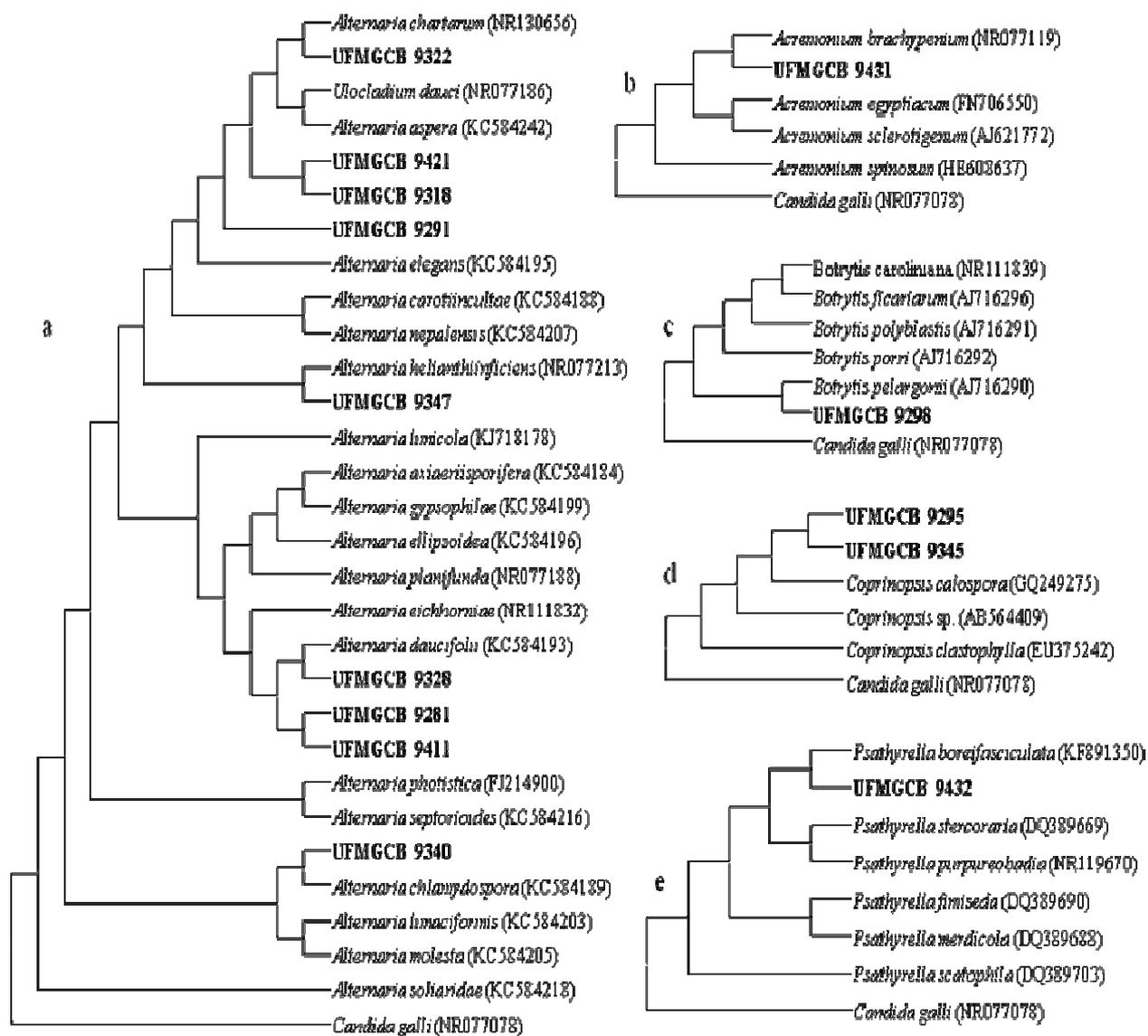
Tabela 5. Identificação dos fungos obtidos de líquens coletados no Deserto do Atacama, Chile.

Área / Espécie de líquen	UFMGCB ^a	Nº de isolados	Resultado top BLAST (nº de acc. GenBank)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Nº de bp analisados	Espécie ou grupo taxonômico proposto
Reserva do Paposo <i>Usnea</i> sp.	9314	21	<i>Preussia flanaganii</i> (NR077168) ^b	100	90	734	<i>Preussia</i> sp. 1
	9318	8	<i>Alternaria chartarum</i> (NR130656) ^b	99	100	532	<i>Alternaria</i> sp. 1
	9281	7	<i>Alternaria eichhorniae</i> (NR111832) ^b	100	99	530	<i>Alternaria</i> sp. 2
	9279	5	<i>Colletotrichum musae</i> (NR120132) ^b	100	100	547	<i>Colletotrichum musae</i>
	9287	4	<i>Cladosporium ramotenellum</i> (NR11965) ^b	99	99	479	<i>Cladosporium</i> sp. 2
			<i>Cladosporium subinflatum</i> (EF101448) ^c	99	91	388	
	9291	4	<i>Ulocladium dauci</i> (NR077186) ^b	97	99	535	<i>Ulocladium</i> sp.
	9275	3	<i>Aspergillus fumigatus</i> (NR121481) ^b	100	99	464	<i>Aspergillus</i> sp. 1
	9320	3	<i>Cladosporium phaenocomae</i> (NR119950) ^b	100	99	466	<i>Cladosporium</i> sp. 1
	9298	2	<i>Botrytis caroliniana</i> (NR111839) ^b	99	99	500	<i>Botrytis pelargonii</i>
	AT02	2	<i>Rhodosporidium sphaerocarpum</i> (AF070425) ^d	100	99	359	<i>Rhodosporidium</i>
	AT01		<i>Rhodosporidium sphaerocarpum</i> (NR073269) ^b	83	99	721	<i>sphaerocarpum</i>
	9277	1	<i>Cladosporium antarcticum</i> (NR121332) ^b	100	100	481	<i>Cladosporium antarcticum</i>
	9295	1	<i>Coprinopsis calospora</i> ^b (GQ249275) ^b	97	91	648	<i>Coprinopsis</i> sp. 1
	9261	1	<i>Neopestalotiopsis surinamensis</i> (KM199351) ^b	100	100	514	<i>Neopestalotiopsis australis</i>
	9310	1	<i>Penicillium nalgiovense</i> (NR103694) ^b	100	99	652	<i>Penicillium</i> cf.
			<i>Penicillium nalgiovense</i> (AY495999) ^c	100	99	442	<i>nalgiovense</i>
<i>Penicillium sizovae</i> (GU944588) ^b			98	100	500	<i>Penicillium gorlenkoanum</i>	
Parque Pan de Azucar <i>Ramalina</i> sp.	9409	28	<i>Preussia flanaganii</i> (NR077168) ^b	100	91	520	<i>Preussia</i> sp. 2
	9347	16	<i>Alternaria nepalensis</i> (KC584207) ^b	95	98	567	<i>Alternaria</i> cf. <i>helianthiinficiens</i>
	9323	10	<i>Penicillium janczewskii</i> (NR111132) ^b	100	99	495	<i>Penicillium jensenii</i>
<i>Penicillium janczewskii</i> (KJ834460) ^c			100	97	361		

9350	8	<i>Penicillium rubens</i> (NR111815) ^b	95	100	532	<i>Penicillium</i>
		<i>Penicillium tardochrysogenum</i> (JX996898) ^c	100	99	238	<i>tardochrysogenum</i>
9322	5	<i>Alternaria chartarum</i> (NR130656) ^b	98	100	538	<i>Alternaria chartarum</i>
9410	5	<i>Fusarium keratoplasticum</i> (NR130690) ^b	97	98	537	<i>Fusarium</i> sp. 2
		<i>Cylindrocladiella</i> sp.(JN098819) ^c	84	87	383	
9364	5	<i>Penicillium thomii</i> (NR077159) ^b	100	99	495	<i>Penicillium rudallense</i>
9329		<i>Penicillium rudallense</i> (KM088741) ^c	94	99	442	
9431	4	<i>Acremonium brachyphenium</i> (NR077119) ^b	96	95	377	<i>Acremonium</i> cf. <i>brachyphenium</i>
9414	4	<i>Aspergillus fumigatus</i> (NR121481) ^b	100	99	499	<i>Aspergillus fumigatus</i>
		<i>Aspergillus fumigatus</i> (HQ588168) ^c	100	99	467	
9345	4	<i>Coprinopsis calospora</i> (GQ249275) ^b	99	91	506	<i>Coprinopsis</i> sp. 2
9416	3	<i>Fusarium falciforme</i> (EU329690) ^b	95	100	500	<i>Fusarium</i> sp. 1
9430	3	<i>Penicillium crustosum</i> (NR077153) ^b	100	98	500	<i>Penicillium crustosum</i>
		<i>Penicillium cavernicola</i> (KJ834439) ^c	100	96	396	
9403	2	<i>Penicillium chrysogenum</i> (AY373902) ^b	100	99	498	<i>Penicillium chrysogenum</i>
		<i>Penicillium chrysogenum</i> (AY495981) ^c	100	99	440	
9332	2	<i>Psathyrella boreifasciculata</i> (KF891350) ^b	100	89	643	<i>Psathyrella</i> sp.
9340	1	<i>Alternaria chlamydospora</i> (KC584189) ^b	98	99	437	<i>Alternaria chlamydospora</i>
9328	1	<i>Alternaria daucifolii</i> (KC584193) ^b	98	100	466	<i>Alternaria daucifolii</i>
9411	1	<i>Alternaria eichhorniae</i> (NR111832) ^b	100	99	477	<i>Alternaria</i> sp. 3
9338	1	<i>Aspergillus pseudodeflectus</i> (EF591743) ^b	93	98	541	<i>Aspergillus</i> sp. 2
		<i>Fennellia monodii</i> (FJ531171) ^c	73	90	418	
9325	1	<i>Cladosporium phaenocomae</i> (NR119950) ^b	100	99	482	<i>Cladosporium</i> sp. 3
9413	1	<i>Coniochaeta africana</i> (GQ154539) ^b	99	95	490	<i>Coniochaeta</i> sp. 1
9402	1	<i>Coniochaeta polymorpha</i> (NR121473) ^b	100	91	526	<i>Coniochaeta</i> sp. 2
AT04	1	<i>Cryptococcus podzolicus</i> (AF075481) ^d	86	99	640	<i>Cryptococcus podzolicus</i>
		<i>Cryptococcus podzolicus</i> (NR073213) ^b	69	99	713	
9434	1	<i>Gelasinospora tetrasperma</i> (NR077163) ^b	100	99	544	<i>Gelasinospora</i> <i>tetrasperma</i>

9433	1	<i>Lecythophora decumbens</i> (HE610337) ^b	97	94	443	<i>Coniochaeta</i> sp. 3
9389	1	<i>Penicillium fusisporum</i> (KF769424) ^b	100	98	500	<i>Penicillium bussumense</i>
		<i>Penicillium bussumense</i> (KM088685) ^c	98	98	415	
9355	1	<i>Penicillium paczoskii</i> (KC411706) ^b	99	100	491	<i>Penicillium paczoskii</i>
9326	1	<i>Penicillium sizovae</i> (NR111487) ^b	100	100	498	<i>Penicillium sizovae</i>
AT03	1	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786) ^d	77	100	734	<i>Meyerozyma carribica</i>
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (NR111247) ^b	79	99	709	
AT05	1	<i>Torulaspota delbrueckii</i> (HE616749) ^d	100	100	675	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
9421	1	<i>Ulocladium dauci</i> (NR077186) ^b	99	99	435	<i>Ulocladium dauci</i>

^aUFMGCB = Código da Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. Sequências prioritária obtida pelo BLATS pás as regiões ^bITS, ^c β -tubulina e ^dNL para elucidação da posição taxonômica.



1310 **Figura 21.** Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região
transcrita interna ITS entre os fungos obtidos no Atacama (em negrito) em comparação com
sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank (a) *Alternaria*; (b)
1315 *Acremonium*; (c) *Botrytis*; (d) *Coprinopsis* e (e) *Psathyrella*. A sequência de *Candida galli* CBS
9722 (NR077078) foi utilizada como grupo externo.

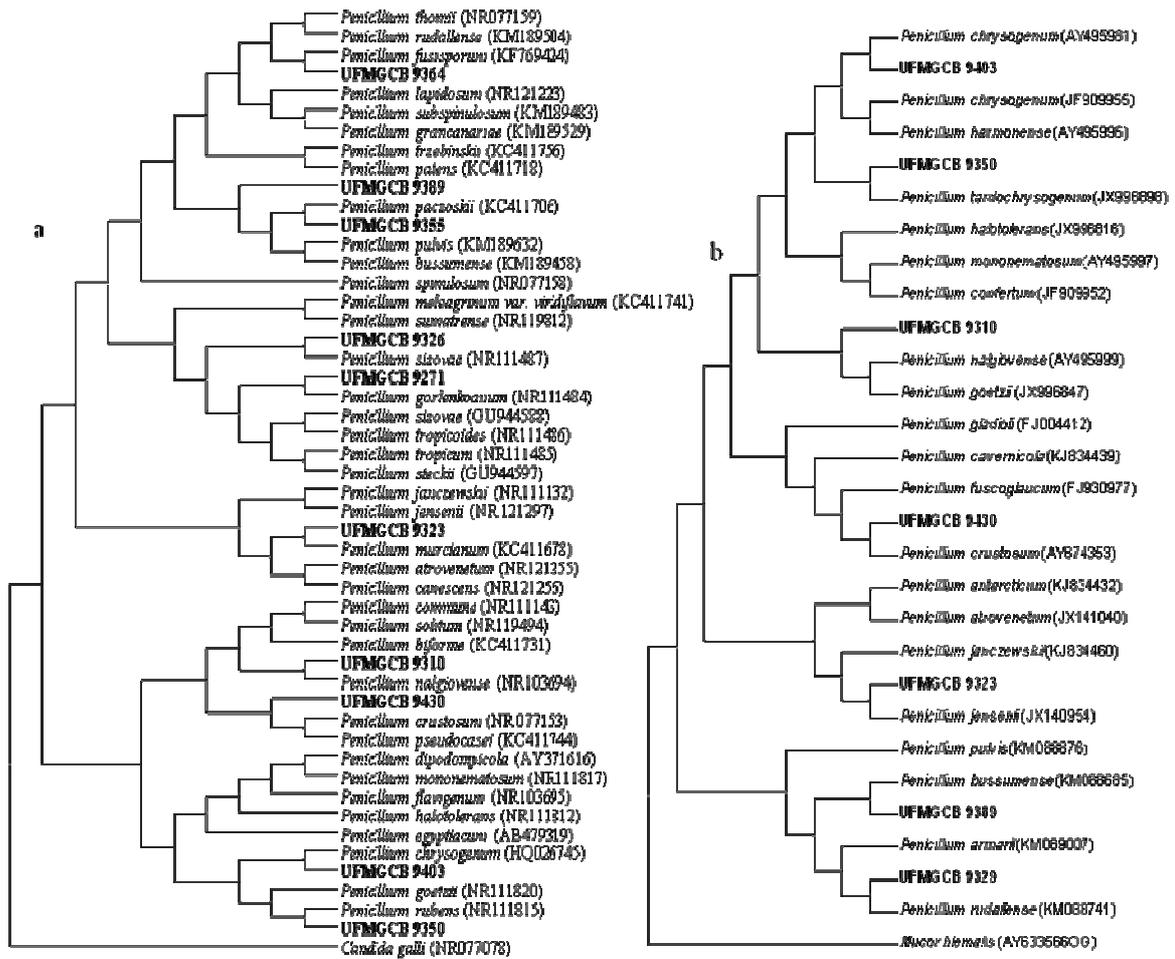
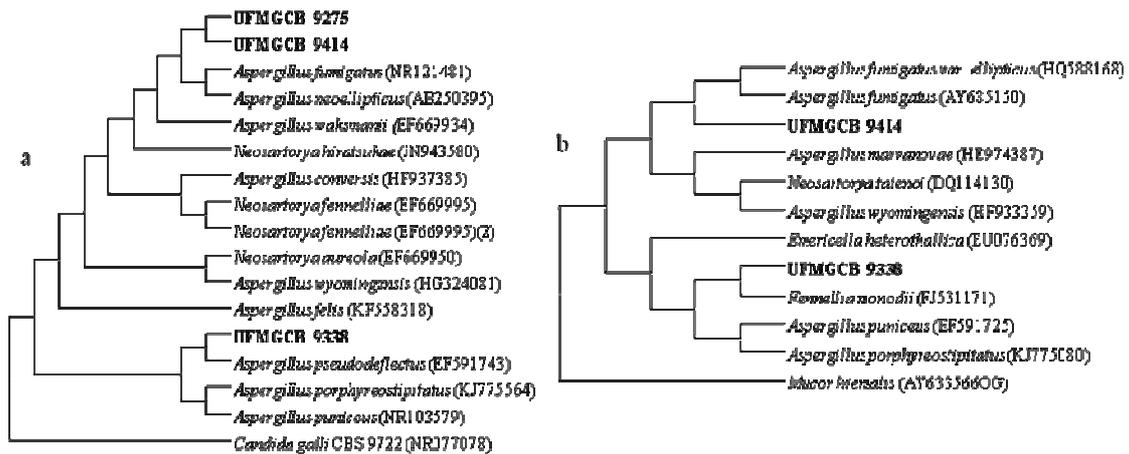


Figura 22. Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS (a) e análise do gene da β -tubulina (b) entre os isolados do gênero *Penicillium* obtidos no Atacama (em negrito) em comparação com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. As sequências de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) e *Mucor hiemalis* (AY633566) foram utilizadas como grupos externos.

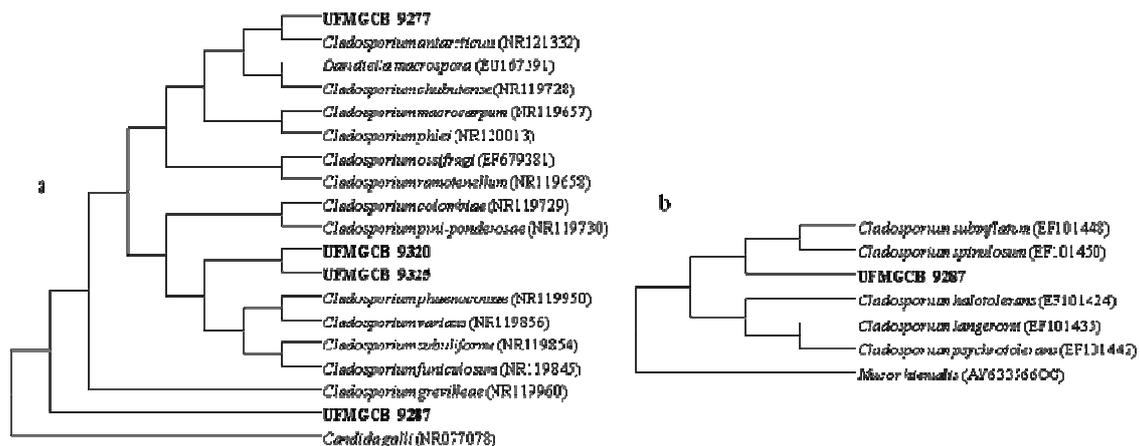
1320



1325

Figura 23. Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS (a) e análise do gene da β -tubulina (b) entre os isolados do gênero *Aspergillus* obtidos no Atacama (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. As sequências de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) e *Mucor hiemalis* (AY633566) foram utilizadas como grupos externos

1330



1335

Figura 24. Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS (a) e análise do gene da β -tubulina (b) entre os isolados do gênero *Cladosporium* obtidos no Atacama (em negrito) em comparação com sequencias de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. As sequências de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) e *Mucor hiemalis* (AY633566) foram utilizadas como grupos externos.

