

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

DISSERTAÇÃO

**Leveduras associadas ao ninho das abelhas sem ferrão *Melipona*
interrupta e *Cephalotrigona femorata* (Apidae: Meliponini):
identificação e aspectos biotecnológicos**

Sabrina da Fonseca Meireles

Manaus – AM

Julho de 2018

Sabrina da Fonseca Meireles

**Leveduras associadas ao ninho das abelhas sem ferrão *Melipona
interrupta* e *Cephalotrigona femorata* (Apidae: Meliponini):
identificação e aspectos biotecnológicos**

Orientador: Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva

Coorientador: Dr. Adolfo José da Mota

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (PPG–BIOTEC), como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Manaus – AM

Julho de 2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M514l Meireles, Sabrina da Fonseca
Leveduras associadas ao ninho das abelhas sem ferrão *Melipona interrupta* e *Cephalotrigona femorata* (Apidae: Meliponini): identificação e aspectos biotecnológicos / Sabrina da Fonseca Meireles. 2018
80 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Carlos Gustavo Nunes da Silva
Coorientador: Adolfo José da Mota
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Leveduras. 2. Abelhas sem ferrão. 3. Perfil de restrição. 4. Simbiose. 5. Insetos. I. Silva, Carlos Gustavo Nunes da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho,
A Deus e
Aos meus pais, Francisco e Maria Soriene.*

AGRADECIMENTOS

- ❖ A Deus, por todas as oportunidades dadas a mim e por ter me guiado com lucidez em todas as minhas decisões.
- ❖ A minha família que sempre torceu pelo meu sucesso. E em especial ao meu pai que sempre esteve disposto a ajudar nas mais diversas situações e a minha querida mãe, por me ajudar nas horas mais difíceis, por me dar sempre uma palavra amiga, me incentivando e me ajudando cumprir as tarefas do dia-a-dia em casa.
- ❖ Ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, junto à Universidade Federal do Amazonas, pela minha formação e por proporcionarem toda a estrutura e suporte necessários para a realização deste trabalho.
- ❖ Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.
- ❖ Ao grupo de pesquisa “MIB” por ter me recebido de braços abertos para desenvolver meus estudos junto a sua base de pesquisa. Em especial, a Doutora Lorena Nacif, pelas conversas inspiradoras e motivadoras ao longo destes dois anos e à Luciana pelo apoio sempre que precisei.
- ❖ Ao meu orientador Doutor Carlos Gustavo Nunes da Silva por ter feito parte dessa etapa tão importante da minha vida, pelos ensinamentos, pela inspiração, por me mostrar o “fantástico mundo das abelhas” e por confiar em mim a realização deste trabalho.
- ❖ Ao meu coorientador Doutor Adolfo José da Mota pela inestimável colaboração, solicitude, orientação, ensinamentos, discussões, momentos de lazer e por ter tornado possível o desenvolvimento deste trabalho. Minha sincera gratidão.
- ❖ À querida “Sam” por me receber de braços abertos no laboratório, pela dedicação ao ensinar e acompanhar meus primeiros passos no mundo da microbiologia e biologia molecular.
- ❖ As minhas amigas, Cláudia, Marjory, Lucivana, Suelen e Alessandra por toda ajuda, pelos maravilhosos momentos que passamos juntas, pelas longas horas de conversas, desabafos, risadas, divertidos cafés da tarde e principalmente, os famosos aniversários. Muito obrigada por tornarem meus dias mais suaves e pela cumplicidade.
- ❖ E a todos os outros que não foram mencionados, mas sabem que foram importantes nas minhas atividades científicas e/ou sociais nesses dois anos vividos na UFAM.

RESUMO

As abelhas nativas sem ferrão (Apidae: Meliponini) apresentam interações simbióticas com as leveduras, apontadas como as principais responsáveis pela fermentação do pólen, alimento preferido pelos meliponídeos, e pela fermentação de outros materiais de origem vegetal coletados pelas abelhas. Neste projeto, foi proposto identificar leveduras associadas ao ninho de duas abelhas nativas da Amazônia e estabelecer um banco de estirpes amazônicas de referência. Para isso, os substratos (pólen, mel, alimento larval e cera) foram coletados do ninho de *Melipona interrupta* e *Cephalotrigona femorata* em três meliponários, localizados em Iranduba, Parintins e Paraná de Parintins, (n=12 amostras). Os procedimentos metodológicos adotados neste trabalho seguem a seguinte ordem: (1) isolamento em YPD, (2) triagem em CHROMágar para separação dos isolados em grupos de cores, (3) extração de DNA, (4) triagem de padrões moleculares por PCR/RFLP baseado na amplificação das regiões 18S, ITS1-5,8S-ITS2 e D1/D2 do gene 26S rRNA e digestão do amplicon com a enzima *Dde* I (5) sequenciamento dos amplicons dos diferentes padrões obtidos na RFLP e a identificação mediante comparação das sequências obtidas contra os bancos de dados de sequências nucleotídicas do consórcio INSDC, com auxílio da ferramenta BLASTN. Foram isoladas 749 leveduras associadas ao ninho das abelhas *Melipona interrupta* e *Cephalotrigona femorata*, das quais, 15 linhagens foram identificadas, a saber: SM01 *Candida* sp., SM02 *Hyphopichia* sp., SM03 *Rhodotorula* sp., SM04 *Wickerhamiella versalitis*, SM05 *Debaryomyces* sp., SM06 *Candida orthopsilosis*, SM07 *Candida apícola*, SM08 *Metschnikowia* sp., SM09 *Zygosaccharomyces siamensis*, SM10 *Hanseniaspora opuntiae*, SM11 *Pichia* sp., SM12 *Pichia kluyveri*, SM13 *Trichosporon asahii*, SM14 *Kodamaea ohmeri* e SM15 *Aureobasidium* sp. Este trabalho resultou em (1) dados inéditos a respeito das leveduras associadas às abelhas sem ferrão da Amazônia, (2) contribuiu com os bancos de dados por meio do depósito de sequências nucleotídicas completas de regiões gênicas usadas para identificação de leveduras, (3) estabeleceu 14 novos padrões de RFLP, (4) forneceu quinze linhagens a serem exploradas em estudos futuros, das quais cinco podem ser espécies ainda não descritas na literatura, que visem prospectar processos e biomoléculas de interesse biotecnológico.