1340

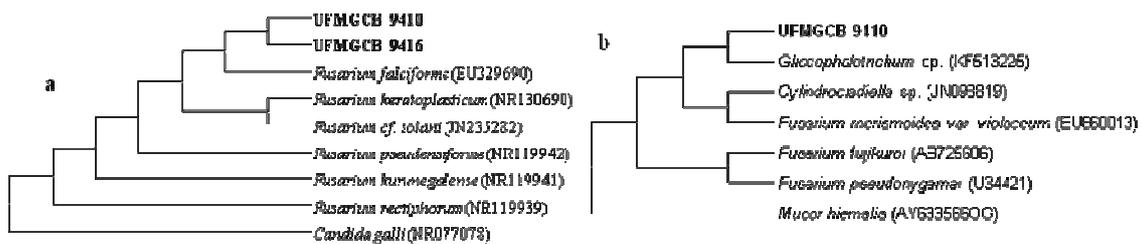


Figura 25. Árvores filogenéticas preparadas a partir da análise de sequências da região transcrita interna ITS (a) e análise do gene da β -tubulina (b) entre os isolados do gênero *Fusarium* obtidos no Atacama (em negrito) em comparação com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank. As sequências de *Candida galli* CBS 9722 (NR077078) e *Mucor hiemalis* (AY633566) foram utilizadas como grupos externos.

No geral, dos 812 fungos filamentosos obtidos nas três regiões de estudo, 298 (37%) foram identificados em nível de espécie e 514 (63%) em nível de gênero. Dentre as 107 leveduras obtidas de amostras da Antártica e do Deserto do Atacama, 106 (99%) foram identificadas em nível de espécie. Uma levedura (representada pelos isolados *Tremella* UFMGCB ANT 384, ANT 407 e ANT 408) foi identificada como espécie nova e será descrita neste trabalho. Além disso, outros 85 isolados podem representar possíveis espécies novas, das quais 41 obtidas da Antártica, 25 do Campo de Altitude e 19 do Deserto do Atacama.

6.2 Diversidade dos fungos associados aos talos de líquens

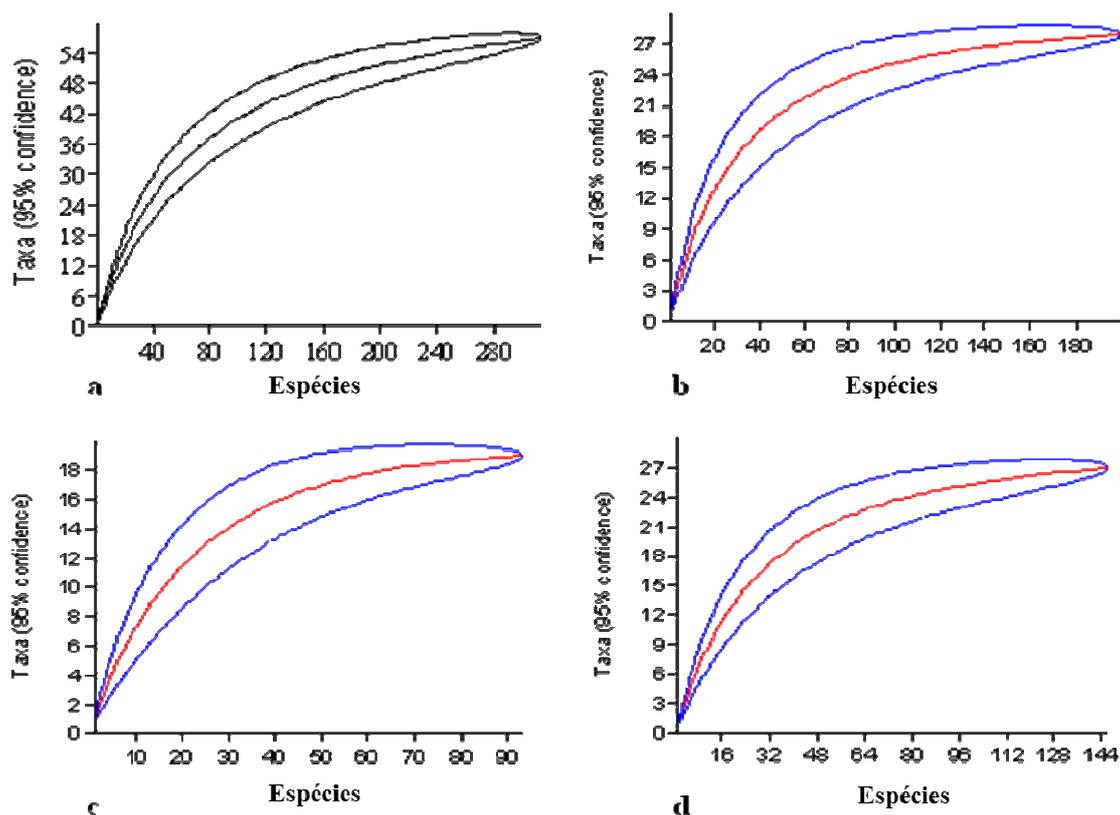
Os índices de diversidade das comunidades de fungos associados aos talos dos líquens foram determinados separadamente por área estudada. Na maioria das áreas foi observado um baixo compartilhamento das espécies encontradas. Foi possível observar apenas três gêneros em comum nas três áreas amostradas (*Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium*), todos cosmopolitas. Os talos líquênicos coletados no Deserto do Atacama e no Campos de Altitude apresentaram em comum os gêneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus* e *Neopestalotiopsis*. Dos líquens coletados na Antártica e no Deserto do Atacama apenas o gênero *Cryptococcus* foi comum. Nenhum gênero foi compartilhado exclusivamente entre as amostras coletadas na Antártica e as obtidas no Campos de Altitude. Além disso, os líquens presentes no Campo de Altitude apresentaram gêneros exclusivos (18), seguindo de Antártica (17) e Atacama (11).

Os índices de diversidade, riqueza e dominância das comunidades de fungos associados aos líquens antárticos variaram entre as áreas amostras e espécie de líquen

1375 analisada (Tabela 6). Para o índice de diversidade (Fishe α) foram encontrados os seguintes valores, ilha Elefante 8,86, ilha Rei George 7,23 e ilha Deception 9,74. Já a riqueza (Margalef), os valores foram de 5,10, 3,97 e 5,22 para as ilhas Elefante, Rei George e Deception. A dominância foi determinada por Simpson's e seus valores foram de 0,94; 0,91 e 0,94 para as ilhas Elefante, Rei George e Deception. Além disso, As curvas de rarefação de espécies das comunidades de fungos associadas aos líquens parecem ter chegado a assíntota (estabilidade), indicando que a amostragem da área foi representativa (Figura 26).

Tabela 6. Comparação entre os índices de diversidade das ilhas coletadas na Antártica.

	Ilha Elefante	Ilha Rei George	Ilha Deception
	<i>Usnea antarctica</i>	<i>Usnea aurantiaco-atra</i>	<i>Usnea antarctica</i>
Simpson's	0,94	0,91	0,94
Margalef's	5,10	3,97	5,22
Fishe α	8,86	7,23	9,74

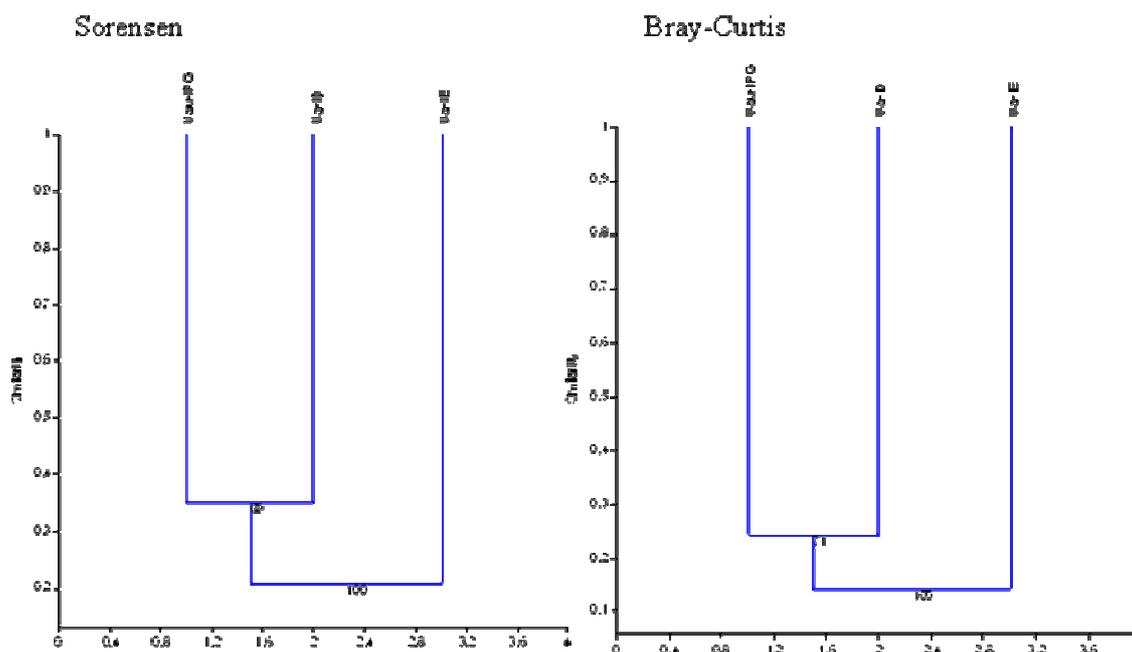


1380 **Figura 26.** Curvas de acumulação de espécies das comunidades de fungos associados a líquens coletados na Antártica. (a) curva geral contendo toda a comunidade de fungos associados as espécies de *Usnea* coletadas; (b) da comunidade de fungos de *Usnea antarctica* na ilha Elefante; (c) da comunidade de fungos de *Usnea aurantiaco-atra* na Ilha Rei George, (d) da comunidade de fungos de *U. antarctica* na ilha Deception.

1385

De acordo com os índices de similaridade de Sorensen e Bray-Curtis, a composição das comunidades fúngicas foi variável entre as espécies de *Usnea*, bem como na ilhas amostradas (Figura 27). Os índices de similaridade indicam que as comunidades de fungos mais semelhantes foram encontrados em *U. aurantiaco-atra* da ilha Rei George e *U. antarctica* da ilha Deception. A comunidade fúngica associada a *U. antarctica* da ilha Elefante formou um grupo separado, em comparação com as outras ilhas.

1390



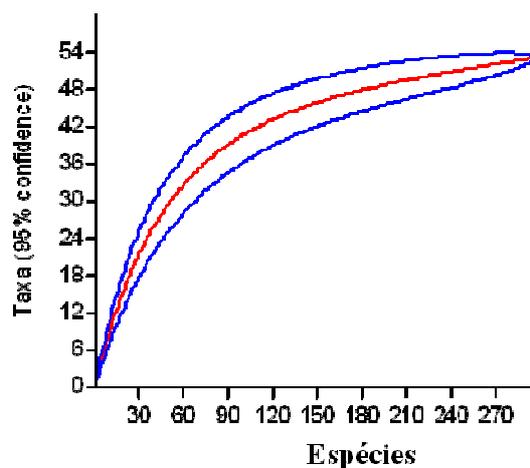
1395

Figura 27. Dendrograma de similaridade utilizando as análises de Sorensen e Bray-Curtis baseado na abundância de espécies coletadas em ilha Elefante, ilha Rei George e ilha Deception.

Os valores de Fisher α (18,84) e Margalef (9,14) encontrados para os fungos associados aos líquens coletados no Campo de Altitude na RPPN Santuário do Caraça foram elevados, sugerindo a presença de uma diversificada e rica comunidade quando comparada com as comunidades da Antártica e do Deserto do Atacama. O índice de Simpson (0,97) indicou que apenas alguns táxons são dominantes dentro da comunidade. Além disso, a curva de rarefação de espécies de fungos associados a líquens coletados no Campos de Altitude não atingiu estabilidade, não se observou assíntota, indicando que talvez seja necessário um maior esforço amostral para cobrir a riqueza de espécies esperadas para esta região. (Figura 28).

1400

1405



1410

Figura 28. Curva de acumulação de espécies da comunidade de fungos associados a líquens coletados no Campos de Altitude da RPPN Santuário d Caraça, Brasil.

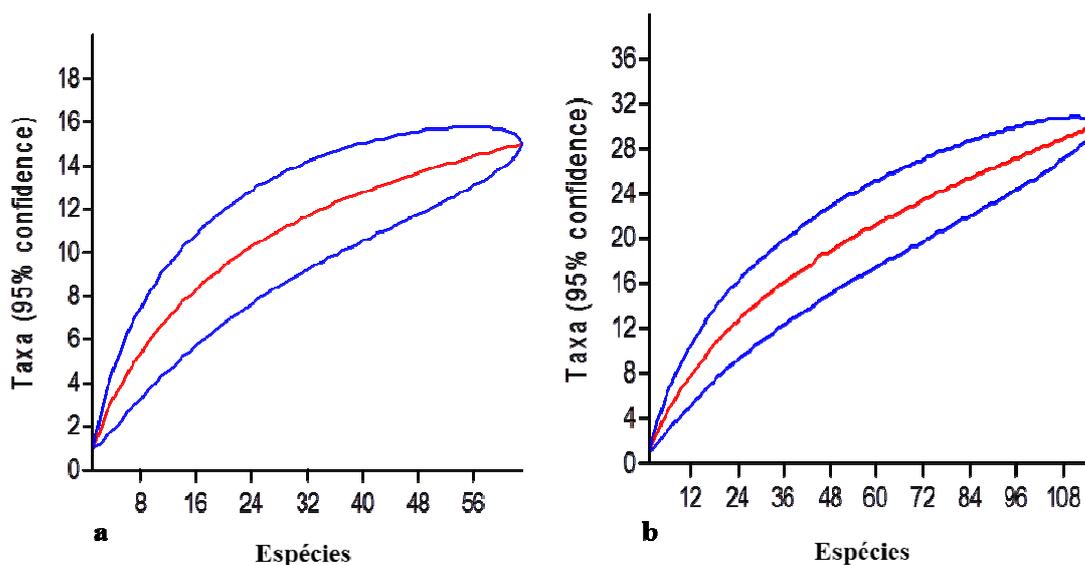
No Deserto do Atacama foram coletadas duas espécies de líquens (*Usnea* sp. e *Ramalina* sp.). Os índices diversidade, riqueza e dominância foram diferentes para duas comunidades (Tabela 7). A diversidade, riqueza e dominância foi maior para a comunidade obtida dos talos de *Ramalina* sp., em comparação com valores obtidos para a comunidade associada *Usnea* sp.

1420

Tabela 7. Comparação entre os índices de diversidade das amostra coletadas no Deserto do Atacama, Chile.

	Reserva do Paposo <i>Usnea</i> sp.	Parque Pan de Azucar <i>Ramalina</i> sp.
Simpson	0,85	0,89
Margalef	3,38	6,1
Fishe α	6,23	13,12

Os índices de Sorensen e Bray-Curtis foram de 0,04 e 0,01, respectivamente, sugerindo uma baixa similaridade enter as comunidades fúngicas amostradas. As curvas de rarefação de espécies de fungos associados a líquens coletados no Deserto do Atacama, para ambas comunidades, não atingiram a estabilidade (não chegaram a assíntota), indicando que é necessário um maior esforço amostral para cobrir a riqueza de espécies esperadas para esta região (Figura 29).



1430

Figura 29. Curva de acumulação de espécies da comunidade de fungos associados a líquens coletados no Atacama. (a) dos fungos associados as espécies de *Usnea* sp. e (b) da comunidade de fungos de *Ramalina* sp.

1435

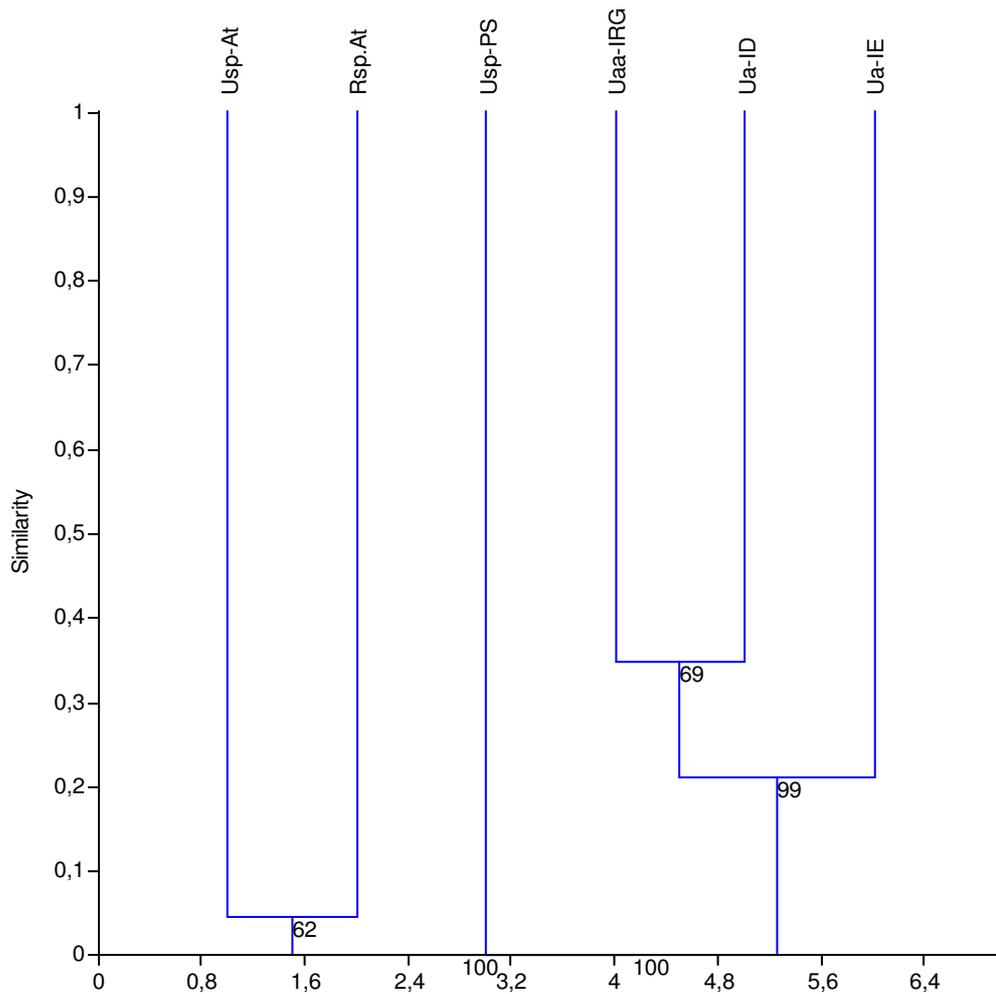
Os índices de diversidade das três áreas coletadas foram calculados em nível de gêneros descritos para cada região, sendo que estes apresentaram valores próximos. A comunidade de fungos não liquenizados do Campo de Altitude apresentou os maiores valores de diversidade, seguido da comunidade do Deserto do Atacama e Antártica, respectivamente (Tabela 8); o mesmo foi observado para os índices de similaridade (Figura 30). Os índices de similaridade de Sorensen e Bray-Curtis demonstraram maior semelhança entre as comunidades fúngicas presentes nos talos de líquens do Deserto do Atacama e Campo de Altitude, quando comparadas com comunidade presente nos líquens da Antártica (Figura 31).

1440

1445

Tabela 8. Comparação entre os índices de diversidade entre as comunidades de fungos não liquenizados presentes nos talos líquênicos das áreas coletadas.

	Antártica	Campo de Altitude	Deserto do Atacama
Simpson's	0,88	0,86	0,83
Margalef's	3,29	4,22	3,47
Fishe α	4,60	6,52	5,37



1450 **Figura 30.** Dendrograma de similaridade utilizando as análises de Sorensen baseado na presença
 ou ausência de espécies coletadas na Antártica, Campo de Altitude, Brasil e Deserto do
 Atacama, Chile.

6.3 Identificação de nova espécie de levedura

1455 A partir das amostras de fragmentos de líquens *Usnea antarctica* coletados na ilha
 Elefante foram isoladas 48 leveduras, dentre as quais três (ANT 384, ANT 407 e ANT
 408) pertencentes à uma espécie de levedura basidiomicética desconhecida. Estas três
 linhagens foram identificadas por meio do sequenciamento dos domínios D1/D2 da
 subunidade 26S do DNA r como idênticas entre si e próximas às linhagens tipo das
 espécies de leveduras já descritas *Tremella indecorata* (7 pares de base diferentes;
 1460 acesso no GenBank AF042250), *Cryptococcus laurentii* (19 pares de base diferentes e 1

gap; AF075469), *Bullera unica* (26 pares de base diferentes e 1 gap; AF075524) e *Bulleromyces albus* (30 pares de base diferentes e 1 gap; AF416643) (Figura 32). Adicionalmente, foi realizado o sequenciamento da região IT1-5.8S-ITS2 para essas três linhagens, que também apresentaram nessa região sequencias idênticas entre si, e
1465 diferiram das espécies *T. indecorata* (11 pares de base diferentes e 2 gaps; AF042432), *Cr. laurentii* (91 pares de base diferentes e 35 gaps; AF410468), *B. unica* (71 pares de base diferentes e 22 gaps; AF444441) e *Bu. albus* (71 pares de base diferentes e 19 gaps; AF444662) (Figura 33). Com base nos resultados dos sequenciamentos de ambas as regiões estudadas, propõe-se a descrição de uma nova espécie de levedura,
1470 pertencente ao clado *Tremella*, para acomodar as linhagens ANT 384, ANT 407 e ANT 408 obtidas no presente trabalho.

As três linhagens foram submetidas à testes fisiológicos de assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, e crescimento em diversas temperaturas, de acordo com metodologia padrão (Kurtzman et al. 2011). Os resultados desse ensaio
1475 foram idênticos para todos os isolados. Em relação aos perfis de assimilação das espécies de leveduras já descritas, mais próximas a esta nova espécie (*Tremella* sp.1), a tabela 9 traz um comparativo dos resultados observados para as linhagens tipo de cada espécie. O isolado ANT 408 foi escolhido para ser a linhagem tipo da nova espécie encontrada.

1480

Tabela 9. Perfil fisiológico de assimilação de compostos de carbono e nitrogênio, e crescimento em diferentes temperaturas da espécie *Tremella* sp. 1 (linhagem ANT 408) e espécies próximas segundo resultado do alinhamento das sequências dos domínios D1/D2 da subunidade 26S do DNAr.

Crescimento/ Assimilação	UFMGCB ANT408	<i>Tremella</i> <i>indecorata</i>	<i>Cryptococcus</i> <i>laurentii</i>	<i>Bullera</i> <i>unica</i>	<i>Bulleromyces</i> <i>albus</i>
10°C	+	n	n	n	n
15°C	+	n	n	n	n
25°C	-	+	+	+	+
30°C	-	v	+	-	v
37°C	-	-	v	n	-
40°C	-	n	n	n	n
Glicose	+	+	+	+	+
Inulina	v	-	-	-	+
Sacarose	+	+	+	+	+
Rafinose	+	v	+	+	+
Melibiose	+	v	+	+	v
Galactose	+	+	+	+	+
Lactose	+	v	+	+	+
Trealose	+	+	d/+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+
Melizitose	+	+	+	+	+
Amido	-	v	+	+	v
Celobiose	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	d/+	+	+
L-sorbose	-	+	-/d	-	v
L-raminose	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+
D-arabinose	v	+	+	+	+
D-ribose	+	+	d/+	d	+
Metanol	-	-	-	-	-
Etanol	v	f	d/+	-	v
Glicerol	+	v	-/d	-	+
Eritritol	-	-	+	d	v
Ribitol	+	+	+	+	v
Galactitol	+	f	v	+/d	v
D-manitol	+	+	+	+	+

Glucitol	+	+	+	+	+
M-inositol	+	+	+	+	+
DL-lactato	+	+	d/+	-	+
Suocinato	+	+	+	+	+
Citrato de sódio	+	+	+	+	+
Gluconato	+	+	+	+	+
Isopropanol	-	n	n	n	n
Xilitol	+	n	n	n	n
Acetona	-	n	n	n	n
N acetil glucosamina	+	n	+	n	n
Nitrato	-	-	-	-	-
Nitrito	-	-	n	n	-
Lisina	+	n	n	n	n
10% NaCl	-	n	-	-	n
Produção de ácido (meio Carbonato)	+	n	n	n	n
Ác Acético	-	n	n	n	n
0,01% cicloheximida	+	n	n	n	n
Sem aminoácido	+	n	n	n	n
Produção de compostos amilóides	+	n	n	n	n
Fermentação de glicose	-	-	-	-	-

(+) positivo; (-) negativo; (v) variável; (n) não se aplica; (f) fraco; (d) devagar

1490 De acordo com a Tabela 9, observa-se que a nova espécie *Tremella* sp. 1 pode ser distinguida das demais espécies avaliadas por meio do crescimento a 25 °C, negativo para a nova espécie e positivo para as demais. Especificamente, *Tremella* sp. 1 também difere da espécie mais próxima *T. indecorata* em relação à assimilação de L-sorbose (negativo para a nova espécie e positivo para a última).

1495 Para observação da morfologia celular e modo de reprodução, as linhagens foram crescidas em caldo (YNB + 2% de glicose) incubado à 15 °C por até 21 dias. As observações foram feitas em microscópio óptico, diariamente, durante o período mencionado. A Figura 31 representa uma micrografia da linhagem ANT 408. Não foi observada a formação de esporos sexuados pelos isolados dessa nova espécie quando

1500 cultivados sob as condições empregadas, indicando que esta é, provavelmente, uma espécie anamórfica.

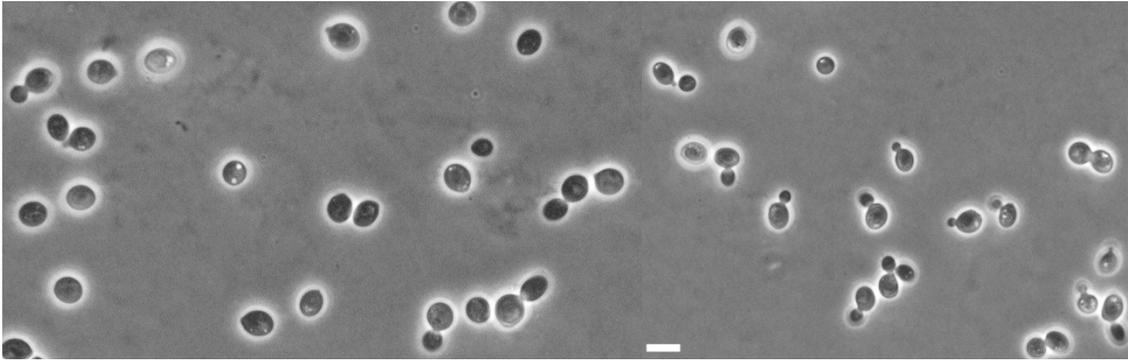


Figura 31. Micrografia de contraste de fase de células do táxon *Tremella* sp. 1 UFMGCB ANT408 cultivada em caldo (YNB + 2% glicose) a 15 °C por sete dias. Barra de 10 µm.

1505

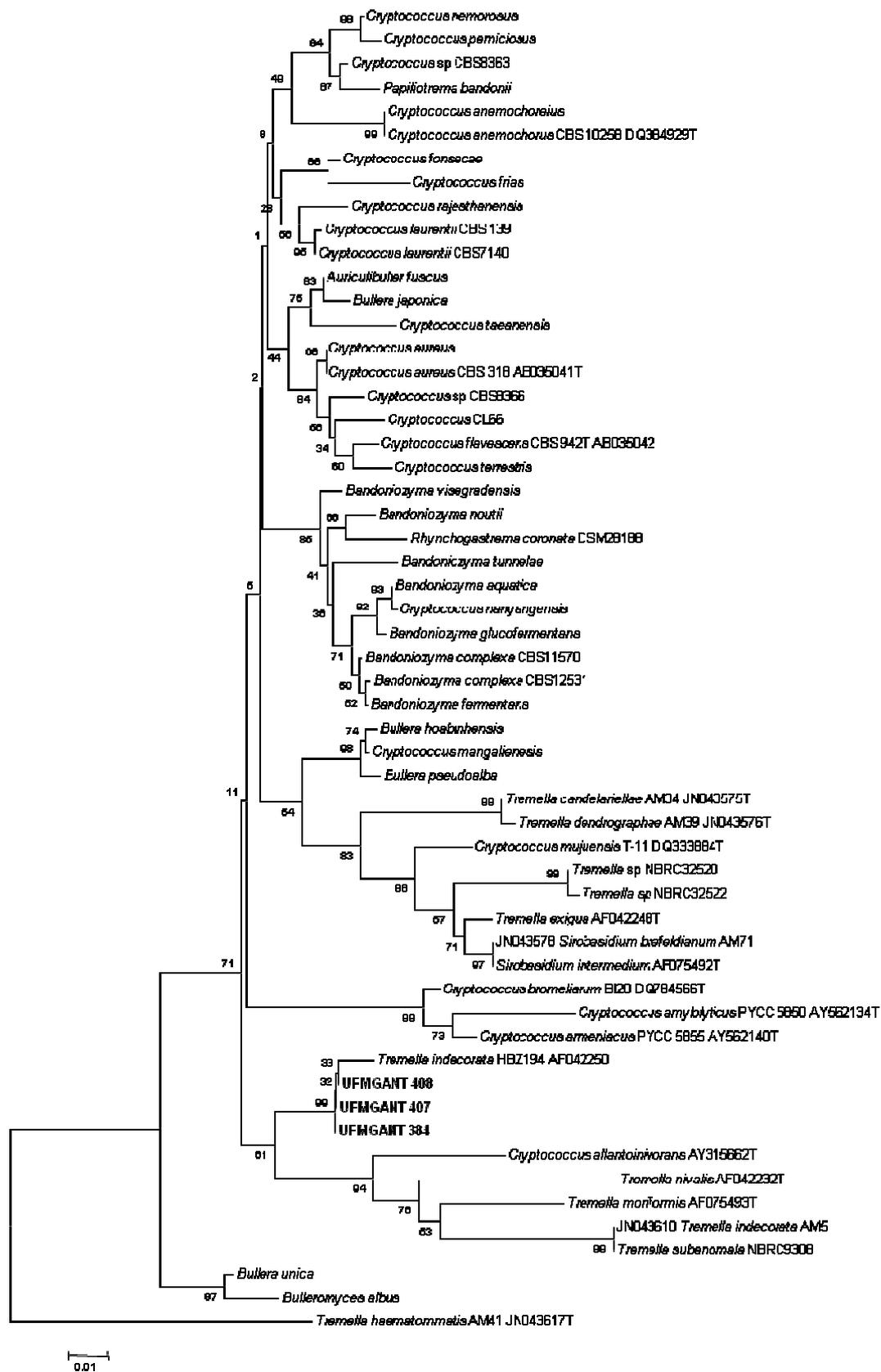
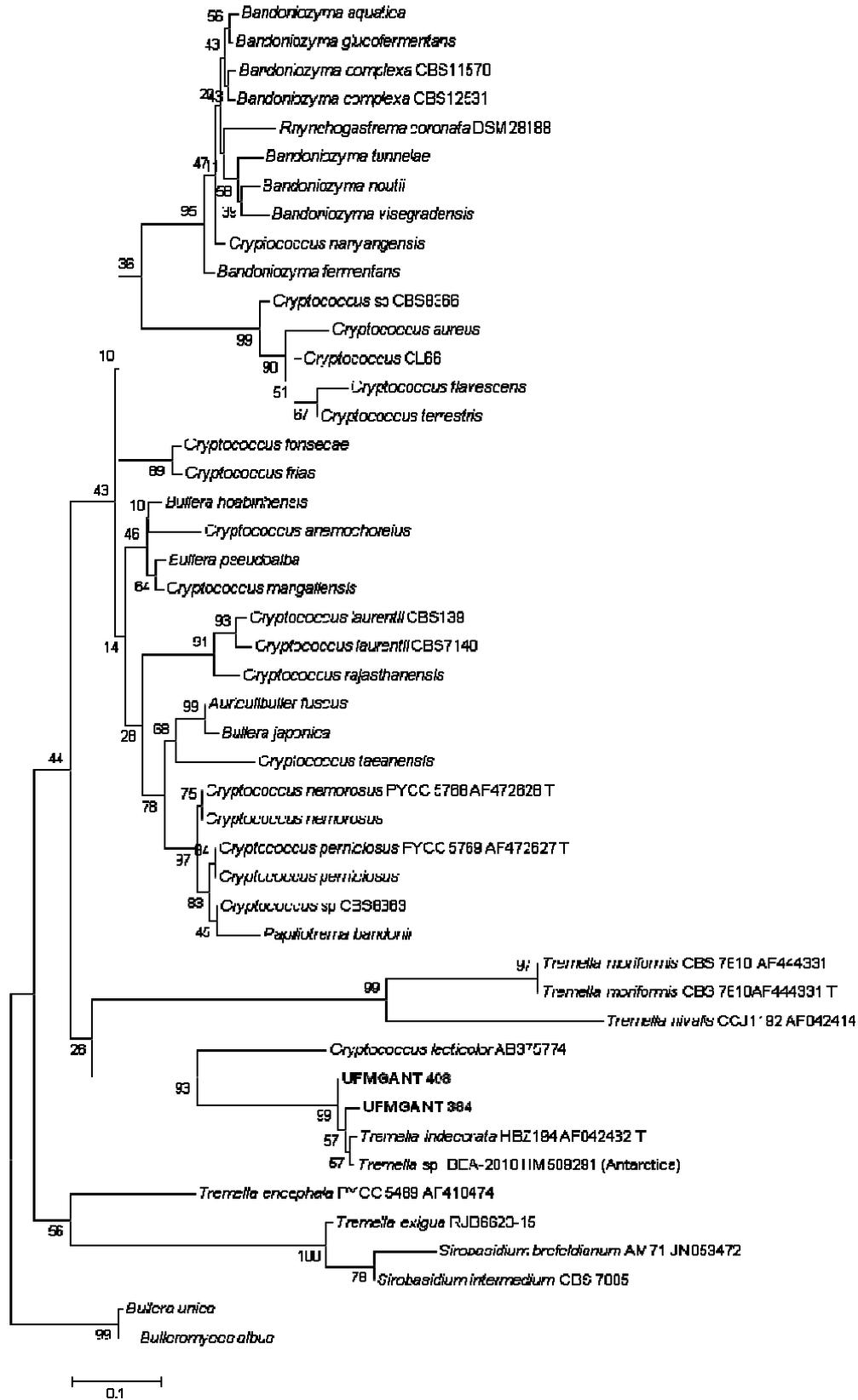


Figura 32. Árvore filogenética dos isolados de *Tremella* sp. 1 UFMGCB ANT 384, 407e 408 baseada no sequenciamento dos domínios D1/D2 do gene do rRNA.



1510 **Figura 33.** Árvore filogenética dos isolados de *Tremella* sp. 1 UFMGCB ANT 384 e 408 baseada no sequenciamento da região IT1-5.8S-ITS2 do gene do rRNA.

6.4 Atividade biológica dos extratos

Os 937 extratos produzidos (919 fúngicos e 18 dos líquens) foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana (Tabela 10). Foram detectados 37 (4%) extratos ativos contra pelo menos um dos micro-organismos alvos com inibição do crescimento $\geq 70\%$. Destes, seis extratos foram obtidos de fungos da Antártica, nove do Campo de Altitude e 22 do Deserto do Atacama. *Pichia kurdiavzevii* (*Candida krusei*) foi, dentre os fungos testados, o que apresentou o maior número de extratos bioativos (25); destes, 10 provenientes de isolados do Campo de Altitude e 15 do Deserto do Atacama. Três extratos (*Leptosphaeria* sp., *Penicillium* sp. 1 e *Alternaria* sp. 2) apresentaram atividade contra *S. aureus* e *E. coli*, com atividades variando de 70 a 100% de inibição. Os alvos *Cladosporium sphaerosperum* e *Pseudomonas aeruginosa* não apresentaram sensibilidade a nenhum dos extratos já avaliados.

Dentre os fungos obtidos dos líquens da Antártica, *Antarctomyces psychrotrophicus* e *Leptosphaeria* sp. foram ativos contra *E. coli* com CIM de 150 $\mu\text{g/mL}$. O extrato de *Leptosphaeria* sp. apresentou 88% de inibição contra *S. aureus* e CIM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$.

Os nove extratos ativos obtidos dos fungos do Campo de Altitude foram provenientes de táxons dos gêneros *Bipolaris*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis* e *Trichoderma*. Destes, sete extratos foram ativos contra *C. krusei*. Um extrato de *Penicillium* sp. 1 e o extrato do líquen *Usnea* sp. foram ativos contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* com CIM de 62,5 e 250 $\mu\text{g/mL}$ para extrato do fungo e 31,25 e 250 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato do líquen, respectivamente.

Vinte um extratos de fungos obtidos de amostras do Deserto do Atacama foram ativos (sete extratos de *Penicillium*, seis de *Alternaria*, três de *Cladosporium*, três de *Preussia*, um de *Botrytis* e um de *Ucladium*). Seis extratos de espécies de *Alternaria* apresentaram atividade com a CIM variando de 250 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$.

A maioria dos extratos produzidos a partir dos líquens coletados nas três áreas amostradas apresentou atividade contra mais de um alvo testado. Os extratos das quatro *Usnea* coletadas na Antártica e no Campo de Altitude foram ativas a *E. coli* e *S. aureus*. O extrato da *Usnea* sp. coletada no Deserto do Atacama foi ativa a *E. coli*. Nenhum dos extratos testados apresentou atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*. O extrato que apresentou melhor atividade foi o do líquen *Usnea* sp. coletado no Atacama, o qual

1545 apresentou atividade contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. shaerospermum* e *E. coli*. Dos 37 extratos ativos todos foram testados para determinação da CIM, apenas 18 (49%) extratos repetiram a atividade apresentada no teste de triagem.

Tabela 10. Atividade antimicrobiana dos extratos produzidos.

Ecossistema/extrato	Micro-organismos alvos					
	Leveduras		Fungo Filamentoso	Bactéria		
	<i>C. albicans</i> ^b	<i>C. krusei</i> ^c	<i>C. shaerospermum</i> ^d	<i>E. coli</i> ^e	<i>S. aureus</i> ^f	<i>P. aeruginosa</i> ^g
Antártica						
<i>Usnea antarctica</i>	27 ± 1	0 ± 0	18 ± 45	100 ± 1 (31, 25±0)	95 ± 3 (125±0,1)	10 ± 6
<i>Usnea aurantiaco-atra</i>	24 ± 1	14 ± 1	35 ± 9	100 ± 1 (62,5±0)	94 ± 4 (125±0,8)	3 ± 8
<i>Usnea antarctica</i>	26 ± 0	29 ± 0	0 ± 13	100 ± 15 (31,25±0)	95 ± 10 (125±0,1)	8 ± 4
<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> UFMGCB 8504	26 ± 16	63 ± 35	0 ± 63	101 ± 74 (125±0,4)	44 ± 0	5 ± 2
<i>Leptosphaeria</i> sp. UFMGCB 8557	0 ± 11	0 ± 1	52 ± 1	72 ± 13 (125±0,4)	88 ± 88 (62,5±19)	0 ± 4
<i>Penicillium</i> sp. UFMGCB 8564	17 ± 3	45 ± 13	0 ± 24	100 ± 76 (125±0,1)	69 ± 36	0 ± 11
Campo de Altitude						
<i>Usnea</i> sp.	0 ± 0	0 ± 1	35 ± 11	96 ± 17 (31,25±113)	92 ± 2 (250±2)	48 ± 29
<i>Penicillium</i> sp.2 UFMGCB 8766	14 ± 5	75 ± 7	0 ± 13	0 ± 4	0 ± 0	0 ± 0
<i>Penicillium solitum</i> UFMGCB 8768	13 ± 4	70 ± 5	0 ± 3	3 ± 1	0 ± 0	27 ± 7
<i>Penicillium</i> sp. 1 UFMGCB 8778	29 ± 4	50 ± 1	0 ± 98	100 ± 83 (62,5±33)	94 ± 7 (250±16)	0 ± 1
<i>Trichoderma</i> sp. UFMGCB 8903	27 ± 0	72 ± 20	0 ± 10	0 ± 1	4 ± 4	21 ± 5
<i>Penicillium</i> sp. 2 UFMGCB 8908	38 ± 1	78 ± 58	0 ± 3	3 ± 4	0 ± 3	0 ± 1
<i>Penicillium</i> sp. 2 UFMGCB 8935	9 ± 3	76 ± 12	0 ± 30	0 ± 0	0 ± 7	0 ± 9
<i>Bipolaris</i> cf. <i>drechsleri</i> UFMGCB 8948	0 ± 2	70 ± 8	0 ± 7	0 ± 0	0 ± 8	2 ± 15
<i>Pestalotiopsis australasiae</i> UFMGCB 9027	13 ± 3	84 ± 0	0 ± 9	0 ± 3	0 ± 1	0 ± 4

Deserto do Atacama

<i>Usnea</i> sp.	82 ±1 (125±0,2)	94 ±0	70 ±1	97 ±0 (62,5±30)	39 ±11	0 ±8
<i>Alternaria</i> sp. 2 UFMGCB 9267	43 ±13	50 ±6	14 ±7	100 ±377 (125±37)	0 ±48	0 ±6
<i>Alternaria</i> sp.2 UFMGCB 9288	11 ±11	60 ±0	15 ±0	99 ±73 (125±127)	12 ±9	0 ±12
<i>Botrytis pelargonii</i> UFMGCB 9289	30 ±1	70 ±4	0 ±0	5 ±15	16 ±31	0 ±26
<i>Alternaria</i> sp. 2 UFMGCB 9293	16 ±0	75 ±0	8 ±0	8 ±4	21 ±22	0 ±6
<i>Penicillium</i> sp. UFMGCB 9301	0 ±1	71 ±1	0 ±0	9 ±7	0 ±11	0 ±6
<i>Alternaria</i> sp. 2 UFMGCB 9313	2 ±1	60 ±4	15 ±0	96 ±81 (62,5±58)	0 ±17	0 ±1
<i>Alternaria</i> sp. 2 UFMGCB 9319	6 ±2	61 ±0	6 ±0	98 ±78 (250±1,4)	16 ±47	0 ±0
<i>Cladosporium</i> sp. 1 UFMGCB 9320	20 ±0	71 ±0	2 ±0	1 ±17	41 ±18	0 ±0
<i>Cladosporium</i> sp. 1 UFMGCB 9321	13 ±1	71 ±0 (250±1,4)	0 ±0	0 ±9	0 ±5	0 ±24
<i>Penicillium</i> sp. UFMGCB 9323	0 ±0	75 ±2	0 ±38	13 ±7	0 ±14	0 ±17
<i>Preussia</i> sp. UFMGCB 9324	0 ±1	70 ±1	0 ±0	0 ±10	0 ±20	0 ±7
<i>Preussia</i> sp. UFMGCB 9334	18 ±0	70 ±5	0 ±2	10 ±8	20 ±22	8 ±9
<i>Penicillium</i> sp. UFMGCB 9335	19 ±0	78 ±2	2 ±2	0 ±1	3 ±12	0 ±5
<i>Penicillium rudallense</i> UFMGCB 9336	12 ±1	88 ±6	10 ±0	6 ±4	42 ± 11	0 ± 14
<i>Penicillium</i> sp. UFMGCB 9344	0 ±0	78 ±6	0 ±6	2 ±0	4 ±38	0 ±15
<i>Preussia</i> sp. UFMGCB 9349	0 ±1	70 ±0	0 ±1	3 ±0	0 ±8	0 ±8

<i>Penicillium rudallense</i> UFMGCB 9362	0 ± 0	71 ± 5	0 ± 21	15 ± 5	0 ± 27	0 ± 0
<i>Cladosporium</i> sp. 1 UFMGCB 9371	0 ± 0	70 ± 0	14 ± 0	4 ± 2	7 ± 4	0 ± 4
<i>Penicillium bussumense</i> UFMGCB 9389	16 ± 0	56 ± 0	0 ± 46	101 ± 3 (125 ± 5)	41 ± 5	3 ± 3
<i>Alternaria</i> sp. 2 UFMGCB9407	0 ± 1	31 ± 1	16 ± 9	82 ± 4 (62,5 ± 78)	70 ± 16	3 ± 3
<i>Ulocladium dauci</i> UFMGCB 9421	0 ± 1	0 ± 0	30 ± 2	100 ± 0 (125 ± 14)	66 ± 27	0 ± 13
Drogas controles						
Anfotericina B	100 ± 1	100 ± 1,3				
Cloranfenicol				100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1
Benomil			98 ± 1,9			

^aUFMGCB = Código da Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais; ^b*Candida albicans* ATCC 18804; ^c*Candida krusei* ATCC 6258; ^d*Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740; ^e*Escherichia coli* ATCC 11775; ^f*Staphylococcus aureus* ATCC 12600; ^g*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145; ^hConcentração do extrato utilizado na triagem. Em negrito, o percentual de inibição dos extratos ativos com o coeficiente de variação e valor da concentração inibitória mínima (CIM) mostrado entre parênteses (µg/mL)

6.5 Análise química dos extratos

Doze extratos fúngicos, dois de fungos não liquenizados da Antártica, quatro de fungos do Campo de Altitude e seis de fungos do Deserto do Atacama, as quais apresentaram os melhores valores de inibição quando calculados a CIM, tiveram seus perfis químico gerados por meio da RMN ^1H (Anexo A, B e C). A análise dos espectros de RMN ^1H dos extratos indicaram presença de ácidos graxos e substâncias aromáticas para as diferentes espécies de fungos. Os extratos de *Alternaria* sp. 2, *Antarctomyces psychrotrophicus*, *Leptosphaeriaceae* sp., *Penicillium bussumense*, *Penicillium* sp. 1 e *Ulocladium dauci* apresentaram indícios de substâncias aromáticas. Entretanto, o extrato de *Leptosphaeriaceae* sp. UFMGCB 8557 apresentou ausência de ácidos graxos e, por isso, interessante para futuro estudos de fracionamento químico biomonitorado.

6.6 Análise da resistência à radiações ultravioleta

Foram testadas 102 leveduras, sendo 48 isolados de *U. antarctica* da Ilha Elefante, 22 isolados de *U. aurantiaco-atra* da Ilha Rei George e 32 isolados de *U. Antarctica* da Ilha Deception. Todas as leveduras foram avaliadas separadamente por ilha quanto à sua resistência à radiação UVC utilizando fluências de 300, 600 e 900 J/m^2 . Essas fluências foram utilizadas em ensaios de sobrevivência, por contagem de UFC, como critério para definir leveduras fracas, moderadas e resistentes quanto à radiação exposta (Figura 34).

Após triagem em UVC foi possível observar uma maior presença de leveduras com resistência moderada 55%, seguida de leveduras sensíveis 30%, resistente 11% e muito resistentes 4%. As leveduras amostradas obtidas na ilha Deception apresentaram maior perfil de resistência, quando comparadas com os isolados das outras ilhas, as quais apresentaram também uma homogeneidade entre a condição das leveduras em relação à radiação, sensíveis 35% e moderada 38%. Ao final dos testes, foram obtidas 11 leveduras resistentes à radiação UVC e quatro muito resistentes, estas foram distribuídas em sete resistentes e duas leveduras muito resistente obtidas da ilha Deception; três leveduras resistentes e zero muito resistentes da ilha Elefante; e uma levedura resistente e duas muito resistentes da ilha Elefante.

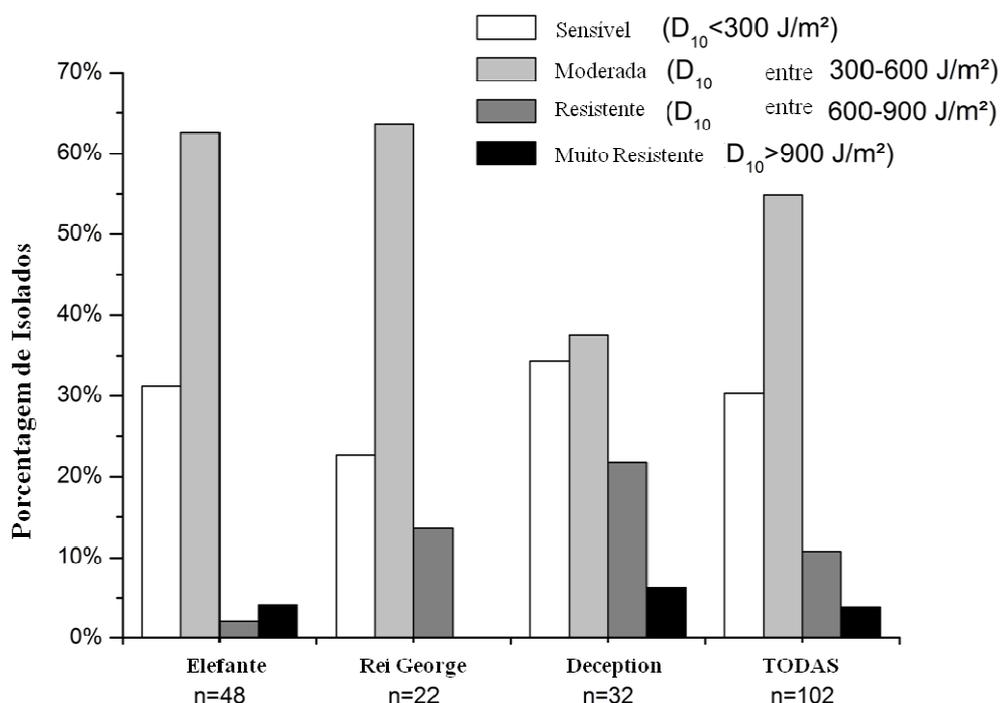


Figura 34. Gráfico ilustrando a porcentagem de espécies testadas de acordo com seu local de origem (ilhas antárticas) com relação a sua capacidade de resistir a doses (a) $< 300 \text{ J/m}^2$, (b) entre $300 - 600 \text{ J/m}^2$, (c) entre $600 - 900 \text{ J/m}^2$ e (d) $> 900 \text{ J/m}^2$.

Para a exposição a UV ambiental, os ensaios foram realizados controlando-se o tempo de exposição, pois o espectro de emissão do simulador solar é contínuo (90% UVA e 10% UVB) e a medida apenas de uma faixa espectral, poderia levar a comparações indevidas com o experimento de UVC com lâmpadas de emissão em linha. As triagens por UFC foram realizadas após 10, 20 e 30 min de exposição (Figura 35). O tempo de exposição utilizado foi ineficiente para demonstrar as espécies sensíveis a radiação UV ambiental, sendo necessário maior tempo de exposição para que se possa perceber este resultado.

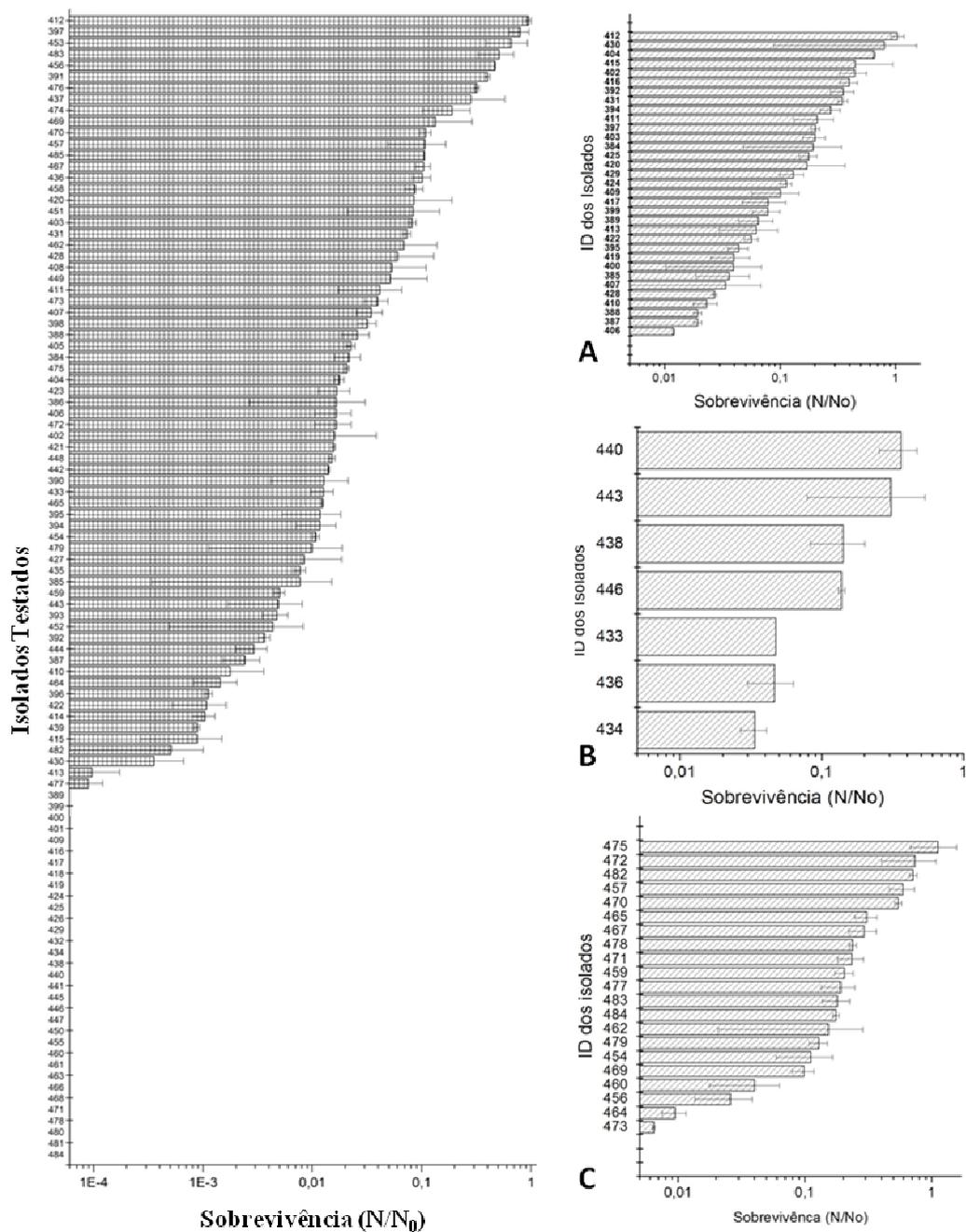


Figura 35. Gráficos ilustrando a resistência a UV ambiental das espécies testada numa visão geral, para as leveduras por área amostrada (ilhas Antárticas). (a) Ilha Elefante, (b) Ilha Rei George e (c) Ilha Deception com relação a sua capacidade de resistir a doses durante 10, 20 e 30 min de exposição.

6.7 Análise de pigmentos por espectroscopia Raman

As análises de espectroscopia Raman foram realizadas em 28 isolados fúngicos, um representante de cada espécie de levedura encontrada em cada ilha Antártica. No espectro de Raman, os carotenóides apresentam dois picos fortes com comprimento de

onda de 1150 e 1510 cm¹. No total, 14 espécies obtidas de *U. antarctica* da Ilha Elefante, cinco de *U. aurantiaco-atra* da Ilha Rei George e nove de *U. Antarctica* da Ilha Deception apresentaram espectro de carotenóides. Para ilha Elefante, 36% das espécies (*Rhodotorula laryngis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus victoriae*, *Cryptococcus friedmannii* e *Holtermanniella waticus*); para ilha Rei George 20% (*Cryptococcus victoriae*) encontradas apresentaram bandas características de carotenóides; e para ilha Deception 56% (*Rhodotorula laryngis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula arctica*, *Rhodotorula creatinivora* e *Cryptococcus victoriae*).

7 DISCUSSÃO

7.1 Identificação e diversidade dos fungos

Poucos estudos sobre a simbiose entre fungos não liquenizados e líquens foram realizados até o momento. Líquens são organismos com ampla distribuição geográfica, e por isso, seus talos podem representar um habitat natural, ideal para sobrevivência e dispersão de comunidades microbianas associadas, principalmente aquelas presentes em ecossistemas extremos. Entre os poucos estudos de simbiose entre fungos não liquenizados e talos de líquens, Möller & Dreyfuss (1996) isolaram 89 táxons de fungos filamentosos associados a 20 espécies de líquens coletados em dois pontos na Ilha Rei George na Antártica, durante o verão de 1991/1992. Neste estudo, *Phoma* sp. II foi a espécie mais abundante; entretanto, outros táxons também foram identificados, tais como *Geomyces pannorum*, *Chalara* sp., *Phaeoseptorias* sp., *Cylindrocarpon* sp. e *Phomopsis* sp. Porém, no estudo de Möller & Dreyfuss (1996) foram utilizadas técnicas de taxonomia morfológica clássica para identificar os fungos, o que talvez pode ter subestimado a real diversidade da comunidade fúngica presente nas amostras avaliadas, pois vários táxons não puderam ser identificados em nível de espécie.

Alguns gêneros identificados por Möller & Dreyfuss (1996), como *Thelebolus*, *Cladosporium* e *Penicillium*, também foram encontrados nos talos dos líquens avaliados no presente trabalho como espécies abundantes. Os gêneros identificados em maior abundância em associação com os líquens antárticos foram *Antarctomyces*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Pseudogymnoascus* e *Thelebolus*, os quais, exceto *Penicillium*, abrigam espécies endêmicas da Antártica. Espécies de *Pseudogymnoascus* e *Thelebolus* já foram descritas como abundantes em outros trabalhos de isolamento de fungos a partir de amostras de madeira em decomposição (ARENZ *et al.*, 2006), lagos (TSUJI *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2012), esponjas marinhas (HENRÍQUEZ *et al.*, 2014) e solo (KOCHKINA *et al.*, 2014) e na Antártica.

Associada aos líquens antárticos, encontramos encontramos a espécie endêmica *A. psychrotrophicus*, a qual foi originalmente isolada de amostras de solo da ilha Rei George (STCHIGEL *et al.*, 2001) e, posteriormente, de amostras de água de lagos antárticos (GONÇALVES *et al.*, 2012) e macroalgas (LOQUE *et al.*, 2010; GODINHO

et al., 2013) também na Antártica. Neste trabalho *Antarctomyces psychrotrophicus* foi isolado com alta frequência dos líquens coletados em ilha Elefante e ilha Deception.

Muitos fungos presentes na Antártica são cosmopolitas e psicrotolerantes, entre os quais se encontram diferentes espécies de *Penicillium*. Kochkina *et al.* (2012) encontraram uma elevada abundância de isolados *Penicillium* presentes no *permafrost* na região do Dry Valley's. O gênero *Penicillium* foi também descrito como o fungo mais comum em ecossistemas antárticos (MCRAE *et al.*, 1999), sendo encontrado associado a musgos (MOLLER & DREYFUSS 1996), a madeira em decomposição (ARENZ *et al.*, 2006), talos de macroalgas (LOQUE *et al.* 2010, GODINHO *et al.*, 2013; FURBINO *et al.*, 2014, GODINHO *et al.*, 2015), , *permafrost* (ZUCCONI *et al.*, 2012) e sedimento marinho (GONÇALVES *et al.*, 2013).

Alguns táxons foram obtidos como minoritários dentro das comunidades de fungos da Antártica, como por exemplo aqueles pertencentes aos gêneros *Capnobotryella*, *Catenulostroma* e *Purpureocillium*. *Purpureocillium lilacinum* foi recentemente isolado de solo antártico e descrito como bioativo (atividades tripanossomicida, antifúngica e antibacteriana) (GONÇALVES *et al.*, 2015), demonstrando que componentes minoritários (singletos) dentro das comunidades podem ser importantes produtores de substâncias bioativas.

Dentre as 102 leveduras obtidas dos líquens antárticos, *Cryptococcus victoriae* foi a espécie mais frequente, seguida de *Debaryomyces hansenii* e *Bensingtonia yamatoana*. Estas espécies também foram isoladas por Vaz *et al.* (2011) em diferentes substratos coletados na ilha Rei George, Antártica. Vaz *et al.* (2011) e Carrasco *et al.* (2012) descreveram *Cr. victoriae* como uma espécie produtora das enzimas extracelulares celulase, esterase e lipase. *Debaryomyces hansenii* e *Bensingtonia yamatoana* foram isoladas a partir de amostras de gelo coletadas na Patagônia Argentina (GARCIA *et al.*, 2012). A levedura *D. hansenii* também já foi isolada de geleiras no Ártico (JACQUES *et al.*, 2015) e no lago Great Salt, Utah, EUA (BUTINAR *et al.*, 2005). Atualmente, *D. hansenii* tem sido estudada quanto a sua capacidade de resistir a estresses osmótico, oxidativo e estresse iônico, as quais parece lhe conferir maior adaptação a ambientes extremos (MICHÁN *et al.*, 2013).

Como singletos, as espécies *Candida davisiana*, *Cryptococcus foliicola*, *Cryptococcus friedmannii*, *Cryptococcus terricola*, *Leucosporidiella creatinivora* e

Rhodotorula creatinivora também foram descritas em associação com *U. antarctica*. *Cryptococcus friedmannii* foi descrita como uma espécie endolítica rara e em amostras de rochas da Antártica (SCHMIDT *et al.*, 2012). Bakys *et al.* (2009) relatam que *Cryptococcus foliicola* como espécie abundante em amostra de solo na Antártica (ARENZ *et al.*, 2006). Isolada de geleira Midre Love'n'breen, no Artico (PATHAN *et al.*, 2010) e do sedimento subglaciar de Alpes Italianos (Turchetti *et al.*, 2008) a espécie *Rhodotorula creatinivora* é uma levedura psicrófila bem adaptada a baixas temperaturas. *Leucosporidiella creatinivora* ocorre em pequeno número mas em diversos ambientes de clima frio e já foi descrita como componente minoritário em geleiras alpinas (TURCHETTI *et al.*, 2013), em glaciais na Patagonia Argentina (GARCIA *et al.*, 2007) e associada com esponjas marinhas na Antártica (VACA *et al.*, 2013).

Duarte *et al.* (2013) obtiveram 97 isolados de leveduras de diversos substratos na ilha Rei George. Destes isolados 12 leveduras foram obtidas de líquens e seis de rochas com líquens. As espécies encontradas a partir dos líquens foram *Rhodotorula laryngis* (4), *Cryptococcus victoriae* (2), *Guehomyces pullulans* (2), *Rhodotorula mucilaginosa* (2), *Cystofilobasidium infirmominiatum* (1) e *Tremella indecorata* (1); a partir de rochas com líquens foram identificadas *Candida davisiana* (3), *Rhodotorula laryngis* (2) e *Rhodotorula glacialis* (1). Em comum com espécies encontradas por Duarte *et al.* (2013), foram identificadas cinco espécies (*Rhodotorula laryngis*, *Cryptococcus victoriae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida davisiana* e *Tremella indecorata*) em associação com os líquens antárticos. Além disso, neste estudo propusemos uma nova espécie de *Tremella*, a qual possui 7 pares de base diferentes quando comparada com a espécie tipo de *Tremella indecorata* pelo sequenciamento dos domínios D1/D2 e 11 pares de base diferentes comparando com sequências da região IT1-5.8S-ITS2. *Tremella indecorata* já foi descrita associada ao líquen, neste trabalho os autores não determinam de qual espécie de líquen foi isolado *Tremella indecorata* (DUARTE *et al.*, 2013) e presente no solo dos Dry Valleys (ARENZ *et al.*, 2011) na Antártica.

Todos os fungos isolados dos líquens do Campo de Altitude são pertencentes ao filo *Ascomycota* e os gêneros mais frequentes foram *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Curvularia* e *Bipolaris*. *Penicillium* é um gênero que inclui várias espécies descritas e apresenta grande plasticidade fisiológica, podendo tolerar condições diversas de

temperatura e sobreviver como psicotolerante (DUNCAN *et al.*, 2006), termófilo (SALAR & ANEJA, 2007) e halófilo (CANTRELL *et al.*, 2006). Neste estudo foi possível identificar 10 espécies de *Penicillium*, as quais representaram 32% dos isolados obtidos. Algumas espécies de *Pestalotiopsis* têm sido isoladas de ambientes extremos e relatadas como produtoras de metabólitos com atividade biológica (TEJESVI *et al.*, 2007). Um exemplo é *Pestalotiopsis microspora*, que foi isolada da planta *Taxus* sp. no Himalaia, a qual produz a substância anticâncer Taxol (STROBEL *et al.*, 1996). O gênero *Curvularia* foi isolado a partir de amostras de solo na região costeira do Mar Morto (GRISHKAN *et al.*, 2003) e em amostras de areia da região costeira da Índia (RAVIKUMAR *et al.*, 2009).

Espécies dos gêneros *Cosmospora*, *Flavomyces*, *Microdiplodia*, *Ochrocladosporium* e *Phaeobotryosphaeria* foram encontradas como singletos. Espécies de *Cosmospora* são entomopatógenos causadores de doenças em insetos (MAUHLIN *et al.*, 2011). O gênero *Ochrocladosporium* foi recentemente isolado de pilha de compostagem lignilítica na Espanha (JURADO *et al.*, 2014). Persohn *et al.* (2010) descreveram o gênero *Phaeobotryosphaeria* como endofítico de *Viscum album* parasita de *Pinus sylvestris* na Alemanha.

Preussia foi gênero mais abundante encontrado em associação com os líquens do Deserto do Atacama. *Preussia* foi o gênero mais isolado como endofítico de caule e folhas de árvores coletadas no Deserto de Sonora (MASSIMO *et al.*, 2015) e em amostras de solo no Deserto do Atacama (ARENAL *et al.*, 2005). Os dois líquens amostrados no Deserto do Atacama compartilham outros gêneros como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Coprinopsis*, *Penicillium* e *Ulocladium*. Segundo Conley *et al.* (2006) os gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eupenicillium*, *Penicillium* e *Ulocladium* foram amplamente isolados em amostras de solo no Deserto do Atacama. Espécies de *Alternaria* e *Ulocladium* incluíram os táxons generalistas identificados em todos os pontos amostrados ao longo de um transecto de 150 km que percorreu dos Andes até o lago Salar, no Chile. Como extremófilo, espécies de *Alternaria* foram descritas como endofíticas de *Deschampsia antarctica* na Antártica (ROSA *et al.*, 2009). De acordo com El-Said & Saleem (2008), em áreas de deserto são encontrados grande número de fungos pigmentados e com esporos de parede espessa, como por exemplo *Cladosporium*, bem como espécies que produzem esporos grandes

(*Alternaria* e *Ulocladium*). Além disso, cerca de 12 gêneros têm sido, frequentemente, isolados de amostras presentes no Deserto do Atacama (em regiões onde não há registros de chuva a décadas): *Cladosphialophora*, *Cladosporium*, *Leptosphaerulina*, *Alternaria*, *Ulocladium*, *Eupenicillium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Ascobolus*, *Monodictys*, *Periconia* e *Gibberella* (STERFLINGER *et al.*, 2012).

Cladosporium, *Fusarium* e *Penicillium* foram os gêneros obtidos nas três áreas de coleta, Antártica, Campos de Altitude e Deserto do Atacama, e tidos como cosmopolitas e presentes em diversos habitats. Os índices de diversidade (Fisher α , Margalef e Simpson) determinados para as três áreas estudadas foram diferentes variando de uma comunidade pra outra, sendo que os menores valores foram encontrados para comunidade fúngica presente no Campo de Altitude, seguido do Deserto do Atacama e Antártica. A diversidade, bem como a similaridade entre as comunidades fúngicas associadas aos líquens neste estudo foram maiores entre as amostras dos Campos de Altitude em relação as do Deserto do Atacama e Antártica. Alguns trabalhos demonstram que a diversidade de fungos presentes em ambientes tropicais é maior do que a diversidade dos ambientes temperados, polares ou áridos (SATYANARAYANA *et al.*, 2005, VAZ *et al.*, 2009, ROSA *et al.*, 2010, VIEIRA *et al.* 2012, BULL *et al.*, 2013). Desta forma, a diversidade, riqueza, dominância e similaridade encontradas podem ser reflexos das características ambientais extremas de cada área amostrada no presente estudo. Por outro lado, várias espécies ocorreram apenas em um dos habitats, incluindo algumas possíveis espécies novas, demonstrando que os talos de líquens podem ser reservatórios naturais de uma rica e diversa comunidade de fungos não liquenizados associados.

7.2 Bioprospecção dos fungos

Cerca de 800 metabólitos produzidos por líquens já foram descritos (MULLER, 2001), dentre os quais se destacam ésteres, terpenos, esteróides, antraquinonas, xantonas, entre outros (OKSANEN 2006). Por outro lado, poucos estudos foram conduzidos para avaliar a produção de metabólitos bioativos produzidos pela comunidade microbiana associada aos talos dos líquens.

No presente trabalho foram produzidos extratos etanólicos para avaliação da atividade antimicrobiana de todos os isolados fúngicos não liquenizados obtidos, bem

como dos fragmentos dos talos dos líquens estudados. Sabe-se que diferentes solventes podem ser utilizados para extração de metabólitos fúngicos, tais como acetato de etila (ROSA *et al.*, 2003), metanol (VAZ *et al.*, 2009), etanol (SANTIAGO *et al.*, 2011), diclorometano (GODINHO *et al.*, 2015), entre outros. Neste trabalho foi utilizado o etanol pelo fato do mesmo apresentar uma faixa de polaridade capaz de se ligar a moléculas de baixo peso molecular, boa penetração em meios de cultura sólido e baixa toxicidade comparado a outros solventes descritos.

Todos os extratos foram submetidos a triagem para determinação da atividade microbiana. Em seguida os extratos que apresentaram atividade diante dos alvos testados com porcentagem de inibição maior ou igual a 70% frente a pelo menos um dos alvos testados foram selecionados para determinação da CIM. Após os ensaios para determinação da CIM, alguns extratos não repetiram a atividade.

Entre os extratos ativos, o de *Leptosphaeria* sp. UFMGCB 8557 apresentou os melhores valores de CIM (125 µg/mL e 62,5 µg/mL) para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Esta espécie foi obtida de líquens antárticos e sabe-se que espécies deste gênero são produtoras de antifúngicos (MILLER & SAVARD 1989). O espectro de RMN ¹H do extrato de *Leptosphaeria* sp. UFMGCB 8557 foi considerado interessante, pois não apresentou em sua composição a presença de ácidos graxos.

Vinte e cinco extratos foram ativos contra *Candida krusei*, sendo que apenas o extrato de *Cladosporium* sp. 1 manteve atividade com valor de CIM de 250 µg/mL. A perda da atividade muitas vezes é relatada devido a alterações físico-químicas imperceptíveis durante o processo de armazenamento ou mesmo devido à instabilidade de algumas substâncias ativas presente no extrato bruto (VIEIRA *et al.* 2012).Dentre os extratos ativos na triagem e seletivos para *E. coli*, estão os de *Antarctomyces psychrotrophicus* e *Penicillium* sp. isolados do líquens da Antártica, bem como cinco isolados de *Alternaria* sp. 2, *Penicillium bussumense* e *Ulocladium dauci* obtidos dos líquens do Deserto do Atacama. *Antarctomyces psychrotrophicus* vem sendo obtido de diferentes substratos da Antártica, mas nenhum trabalho até o momento relatou a atividade antimicrobiana desta espécie; entretanto, *A. psychrotrophicus* já foi citado por produzir extrato atividade leishmanicida (SANTIAGO *et al.* 2011). Espécies de *Penicillium* coletados na Antártica já foram relatados quanto as atividades tripanosomicida, antifúngica (GODINHO *et al.* 2013, GONÇALVES *et al.* 2015), bem

como citotóxica e antimicrobiana (BRUNATI *et al.* 2009). Svahn *et al.* (2015) isolaram anfotericina B a partir do fungo *Penicillium nalgiovense* isolado de solo de pinguineira na ilha Paulete na Antártica.

O extrato de *Alternaria* sp. 2 apresentou atividade antibacteriana seletiva contra *E. coli*. Da mesma forma o extrato do fungo endofítico de orquídeas coletado no Campo de Altitude da Serra do Caraça *Alternaria* sp. apresentou atividade antibactericida contra *S. aureus* com CIM de 0,25 mg/mL (VAZ *et al.* 2009).

7.3 Astrobiologia

Embora o uso de fungos para estudos de radiação sejam escassos, a plasticidade desses organismos para suportar condições adversas, pelo fato de serem encontrados em ambiente extremos, os tornam bons alvos para estudos de astrobiologia. Olsson-Fancis & Cockell (2010) sugerem uma lista com alguns micro-organismos investigados quanto a capacidade dos mesmos de resistirem a ambientes extraterrestres. Esta lista é composta, principalmente, por muitas bactérias e poucos fungos. Dentre estas, destacam-se *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rh. rubra* e os controles *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces mitis* e *Zygosaccharomyces bailii*.

A análise dos nossos resultados se deu por contagem de UFC após os experimentos de radiação com UVC e UV ambiental. Segundo Horneck *et al.* (2008), a contagem direta de colônias é o método mais robusto para medir a capacidade de sobrevivência em culturas puras. Outro método que pode ser utilizado para quantificar a sobrevivência é a utilização de corantes fluorescentes (um exemplo é o corante SYTO[®] da Invitrogen) método este independente de cultura.

Neste trabalho, espécies do gênero *Rhodotorula* apresentaram amplo espectro de sobrevivência à radiação UVC e à UV ambiental. Dentre as espécies de *Rhodotorula* avaliadas, *Rh. laryngis* e *Rh. mucilaginosa* sobreviveram acima de 900 J/m² de UVC. Segundo Daly (2011). *Rhodotorula mucilaginosa* e *Rh. rubra* foram isoladas de ambientes extremos (XUE *et al.*, 2012) e são produtoras de carotenoides (LIBKIND *et al.*, 2011).

Vasileva-Tonkova *et al.* (2014) avaliaram a capacidade de resistência à UVC de cinco espécies de leveduras isoladas de líquens (*Cryptococcus terricola* e *Candida davisiana*), rocha (*Rhodospiridium kratochvilovae*), musgo (*Exophiala xenobiotica*) e *Deschampsia antarctica* (*Cryptococcus victoriae* e *Leucosporidiella muscorum*) na ilha

Galindez e maior resistência descrita foi de *Candida davisiana*, seguida de *Exophiala xenobiotica*, a resistência destas leveduras foi relacionada a presença de pigmentos.

Neste estudo foi utilizado a análise por espectroscopia de Raman, um método analítico simples para analisar a presença de pigmentos fotoprotetores (PULSCHEN 2015). Segundo Edwards *et al* (2005) esta técnica está sendo utilizada na busca de bioassinatura no contexto de Astrobiologia. Carotenóides e melaninas são conhecidos como pigmentos de protecção UV (Libkind et al., 2005; Libkind et al., 2009) uma vez que eles são capazes de absorver a radiação UV a comprimentos de onda diferentes, incluindo no UV-C (Wynn-Williams e Edwards, 2002). A ausência de banda de carotenóides pelo espectro Raman não é indicativo direto da ausência de pigmentos, mas pode indicar que sua quantidade é muito pequena, não sendo detectável por essa técnica. Adicionalmente, o sinal de fundo (fluorescência), pode, em alguns casos, mascarar essas bandas. Mas, de qualquer forma, a presença dessas bandas é um indicativo de presença desse pigmento fotoprotetor em quantidades significativas nas amostras (PULSCHEN 2015).

Os isolados de leveduras estudados neste trabalho vieram de associação com líquens presentes na Antártica e foram testados quanto a sua sobrevivência à radiação sob a forma de colônias puras e em condições laboratoriais, o que difere do ambiente no qual elas estão adaptadas e associadas, sendo difícil relacionar com resultados de culturas mistas e ou de resistência de líquens. Os líquens têm sido estudados quanto sua capacidade de resistir à exposições à radiações (DE VERA *et al.*, 2010), à simulações espaciais (DE VERA *et al.*, 2013) e ao ambiente espacial (SANCHO *et al.*, 2007). Alguns trabalhos de astrobiologia para estudo de comunidade realizaram investigações *in situ*, expondo a comunidade microbiana em amostras ambientais (PAULINO-LIMA *et al.*, 2013), sendo que expor a comunidade nos fornece informações sobre as necessidades fisiológicas de sobrevivência microbiana de maneira mais precisa (OLSSON-FANCIS & COCKELL 2010). Uma abordagem ideal seria a utilização de ambos, comunidade e técnicas de cultura pura.

CONCLUSÕES

Poucos estudos a respeito das relações ecológicas de comunidades microbianas presentes em talos de líquens, presentes em ambientes extremos, foram realizados até o momento. As comunidades de fungos cultiváveis associados a líquens presentes na Antártica, Campo de Altitude e Deserto do Atacama mostraram-se ricas e diversas, as quais incluíram espécies cosmopolitas, bem como endêmicas e novas. Esta elevada diversidade pode ser explicada pela plasticidade dos micro-organismos em adaptarem os mais diversos habitat assim como pelo hospedeiro, neste estudo os talos dos líquens, representar um “micro-habitat” favorável para a microbiota neles associados;

No presente trabalho ocorreu uma grande abundância de isolados de *Antarctomyces psychrotrophicus* em amostras de líquens da Antártica, este fungo é descrito como endêmico para Antártica. Desta forma, os talos dos líquens antárticos podem representar o habitat natural desta espécie na Antártica. Entretanto, mais estudos ecológicos são necessários para confirmar esta suposição.

Foram detectadas 86 possíveis espécies novas associadas aos talos dos líquens dos diferentes ecossistemas estudados, o que demonstra que este micro-habitat pode ser considerado um *hotspot* de biodiversidade de comunidades microbianas. No entanto, a utilização de outras análises morfológicas, fisiológicas e moleculares por meio do sequenciamento de outras regiões tornam-se necessárias para a conclusão da identificação de alguns grupos taxonômicos;

Alguns táxons foram capazes de produzir substâncias bioativas e a análise química de seus extratos demonstraram que eles podem ser fontes de metabólitos bioativos. Além disso, alguns táxons foram relatados pela primeira vez como produtores de substâncias bioativas;

Algumas espécies de leveduras obtidas dos talos dos líquens demonstraram resistência frente a radiações UVC e UV ambiental, as quais podem representar promissores modelos eucariotos para estudo em astrobiologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFAST-EUCAST - Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. Rodríguez-TUDELA, J. L.; BARCHIESI, F.; BILLE, J.; CHRYSANTHOU, E.; CUENCAESTELLA, M.; DENNING, D.; DONNELLY, J. P.; DUPONT, B.; FEGELER, W.; MOORE, C.; RICHARDSON, M.; VERWEIJ, P. E. Method for determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v, 9, p. 1-8, 2002.
- AGOSTA S.J. & KLEMENS J.A. Ecological fitting by phenotypically flexible genotypes: implications for species associations, community assembly and evolution. *Ecology Letters*, v.11, p. 1123–1134, 2008.
- AGUIAR, L.M.S.; MACHADO, R.B. & MARINHO-FILHO, J. A diversidade biológica do Cerrado. p. 17-40. In L.M.S. AGUIAR & A.J.A. CAMARGO, (eds.). *Cerrado ecologia e caracterização*. Embrapa, Planaltina – DF, 2004.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. *New York: John Wiley*, ed. 4, p. 869, 1996.
- ARENAL, F.; PLATAS, G.; PELÁEZ, F. Two new *Preussia* species defined based on morphological and molecular evidence. *Fungal Diversity*, V.20, P. 1-15, 2005.
- ARENZ, B. E.; HELDA, B. W.; JURGENSA, J. A.; FARRELLB, R. L.; BLANCHETTE, R. A. Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 38, p. 3057-3064, 2006.
- ARENZ, B. E. & BLANCHETTE, R. A. Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 43, p. 308-315, 2011.
- ARRHEIUS, S. Die Verbreitung des Lebens im Weltenraum. *Umschau* v. 7, p. 481-485, 1999.
- BAGLIONI, P.; SABBATINI, M.; HORNECK, G. Astrobiology experiments in low Earth orbit: facilities, instrumentation and results. In *Complete Course of Astrobiology*, edited by G. Horneck and P. Rettberg, Wiley VCH, Weinheim, p. 273–319, 2007.

- BAKYS, R.; VASAITIS, R.; BARKLUND, P.; IHRMARK K.; STENLID, J. Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in declining *Fraxinus Excelsior*. *Plant Pathology*, v. 58, p. 284-292, 2009.
- BEN-AMOTZ, A. & AVRON, M. *Dunaliella bardawil* can survive especially high irradiance levels by the accumulation of b-carotene. *Trends Biotechnol*, v. 8, p.121–126, 1990.
- BENITES, V.M.; CAIAFA, A.N.; MENDONÇA, E.S.; SCHAEFFER, C.E.G.R. & KER, J.C. Solos e vegetação nos Complexos Rupestres de Altitude da Mantiqueira e do Espinhaço. *Revista Floresta e Ambiente*, v.10, p.76-85, 2003.
- BÉRDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*, v.58, p. 1–26, 2005.
- BILLI, D.; VIAGGIU, E.; COCKELL, C. S.; E.; RABBOW, C. S.; HORNECK,G.; ONOFRI, S. Damage Escape and Repair in Dried *Chroococcidiopsis* spp. from Hot and Cold Deserts Exposed to Simulated Space and Martian Conditions. *Astrobiology*, v. 11, n. 1, 2011.
- BOCH, S.; PRATI, D.; HESSENMO LLER,D.; SCHULZE,E.D.; FISCHER, M. Richness of lichen species, especially of threatened ones, is promoted by management methods furthering stand continuity. *PLOS ONE*, v.8(1), e55461, 2013.
- BRIDGE, P.D.; SPOONER, B.M. Non-lichenized Antarctic fungi: transient visitors or members of a cryptic ecosystem? *Fungal Ecology* , v. 5, p. 381–394, 2012.
- BRUNATI, M.; ROJAS, J. L.; SPONGA, F.; CICILIATO, I.; LOSI, D.; GÖTTLICH, E.; DE HOOG, S.; GENILLOUD, O.; MARINELLI, F. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. *Marine Genomics*, v. 2, p. 43-50, 2009.
- BUCKNER, F.S.; VERLINDE, C.L.M.J.; LA FLAMME ,A.C.; VAN VOORKHIS, W.C. Efficient Technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β - Galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.40, p. 2592-2597, 1996.
- BÜDEL, B.; SCHEIDEGGER C. Thallus morphology and anatomy. In: *Lichen Biology* (ed. T.H. Nash III). Cambridge University Press: 37-64, 1996.

- BULL, A.T; ASENJO, J. Microbiology of hyper-arid environments: recent insights from the Atacama Desert, Chile *Antonie van Leeuwenhoek*, v.103, p. 1173-1179, 2013.
- BUTINAR, L.; SANTOS, S.; SPENCER-MARTINS, I.; OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*, v. 244, p. 229–234, 2005.
- BUTLER, M. S.; BUSS, A. D. Natural products – The future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemical Pharmacology*, v.71, p. 919-929, 2006.
- CALLAHAN, H. L.; PORTAL, A. C.; DEVEREAUX, R.; GROGL, M. An axenic amastigota system for drug screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, p. 818-822, 1997.
- CANTRELL, S.A.; CASILLAS, L.; MOLINA, M. Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycological Research* , v.110, p. 962-970, 2006.
- CARVALHO, C. R.; GONÇALVES, V. N.; PEREIRA, C. B.; JOHANN, S.; GALLIZA, I. V.; ALVES, T. M. A.; RABELLO, A.; SOBRAL, M. E. G., ZANI, C. L.; ROSA, C.A.; ROSA, L. H. The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. *Symbiosis*, v. 57, 2012.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. *The Journal of tropical medicine and hygiene*, v. 42, p.181-184, 1967.
- CHRISTENSEN, M. A view of fungal ecology. *Mycologia*. v.81, p.1-19, 1989.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS (National Committee for 15 Clinical Laboratory Standards). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – NCCLS document M7-A6; 6 ed. Wayne, Pennsylvania- USA, 2003.
- COCKELL, C.S.; BRACK, A.; WYNN-WILLIAMS, D.D.; BAGLIONI, P.; BRANDSTÄTTER, F.; DEMETS, R.; EDWARDS, H.G.; GRONSTAL, A.L.; KURAT, G.; LEE, P.; OSINSKI, G.R.; PEARCE, D.A.; PILLINGER, J.M.; ROTEN, C.A.; SANCISI-FREY, S. Interplanetary transfer of photosynthesis: an

- experimental demonstration of a selective dispersal filter in planetary island biogeography. *Astrobiology*, v. 7, p. 1–9, 2008.
- COCKELL, C.S.; MCKAY, C.P.; WARREN-RHODES, K.; HORNECK, G. Ultraviolet radiation-induced limitation to epilithic microbial growth in and deserts - Dosimetric experiments in the hyperarid core of the Atacama Desert. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v.90, p.79-87, 2008.
- CONLEY, C.A.; ISHKHANOVA, G.; MCKAY, C.P.; CULLINGS, K. A Preliminary Survey of Non-Lichenized Fungi Cultured from the Hyperarid Atacama Desert of Chile. *Astrobiology*, v. 6, 2006.
- CRAGG, M. G.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry*, v. 77, p. 7-24, 2005.
- DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. *Current Opinion in Microbiology*, v. 11, p.525-531, 2008.
- DALSGAARD, P. W.; LARSEN, T. O.; FRYDENVANG, K.; CHRISTOPHERSEN, C. Psychrophilin A and cycloaspeptide D, novel cyclic peptides from the psychrotolerant fungus *Penicillium ribeum*. *Journal Natural Products*, v. 67, p. 878-881, 2004.
- DALY, M.J. Death by protein damage in irradiated cells. *DNA Repair*, v.11, p. 12-21, 2012.
- DE HOOG GS.; GOTTLICH E.; PLATAS G.; GENILLOUD O.; LEOTTA G.; VAN BRUMMELEN J Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. *Studies in Mycology*, v..51, p. 33–76, 2005.
- DE VERA, J-P.; MÖHLMANN, D.; BUTINA, F.; LOREK, A.; WERNECKE, R.; OTT, S. Survival potential and photo synthetic activity of lichens under Mars-like conditions: A laboratory study. *Astrobiology*, v.10, p.215–227, 2010.
- DE VERA, J-P.; SCHULZE-MAKUCH, D.; KHAN, A.; LOREK, A.; KONCZ, A.; DIEDRICH MÖHLMANN, D.; SPOHN, T. Adaptation of an Antarctic lichen to Martian niche conditions can occur within 34 days. *Planetary and Space Science*, 2013.
- DUARTE, A. W. F.; DAYO-OWOYEMI, I.; NOBRE, F. S.; PAGNOCCA, F. C.; CHAUD, L. C. S.; PESSOA, A.; FELIPE, M. G. A.; SETTE, L. D. Taxonomic

- assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples *Extremophiles*, v. 17, p.1023–1035, 2013.
- DUNCAN, S.; FARRELL, R.L.; THWAITES, J.M.; HELD, B.W.; ARENZ, B.E.; JURGENS J.A.; BLANCHETTE, R.A. Endoglucanase-producing fungi isolated from Cape Evans historic expedition hut on Ross Island, Antarctica. *Environmental Microbiology*, v.8, p.1212-1219, 2006.
- DUTRA, G. M.; RUBBIOLI, E. L.; HORTA, L. S. Gruta do Centenário, Pico do Inficionado (Serra da Caraça), MG. A maior e mais profunda caverna quartzítica do mundo, 2002. SIGEP 20. In: Schobbenhaus, C.; Campos, D. A.; Queiroz, E. 5 T.; Winge, M.; Berbert-Born, M. L. C. (Edit.) 2002. Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil. DNPM/CPRM - Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleobiológicos (SIGEP) – Brasília, 554 pp, 2002.
- EDWARDS, H.G., MOODY, C.D., JORGE VILLAR, S.E., WYNN-WILLIAMS, D.D. Raman spectroscopic detection of key biomarkers of cyanobacteria and lichen symbiosis in extreme Antarctic habitats: evaluation for Mars Lander missions. *Icarus*, v. 174: p. 560-571, 2005.
- ERICKSEN, G.E. The Chilean nitrate deposits. *American Scientist*. v.71, p. 366–374, 1983.
- ESPINEL-INGROFF, A.; Kerkering, T.M. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the *in vitro* susceptibility testing of filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, p. 393–394, 1991.
- FENDRIHAN, S.; BÉRCES,A.; LAMMER,H.; MUSSO,M.; RONTÓ,G.; POLACSEK,T. K.; HOLZINGER,A.; KOLB, C.; STAN-LOTTER, H. Investigating the Effects of Simulated Martian Ultraviolet Radiation on *Halococcus dombrowskii* and Other Extremely Halophilic Archaeobacteria. *Astrobiology*, v. 9, n. 1, 2009.
- FERRARA, M.A. Fungos Endofíticos. Potencial para a Produção de Substâncias Bioativas. *Revista Fitos*, v.2, n.1, p.73-79, 2006.
- FERREIRA, A. C. Characterization and radiation resistance of new isolates of *Rubrobacter radiotolerans* and *Rubrobacter xylanophilus*. *Extremophiles*, v.3, p. 235–238, 1999.
- FURBINO, L.E.; GODINHO, V.M.; SANTIAGO, I.F.; PELLIZARI, F.M.; ALVES, T.M.A.; ZANI, C.L.; JUNIOR, P.A.S.; ROMANHA, A.J.; CARVALHO, A.G.O.;

- GIL, L.H.V.G.; ROSA, C.A.; MINNIS, A.M.; ROSA, L.H.. Diversity Patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. *Microbial Ecology*, v.67, p. 775-787, 2014.
- GARCIA, V.; BRIZZIO, S.; LIBKIND, D.; BUZZINI, P.; VAN BROECK, M. Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiology Ecology*, v.59, p. 331-341, 2007.
- GARCIA, V.; BRIZZIO, S.; BROECK, M.R. Yeasts from glacial ice of Patagonian Andes, Argentina. *FEMS Microbiology Ecology*, v.82, p. 540–550, 2012.
- GESSLER, N. N.; EGOROVA, A. S.; BELOZERSKAYA, T. A. Melanin Pigments of Fungi under Extreme Environmental Conditions (Review) *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 50, No. 2, pp. 125–134, 2014.
- GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.1323–1330, 1995.
- GODINHO, V.M.; FURBINO, L.; SANTIAGO, I.F.; PELIZZARI, F.M.; YOKOYA, N.S.; PUPO, D.; DICLA, A.; ALVES, T.M.; JUNIOR, P.A.; ROMANHA, A.J.; ZANI, C.L.; CANTRELL, C.L.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *The ISME Journal*, v.7, p. 77-145, 2013.
- GODINHO, V.M.; VIVIAN N. GONÇALVES, V.N.; SANTIAGO, I.F.; FIGUEREDO, H.M.; VITORELI, G.A.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARBOSA, E. C.; OLIVEIRA, J.; ALVES, T.M.A.; ZANI, C.L.; JUNIOR, P.A.S.; MURTA, S.M.F.; ROMANHA, A.J.; KROON, E.G.; CANTRELL, C.L.; WEDGE, D.E.; DUKE, S. O.; ABBAS ALI, A.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H.. Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. *Extremophiles*, 2015.
- GOMES, J.; GOMES I.; STEINER, W. Thermolabile xylanase of the Antarctic yeast *Cryptococcus adeliae*: production and properties. *Extremophiles*, v.4, p. 227-235, 2000.
- GONÇALVES, V.N.; VAZ, A.B.M.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, v.82, p.459–471, 2012.

- GONÇALVES, V.N.; CAMPOS, L.S.; MELO, I.S.; PELLIZARI, V.H.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. *Penicillium solitum*: a mesophilic, psychrotolerant fungus present in marine sediments from Antarctica. *Polar Biology*, v. 36, p.1823–1831, 2013.
- GONÇALVES, V. N.; CARVALHO, C. R.; JOHANN, S.; MENDES, G.; ALVES, T. M.; ZANI, C. L.; JUNIOR, P. A. S.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; CANTRELL, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. *Polar Biology*, p. 1-10, 2015.
- GOSTINCAR, C.; GRUBE, M.; DE HOOG, S.; ZALAR, P. & GUNDE-CIMERMAN, N. Extremotolerance in fungi: evolution on the edge. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Ecology*, v. 71, p.02-11, 2010.
- GRIFFIN, D. W.; Atmospheric Movement of Microorganisms in Clouds of Desert Dust and Implications for Human Health. *Clinical Microbiology, Reviews* 20, v. 3, p. 459-477, 2007.
- GRISHKAN, I.; NEVO, E.; WASSER, S.P. Soil micromycete diversity in the hypersaline Dead Sea coastal area, Israel *Mycological Progress* v.2, p. 19–28, 2003.
- GUNDE-CIMERMAN, N.; SONJAK, S.; ZALAR, P.; FRISVAD, J. C.; DIDERICHSEN, B.; PLEMENITAS, A. Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Physics and Chemistry of the Earth*, v. 28, p. 1.273-1.278, 2003.
- HALAMA, P. & VAN HALUWIN, C. Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. *Bio Control*, v. 49, p. 95–107, 2004.
- HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity : the 1±5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, v.105, ed.12, p. 1422-1432, 2001.
- HENRÍQUEZ, M.; VERGARA, K.; NORAMBUENA, J.; BEIZA, A.; MAZA, F.; UBILLA, P.; ARAYA, I.; CHÁVEZ, R.; SAN-MARTÍN, A.; DARIAS, J.; DARIAS, M.J.; VACA, I. Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014.

- HORNECK, G. Responses of *Bacillus subtilis* spores to space environment: results from experiments in space. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, v. 23, p. 37–52, 1993.
- HORNECK, G.; STÖFFLER, D.; OTT, S.; HORNEMANN, U.; COCKELL, C. S.; MOELLER, R.; MEYER, C.; DE VERA, J. P.; FRITZ, J.; SCHADE, S.; ARTEMIEVA, N. A. Microbial Rock Inhabitants Survive Hypervelocity Impacts on Mars-Like Host Planets: First Phase of Lithopanspermia Experimentally Tested *Astrobiology*, v. 8, n. 1, 2008.
- HORNECK, G.; BÜCKER, H.; REITZ, G. Long-term survival of bacterial spores in space. *Advances in Space Research*, v. 14, p.41–45, 1994.
- HORNECK, G.; RETTBERG, P.; REITZ, G.; WEHNER, J.; ESCHWEILER, U.; STRAUCH, K.; PANITZ, C.; STARKE, V.; BAUMSTARK-KHAN, C. Protection of bacterial spores in space, a contribution to the discussion on panspermia. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, v. 31, p. 527–547, 2001.
- ISRAELI, E.; GITELMAN, J. & LIGHTHART, B. *Atmospheric Microbial Aerosol Theory and Application*. Chapman & Hall, New York, p. 166–192, 1994.
- JACQUES, N.; ZENOUCHE, A.; GUNDE-CIMERMAN, N.; CASAREGOLA, S. Increased diversity in the genus *Debaryomyces* from Arctic glacier samples *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 107, p. 487–501, 2015.
- JOSEPH, R. G. Life on Mars? Evidence for Moisture, Algae, Fungi, and Lichens on the Red Planet? *Cosmology*, v.17, p.1-31, 2014.
- JURADO, M.; LÓPEZ, M.J.; SUÁREZ-ESTRELLA, F.; VARGAS-GARCÍA, M.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, J.A.; MORENO, J. Exploiting composting biodiversity: Study of the persistent and biotechnologically relevant microorganisms from lignocellulose-based composting *Bioresource Technology*, v.162, p. 283–293, 2014.
- KAPPEN, L. Some aspects of the great success of lichens in Antarctica. *Antarctic Science*, v.72, ed.3, p.314-324, 2000.
- KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. *Dictionary of the Fungi*, 10th edn. CAB International, Wallingford, 2008.
- KOBAYASHI, R.; SAMEJIMA, Y.; NAKAJIMA, S.; KAWAI, K.; UDAGAWA, S. Studies on fungal products. XI: Isolation and structures of novel cyclic pentapeptides

- from *Aspergillus* sp. NE-45. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 35, p. 1347-1352, 1987.
- KOCHKINA, G.; IVANUSHKINA, N.; OZERSKAYA, S.; CHIGINEVA, N.; VASILENKO, O.; FIRSOV, S.; SPIRINA, E.; GILICHINSKY, D. Ancient fungi in Antarctic permafrost environments. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 82, p. 501-509, 2012.
- KOCHKINA, G.A.; OZERSKAYA, S.M.; IVANUSHKINA, N. E.; CHIGINEVA, N. I.; VASILENKO, O. V.; SPIRINA, E.V.; GILICHINSKII, D.A. Fungal Diversity in the Antarctic Active Layer. *Microbiology*, v. 83, n. 1–2, pp. 94–101, 2014.
- KOGEJ, T.; CENE, G.; VOLKMANN, M.; GORBUSHINA, A. A.; GUNDECIMERMAN, N. Mycosporines in Extremophilic Fungi – Novel Complementary Osmolytes? *Environmental Chemistry*, v. 3, p. 105-110, 2006.
- KOSTADINOVA, N.; KRUMOVA, E.; TOSI, S.; PASHOVA; ANGELOVA, M. Isolation and identification of filamentous fungi from Island Livingston, Antarctica. *Biotechnology & biotechnological*, v. 23, p. 267-270, 2009.
- KRANNER, I.; CRAM, W. J.; ZORN, M.; WORNIK, S.; YOSHIMURA, I.; STABENTHEINER, E.; PFEIFHOFER, H. W. Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proceedings of the National Academy of Sciences -PNAS*, v. 102, no. 8, p. 3141-3146, 2005.
- KRISTJANSSON J.K & HREGGVIDSSON, G.O. Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 11, p.17-25, 1995.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. *The yeast, a taxonomic study*, 5th edn. Elsevier, Amsterdam, 2011.
- LACHANCE, M. A.; BOWLES, J. M.; STARMER, W. T.; BARKER, J. S. F. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new yeast species from Australian Hibiscus flowers. *Canadian Journal Microbiology*. v. 45, p. 172-177, 1999.
- LIBKIND, D.; SOMMARUGAB, R.; ZAGARESEC, H.; VAN BROECK, M. Mycosporines in carotenogenic yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 28, p. 749-754, 2005.

- LIBKIND, D., MOLINE, M., SAMPAIO, J.P., VAN BROOCK, M. Yeasts from high-altitude lakes: influence of UV radiation. *FEMS Microbiology Ecology* v. 69: p. 353-362, 2009.
- LIECKFELDT, E., MEYER, W.; BORNER, T., Rapid identification and differentiation of yeast by DNA and PCR fingerprinting. *Journal. Basic Microbiology*, v. 33, p. 413-426, 1993.
- LLAMES, M. E.; VINOCUR, A. Phytoplankton structure and dynamics in a volcanic lake in Deception Island (South Shetland Islands, Antarctica). *Polar Biology*, v. 30, p. 849-857, 2007.
- LOPES, M. D. B.; SODEN, A.; HENSCHKE, P.A.; LANGRIDGE, P. PCR Differentiation of Commercial Yeast Strains Using Intron Splice Site Primers. *Applied and Environmental Microbiology*, p.4514-4520, 1996.
- LOPES, M. D. B.; SODEN, A.; MARTENS, A.L.; HENSCHKE, P.A.; LANGRIDGE, P. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 48, p.279-286, 1998.
- LOQUE, C. P.; MEDEIROS, A. O.; PELLIZZARI, F. M.; OLIVEIRA, E. C.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. *Polar Biology*, v. 33, p. 641-648, 2010.
- MAGAN, N. Fungi in Extreme Environments. In: Kubicek, C.P. & Druzhinina, I.S. (Eds.) Environmental and Microbial Relationships, *The Micota IV*. Springer-Verlag, Berlin, ed. 2, p. 85- 100, 2007.
- MALKUS, A.; CHANG, P.F.L.; ZUZGA, S.M.; CHUNG, K.R.; SHAO, S; CUNFER, B. M.; ARSENIUK, E.; UENG, P.P. RNA polymerase II gene (RPB2) encoding the second largest protein subunit in *Phaeosphaeria nodorum* and *P. avenaria*. *Mycological Research*, v. 110, p. 1152-1164, 2006.
- MARCELLI, M. P. Estudo da diversidade de espécies de fungos liquenizados do Estado de São Paulo. *Seção de Micologia e Liquenologia*, v.1, p. 1- 27 , 1997.
- MASSIMO, N.; NANDI DEVAN, M.M.; ARENDT, K.R.; WILCH, M.H.; RIDDLE, J.M.; FURR, S.H.; STEEN, C.; U'REN, J.M.; SANDBERG, D.C.; ARNOLD, A.E. Fungal Endophytes in Aboveground Tissues of Desert Plants: Infrequent in Culture, but Highly Diverse and Distinctive Symbionts. *Microbial Ecology*, 2015.

- MAUCHLINE, N.; HALLETT, I.; HILL, G.; CASONATO, S. Process of infection of armored scale insects (Diaspididae) by an entomopathogenic *Cosmospora* sp., *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 108, p. 46-51, 2011.
- MCGENITY, T.J.; GEMMELL, R.T.; GRANT, W.D.; STAN-LOTTER, H. Origins of halophilic micro-organisms in ancient salt deposits (MiniReview). *Environmental Microbiology*, v.2, p. 243–250, 2000.
- MICHÁN, C.; MARTÍNEZ, J.L.; ALVAREZ, M.; TURK, M.; SYCHOROVA, H.; RAMOS, J. Salt and oxidative stress tolerance in *Debaryomyces hansenii* and *Debaryomyces fabryi*. *FEMS Yeast Research*, v. 13,p. 180–188, 2013.
- MOLINE, M.; LIBKIND, D.; DIEGUEZ, M.D.; VAN BROOCK, M. Photoprotective role of carotenoids in yeasts: Response to UV-B of pigmented and naturally-occurring albino strains. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 95, p.156-161, 2009.
- MÖLLER, C.; DREYFUSS, M.M. Microfungi from Antarctic lichens, mosses and vascular plants. *Mycology*, v. 88, p.922–933, 1996.
- MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal National Cancer Institute*, v. 83, p.757-766, 1991.
- MULLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.56, p. 9-16, 2001.
- NONZOM, S.; SUMBALI, G. Fate of mitosporic soil fungi in cold deserts: A review. *American International Journal of Research in Formal, Applied & Natural Sciences*, V. 9, pp. 01-09, 2015.
- OARG, A. Life in extreme environments. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 9, p. 1-10, 2009.
- OKSANEN, I. Ecological and biotechnological aspects of lichens. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 73, p. 723-734, 2006.
- OLSSON-FRANCIS, K. & COCKELL, C.S. Experimental methods for studying microbial survival in extraterrestrial environments *Journal of Microbiological Methods*, v.80, p. 1–13, 2010.

- ONOFRI S.; SELBMANN L.; ZUCCONI L.; PAGANO S. Antarctic microfungi as models for exobiology. *Planetary and Space Science*, v.52, p. 229-237, 2004.
- ORTIZ, R.; NAVARRETE, H.; NAVARRETE, J.; PÁRRAGA, M.; CARRASCO, I.; DE LA VEGA, E.; ORTIZ, M.; HERRERA, P.; BLANCHETTE, R. A. Deterioration, decay and identification of fungi isolated from wooden structures at the Humberstone and Santa Laura saltpeter works: A world heritage site in Chile. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 86, p. 309-316, 2014.
- PATHAN, A.A.K.; BHADRA, B.; • BEGUM, Z.; SHIVAJI, S. Diversity of Yeasts from Puddles in the Vicinity of Midre Love´nbreen Glacier, Arctic and Bioprospecting for Enzymes and Fatty Acids *Current Microbiology* , v. 60, p. 307-314, 2010.
- PAUDEL, B.; BHATTARAI, H-D.; LEE, J.S.; HONG, S.G.; SHIN,H.W.; YIM,J.H. Antibacterial Potential of Antarctic Lichens against Human Pathogenic Gram-positive Bacteria *Polar Biology*, v.31, p.605-608,2008.
- PAUDEL, B.; BHATTARAI, H-D.; LEE, J.S.; HONG, S.G.; SHIN,H.W.; YIM,J.H. Antioxidant activity of polar lichens from King George Island (Antarctica). *Natural Product Communications*, v.26, p. 44-71, 2009.
- PAULINO-LIMA, I.G.; AZUA-BUSTOS, A.; VICUNA, R.; GONZALEZ-SILVA, C.; SALAS, L.; TEIXEIRA, L. ET AL. Isolation of UVC-Tolerant Bacteria from the Hyperarid Atacama Desert, Chile. *Microbial Ecology*, v. 65, p.325-335, 2013.
- PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. *Advances in Applied Microbiology*, v.44, p.1-80, 1997.
- PERSOH, D.; MELCHER, M.; FLESSA, F.; RAMBOLD, G. First fungal community analyses of endophytic ascomycetes associated with *Viscum album* ssp. *austriacum* and its host *Pinus sylvestris*. *Fungal Biology* , v.114, p. 585-596, 2010.
- PLEMENITAS, A.; LENASSI, M.; KONTE, T.; KEIZAR, A.; ZAJC, J.; GOSTINCAR, C.; GUNDE-CIMERMAN, N. Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi:a molecular perspective. *Frontiers in Microbiology*, v.5, 2014.
- PULSCHEN, A.A.; RODRIGUES, F.; DUARTE, R.T.D.; ARAUJO, G.G.; SANTIAGO, I.F.; PAULINO-LIMA, I.G.; ROSA, C.A.; KATO, M.J.; PELLIZARI, V.H.; GALANTE, D. UV-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area

- on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology. *Microbiology Open*, 2015.
- RAVIKUMAR, M.; SRIDHAR, K.R.; THANGARAJU SIVAKUMAR, T.; KARAMCHAND, K.S.; SIVAKUMAR, N.; VELLAIYAN, R. Diversity of filamentous fungi on coastal woody debris after tsunami on the southeast coast of India *Czech Mycology*, v. 61, p. 107–115, 2009.
- ROSA, L.H.; MACHADO, K.M.G.; JACOB, C.C.; CAPELARI, M.; ROSA, C.A.; ZANI, C.L. Screening of brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 98, p.967-974, 2003.
- ROSA, L. H.; VAZ, A. B. M.; CALIGIORNE, R. B.; CAMPOLINA, S.; ROSA, C. A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*). *Polar Biology*, v 32, p. 161-167, 2009.
- ROSA, L. H.; VIEIRA, M. L. A.; SANTIAGO, I. F.; ROSA, C. A. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica. Federation of European Microbiological Societies (*FEMS*) *Microbiology Ecology*, v. 73, p.178-189, 2010.
- ROSA, L.H.; TABANCA, N.; TECHEN, N.; WEDGE, D.E.; PAN, Z.; BERNIER, U.R.; BECNEL, J.J.; AGRAMONTE, N.M.; WALKER, L.A.; MORAES, R.M. Diversity and Biological Activities of Endophytic Fungi Associated with Micropropagated Medicinal Plant *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *American Journal of Plant Sciences*, v. 3, p. 1105-1114, 2012a.
- ROSA, L.H.; TABANCA, N.; TECHEN, N.; PAN, Z.; WEDGE, D. E.; MORAES, R.M. Antifungal activity of extracts from endophytic fungi associated with *Smallanthus* maintained in vitro as autotrophic cultures and as pot plants in the greenhouse. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 58, p. 1202-1211, 2012b.
- ROTHSCHILD, L. J. & MANCINELLI, R. L. Life in extreme environments. *Nature*, v.409, p.1092-1101, 2001.
- RUIBAL, C.; PLATAS, G.; BILLS, G.F. High diversity and morphological convergence among melanised fungi from rock formations in the Central Mountain System of Spain. *Persoonia*, v.21, p.93-110, 2008.
- RYAN, G.S.; HARPER, D.A.T.; WHALLEY, J.S.; PALSTAT, *Statistics for palaeontologist*. Chapman & Hall., 2005.

- SALAR, R.K.; ANEJA, K.R. Thermophilous fungi from temperate soils of northern India. *Journal of Agricultural Technology*, v. 2, p. 49-58, 2006.
- SALEEM, M.; NAZIR, M.; AKHTAR, N.; ONOCHA, P. A.; RIAZ, N.; JABBAR, A.; SHAIQ 25 ALI, M. New phthalates from *Phyllanthus muellerianus* (Euphorbiaceae). *Asian Journal of Natural Products Research*, v. 11, p. 974-977, 2009.
- SANCHO, L. G. & PINTADO, A. Evidence of high annual growth rate for lichens in the maritime Antarctic. *Polar Biology*, v.27, p. 312-319, 2004.
- SANCHO, L. G.; LA TORRE, R. DE; HORNECK, G.; ASCASO, C.; LOS RIOS, A. DE; PINTADO, A.; WIERZCHOS, J.; SCHUSTER, M. Lichens Survive in Space: Results from the 2005 LICHENS Experiment. *Astrobiology*, v. 7, n. 3, 2007.
- SANCHO,L.G.; LA TORRE,R. DE; PINTADO, A. Lichens, new and promising material from experiments in astrobiology. *Fungal Biology Reviews*, v. 22, p. 103 – 109, 2008.
- SANTIAGO, I.F.; ALVES, T.M.A.; RABELLO, A.; SALES JUNIOR, P.A.; ROMANHA, A.J.; ZANI, C.L.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Extremophiles*, v.16, p. 95-103, 2011.
- SATYANARAYANA, T.; RAGHUKUMAR, C.; SHIVAJI, S. Special section: microbial diversity current science, *Extremophilic microbes: Diversity and perspectives*, v. 89. 2005.
- SCHMIDT, S. K.; NAFF, C. S.; LYNCH, R. C. Fungal communities at the edge: Ecological lessons from high alpine fungi. *Fungal Ecology*, v. 5, p. 443-452, 2012.
- SEO, C., SOHN, J.H., PARK,S.M., YIM, J.H., LEE, H.K.,OH,H. Usimines A-C, Bioactive Usnic Acid derivative from the Antarctic Lichen *Stereocaulon alpinum*. *Natural Product Communications*, v.26, p. 44-71, 2008.
- SINGH, S. M.; PUJA, G.; BHAT, D. J. Psychrophilic fungi from Schirmacher Oasis, East Antarctica. *Current Science*, v. 90, p. 1.388-1392, 2006.
- STCHIGEL, A.; CANO, J.; MAC CORMACK, W., GUARRO, J. *Antarctomyces psychrotrophicus* gen. et sp. nov., a new ascomycete from Antarctica. *Mycological Research*, v. 3, p. 377-382, 2001.

- STERFLINGER, K.; TESEI, D.; ZAKHAROVA, K. Fungi in hot and cold deserts with particular reference to microcolonial fungi. *Fungal Ecology*, p. 1-10, 2012.
- STROBEL, G.; YANG, X. S.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R. S.; HESS, W. M. Taxol from Pestalotiopsis microspora of Taxus wallachiana. *Microbiology*, v. 142, p. 435-440, 1996.
- STROBEL, G.; DAISY B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiol. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.67, p. 491-502, 2003.
- SVAHN, K.S.; CHRYSANTHOU, E.; OSLSSEN, B.; BOHLIN, L.; GORANSSON, U. Penicillium nalgioense Laxa isolated from Antarctica is a new source of the antifungal metabolite amphotericin B. *Fungal Biology and Biotechnology*, p.1-8 2015. STROBEL, G. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, v.5, p.535-544, 2003.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 24, p. 1596-1599, 2007.
- TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, v. 18, p. 448-459, 2001.
- TAYUNG, K.; SARKAR, M.; PARAN BARUAH, P. Endophytic Fungi Occurring in Ipomoea carnea Tissues and their *Antimicrobial Potentials Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 55, n. 5, p. 653-660, 2012.
- TSUJI, M.; FUJIU, S.; XIAO, N.; HANADA, Y.; KUDOH, S.; KONDO, H.; TSUDA, S.; 20 HOSHINO, T. Cold adaptation of fungi obtained from soil and lake sediment in the Skarvsnes ice-free area, Antarctica. *FEMS microbiology letters*, v. 346, p. 121-130, 2013.
- TURCHETTI, B.; GORETTI, M.; BRANDA, E.; DIOLAIUTI, G.; D'AGATA, C.; SMIRAGLIA, C.; ONOFRI, A.; BUZZINI, P. Influence of abiotic variables on culturable yeast diversity in two distinct Alpine glaciers. *FEMS Microbiology Ecology*, v.86, p. 327-340, 2013.
- TYRELL, R. M. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants* (ed. Sies, H.) p. 57-83, 1991.

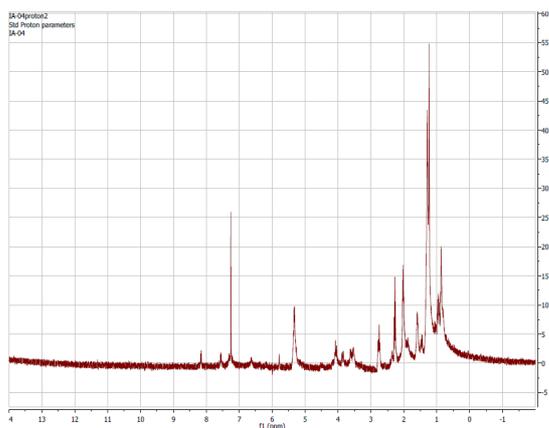
- VACA, I.; FAUNDEZ, C.; MAZA, F.; PAILLAVIL, B.; HERNANDEZ, V.; ACOSTA, F.; LEVICÁN, G.; MARTÍNEZ, C.; CHÁVEZ, R. Cultivable psychrotolerant yeasts associated with Antarctic marine sponges. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, p.183-189, 2013.
- VASILEVA-TONKOVA, E.; ROMANOVSKAYA, V.; GLADKA, G.; GOULIAMOVA, D.; TOMOVA, I.; STOILOVA-DISHEVA, .; TASHYREV, O. Ecophysiological properties of cultivable heterotrophic bacteria and yeasts dominating in phytocenoses of Galindez Island, maritime Antarctica. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, p.1387-1398, 2014.
- VAZ, A. B. M.; MOTA, R. C.; BOMFIM, M. R. Q.; VIEIRA, M. L. A.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with Orchidaceae in Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, v.55, p. 1381-1391, 2009.
- VAZ, A. B. M.; ROSA L. H.; VIEIRA, M. L. A.; GARCIA, V.; BRANDÃO, L. R.; TEIXEIRA, L. C. R. S.; MOLINÉ, M.; LIBKIND, D.; MARIA, VAN B.; ROSA C. A. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective 1 compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2011.
- VERMA, N.; BEHERA, B. C.; SONONE, A.; MAKHIJA, U. Lipid peroxidation and tyrosinase inhibition by lichen symbionts grown *in vitro*. *African Journal of Biochemistry Research*, v. 2, ed. 12, p. 225-231, 2008.
- VICTORIA, F.D.C.; ALBUQUERQUE, M. P.D.; PEREIRA, A. B.; SIMAS, F. N.B.; SPIELMANN, A.A.; SCHAEFER, C.E.G.R. Characterization and mapping of plant communities at Hennequin Point, King George Island, Antarctica. *Polar Research*, 2013.
- VIEIRA, M.L.A.; HUGHES, A.F.S.; GIL, V.B.; VAZ, A.B.M.; ALVES, T.M.A; ZANI, C.L.; ROSA, C.A; ROSA, L.H. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell.(Solanaceae). *Canadian Journal of Microbiology*, v.58, p.54-66. 2012.
- VINCENT, W.F. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. *Antarctic Science*, v.12, p. 374-385, 2000.

- VRABLIKOVA ,H.; MCEVOY,M.; SOLHAUG,K. A.; BARTA´K ,M.; GAUSLAA, Y. Annual variation in photoacclimation and photoprotection of the photobiont in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 83, p.151–162, 2006.
- WAGNER, H. & BLADT, S. *Plant Drug Analysis, a Thin Layer Chromatography Atlas*, second ed. Springer-Verlag, Berlin,1996.
- WEDGE, D. E. & KUHAJEK, J. M. A microbioassay for fungicide discovery. *South. Assoc. Agric. Sci. Bull. Biochem. Biotechnol.* v. 11, p.1-7, 1998.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press, p. 315-322, 1990.
- WILSON, Z. E. & BRIMBLE, M. A. Molecules derived from the extremes of life. *Natural Productus Report*, v. 26, p. 1-140, 2009.
- WOLFE-SIMON, F.; BLUM, J.S.; KULP,T.R.; GORDON,G.W.; HOEFT,S.E.; PETT-RIDGE,J.; STOLZ,J.F.; WEBB,S.M.; WEBER,P.K.; DAVIES,P.C.W.; ANBAR, A.D.; OREMLAND, R.S. A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus. *Scienceexpress*, p. 1-9,2011.
- WYNN-WILLIAMS, D., EDWARDS, H.M. Environmental UV Radiation: Biological Strategies for Protection and Avoidance. In *Astrobiology*. Horneck, G., and Baumstark-Khan, C. (eds): Springer Berlin Heidelberg, pp. 245-260, 2002.
- ZAKHAROVA, K.; MARZBAN, G.; DE VERA, J.-P.; LOREK, A.; STERFLINGER, K. Protein patterns of black fungi under simulated Mars-like conditions. *Scientific Reports*, v. 4, 2014.
- ZHAN, F.; HE, Y.; ZU, Y.; LI, T.; ZHAO, Z. Characterization of melanin isolated from a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, p.2483–2489, 2011.
- ZHANG, Y.; LIU, S.; LIU, H.; LIU, X.; CHE, Y. Cycloaspeptides F and G, Cyclic Pentapeptides from a Cordyceps-Colonizing Isolate of *Isaria farinosa*. *Journal Natural Products*, v. 72, p. 1364-1367, 2009.

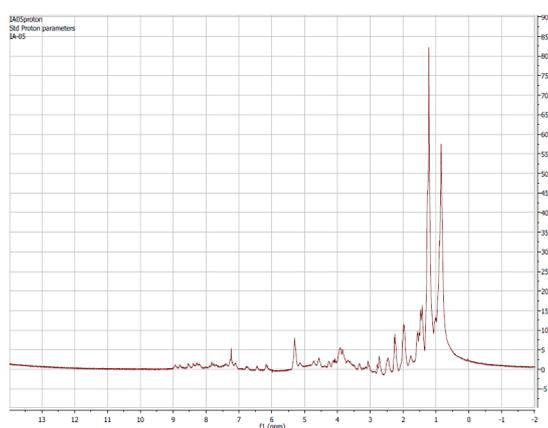
ZHANG,X.; HUA, M.; SONG,C.; CHI,Z. Occurrence and Diversity of Marine Yeasts in Antarctica Environments. *Journal of Ocean University of China*, v.11 (1), p. 70-74, 2012.

ZUCCONI, L.; SELBMANN, L.; BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; GUGLIELMIN, M.; FRISVAD, J. C.; ONOFRI, S. Searching for eukaryotic life preserved in Antarctic permafrost, *Polar Biology*, v.35, p. 749–757, 2012. ZHANG, Y.; LIU, S.; LIU, H.; LIU, X.; CHE, Y. Cycloaspeptides F and G, Cyclic Pentapeptides from a Cordyceps-Colonizing Isolate of *Isaria farinosa*. *Journal Natural Products*, v. 72, p. 1364-1367, 2009.

8 ANEXOS

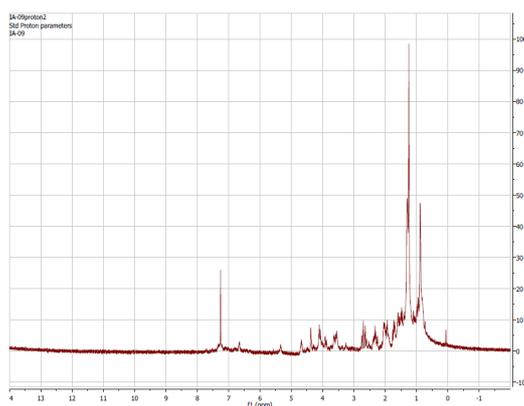


Extrato do fungo *Antarctomyces psychrotrophicus* UFMGCB 8504

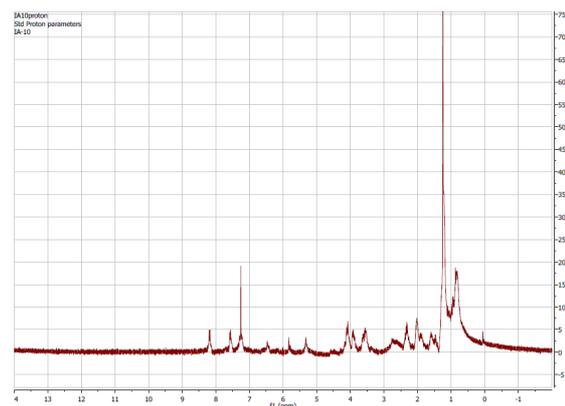


Extrato do fungo *Leptosphaeriaceae* sp. UFMGCB 8557

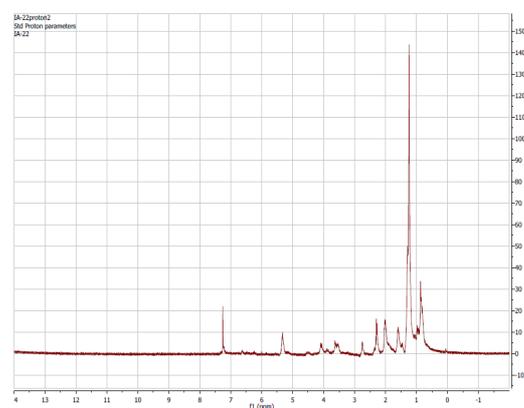
Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) H¹ dos extratos de fungos da Antártica.



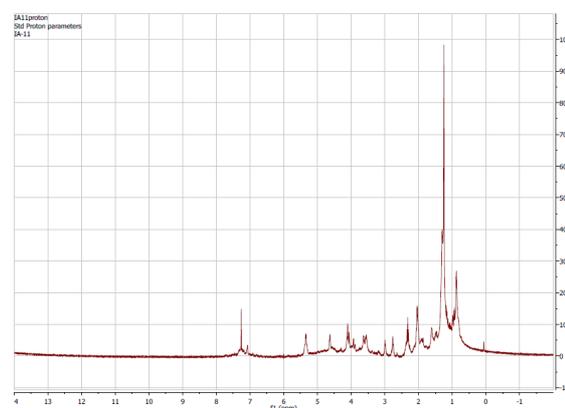
Penicillium sp.2 UFMGCB 8766



Penicillium sp.1 UFMGCB 8778



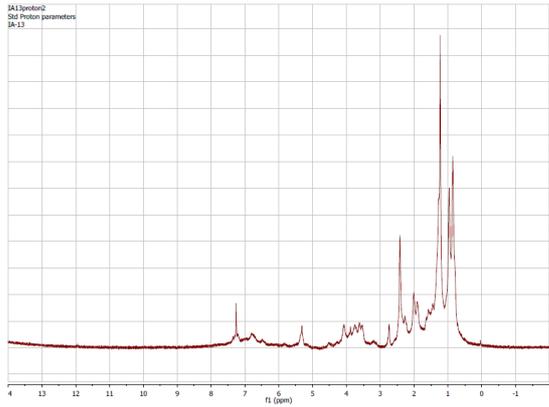
Bipolaris cf. *drechsleri* UFMGCB 8948



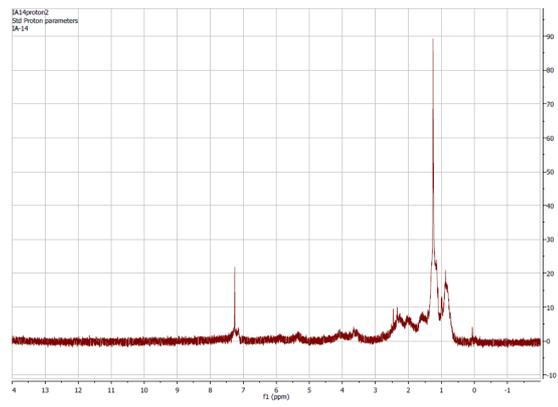
Pestalotiopsis australasiae UFMGCB 9027

Perfis de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) dos fungos isolados dos líquens

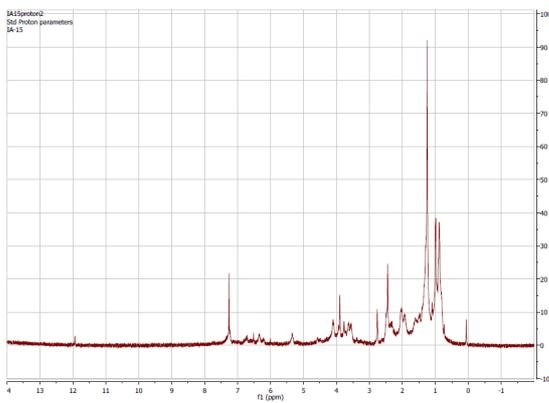
coletados no Campos de Altitude.



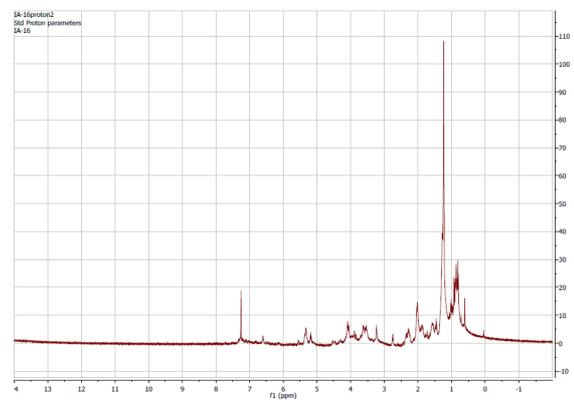
Alternaria sp.2 UFMGCB 9267



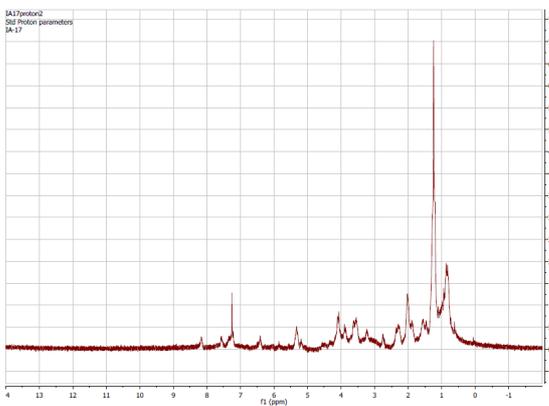
Alternaria sp.2 UFMGCB 9313



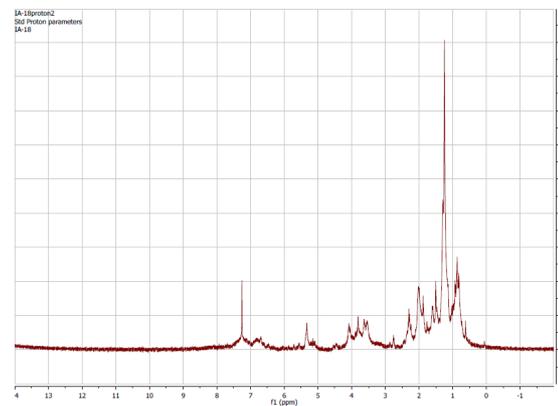
Alternaria sp.2 UFMGCB 9319



Penicillium rudallense UFMGCB 9336



Penicillium bussumense UFMGCB 9389



Ulocladium dauci UFMGCB9421

Análise em Ressonância Magnética Nuclear (RMN) dos extratos fungicos dos isolados do Deserto do Atacama.

9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Atividades desenvolvidas no período de 04/2011 a 04/2015

Participação e Apresentação de trabalho:

1. SPASA 2011 - Sao Paulo School of Advanced Astrobiology – São Paulo SP;
Fungal community associated with lichen in extreme ecosystems: diversity, bioprospecting and use as models in studies of astrobiology.
2. Congresso Latino Americano 2012 – Santos SP.
Atividade antimicrobiana de fungos extremófilos associados a líquens presentes na Antártica e no Deserto do Atacama.
3. XXXIII SCAR 2014 Open Science Conference – Auckland NZ;
Fungal communities associated with Antarctic lichens: taxonomy, diversity, bioprospection of bioactive compounds and astrobiology studies.

Artigos publicados:

1. GODINHO, V.M.; FURBINO, L.; **SANTIAGO, I.F.**; PELIZZARI, F.M.; YOKOYA, N.S.; PUPO, D.; DICLA, A.; ALVES, T.M.; JUNIOR, P.A.; ROMANHA, A.J.; ZANI, C.L.; CANTRELL, C.L.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *The ISME Journal*, v.7, p. 77-145, 2013.
Fator de Impacto 9,302
2. FURBINO, L.E.; GODINHO, V.M.; **SANTIAGO, I.F.**; PELLIZARI, F.M.; ALVES, T.M.A.; ZANI, C.L.; JUNIOR, P.A.S.; ROMANHA, A.J.; CARVALHO, A.G.O.; GIL, L.H.V.G.; ROSA, C.A.; MINNIS, A.M.; ROSA, L.H.. Diversity Patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. *Microbial Ecology*, v.67, p. 775-787, 2014. **Fator de Impacto 2,973**
3. GODINHO, V.M.; VÍVIAN N. GONÇALVES, V.N.; **SANTIAGO, I.F.**; FIGUEREDO, H.M.; VITORELI, G.A.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARBOSA, E. C.; OLIVEIRA, J.; ALVES, T.M.A.; ZANI, C.L.; JUNIOR, P.A.S.; MURTA,

- S.M.F.; ROMANHA, A.J.; KROON, E.G.;CANTRELL, C.L.;WEDGE, D.E.; DUKE, S. O.; ABBAS ALI , A.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H..Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. *Extremophiles*, 2015. **Fator de Impacto 2,306**
4. PULSCHEN, A.A.; RODRIGUES, F.; DUARTE, R.T.D.; ARAUJO, G.G.; **SANTIAGO, I.F.**; PAULINO-LIMA, I.G.; ROSA, C.A.; KATO, M.J.; PELLIZARI, V.H.; GALANTE, D. UV-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology. *Microbiology Open*, 2015. **Fator de Impacto 2,213**
5. **SANTIAGO, I.F.**; SOARES, M.A.; ROSA, C.A.; LUIZ H. ROSA, L.H. Lichensphere: a protected natural microhabitat of the non-lichenised fungal communities living in extreme environments of Antarctica. *Extremophiles*, 2015. **Fator de Impacto 2,306**