Palavras-chave: Leveduras, Abelhas sem ferrão, Perfil de restrição, Simbiose, Inseto.

ABSTRACT

Native stingless bees (Apidae: Meliponini), as well as the other social insects of the order Hymenoptera, present symbiotic interactions with the yeasts, indicated as the main responsible for the processing of pollen, fermented food preferred by the meliponids, and by the fermentation of other vegetal materials taken to these nests. In this project, it was proposed to identify yeasts associated with the nest of two Amazon native bees and establish a reference database for Amazonian strains. For this, the substrates (pollen, honey, larval food and wax) were collected from the nest of *Melipona interrupta* and *Cephalotrigona femorata* in three meliponaria, located in Iranduba, Parintins and Paraná de Parintins, (n = 12 samples). The methodological procedures adopted in this work are as follows: (1) isolation in YPD, (2) screening in CHROMágar for separation of the isolates in groups of colors, (3) DNA extraction, (4) screening for RFLP standards based on the amplification of the 18S, ITS1-5,8S-ITS2 and D1 / D2 regions of the 26S rRNA gene and digestion of the amplicon with the *Dde* I restriction enzyme. The amplicons of the different profiles were sequenced and the identification was achieved comparing the sequences against the nucleotide databases of the INSDC consortium using the BLASTN tool. A total of 749 nest bees associated yeasts were isolated, among these 15 lines were identified, namely: SM01 *Candida* sp., SM02 *Hyphopichia* sp., SM03 *Rhodotorula* sp., SM04 *Wickerhamiella versalitis*, SM05 *Debaryomyces* sp., SM06 *Candida orthopsilosis*, SM07 *Candida apícola*, SM08 *Metschnikowia* sp., SM09 *Zygosaccharomyces siamensis*, SM10 *Hanseniopsis opuntiae*, SM11 *Pichia* sp., SM12 *Pichia kluyveri*, SM13 *Trichosporon asahii*, SM14 *Kodamaea ohmeri* and SM15 *Aureobasidium* sp. This work contributed to (1) the identification of yeast associated to the natives stingless bees, (2) contributed to the databases through the deposit of complete nucleotide sequences, useful for yeast identification, (3) established thirteen new RFLP standards, (4) in addition to compose a database of yeasts, which from this bank, future works may prospect processes and biomolecules of biotechnological interest.

Keywords: Yeast, Stingless bees, Restriction profile, Symbiosis, Insect.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR – Reação em cadeia de polimerase

RFLP – Análise do polimorfismo por fragmento de restrição

YPD – Meio composto de extrato de levedura, peptona e dextrose

ITS1-ITS2 - Espaços internos transcritos

D1/D2 - Domínios

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

rDNA – Ácido Desoxirribonucleico ribossômico

DdeI– Enzima de restrição advinda de *Desulfovibrio desulfuricans* e que corta o palíndromo 5’C↓TNAG3’

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Colônia de *Melipona interrupta*, em destaque (seta), operária transportando o pólen apícola em corbículas. 6
- Figura 2** Ninho de *Melipona interrupta*, no centro as células de cria e circundando, os potes de pólen e mel. 9
- Figura 3** Representação das etapas de coleta de pólen de *Melipona interrupta*. A – Introdução da ponteira no pote de pólen para coleta (posição vertical) em diferentes camadas; B – Retirada da ponteira contendo diferentes camadas de pólen. C – Armazenamento do pólen coletado. O mesmo procedimento foi realizado para a abelha *Cephalotrigona femorata*. 11
- Figura 4** Obtenção de mel de *Melipona interrupta*. A – Introdução da pipeta no pote de mel; B – armazenamento do mel extraído. O mesmo procedimento foi realizado para a abelha *Cephalotrigona femorata*. 12
- Figura 5** Coleta do alimento larval depositado nas células de cria de *Melipona interrupta* com auxílio de pipeta automática. A – Introdução da pipeta na célula de cria. B – Retirada da pipeta contendo alimento larval. O mesmo procedimento foi realizado para a abelha *Cephalotrigona femorata*. 12
- Figura 6** Armazenamento dos fragmentos de cera obtidos do ninho de *Melipona interrupta*. O mesmo procedimento foi realizado para a abelha *Cephalotrigona femorata*. 13
- Figura 7** Representação física do amplicon, correspondente as regiões 18S, ITS1-5,8S-ITS2 e D1/D2 do gene 26S rRNA com seus respectivos primers internos. Números e setas indicam os primers, com suas posições relativas, e direção da síntese. 16
- Figura 8** Representação dos métodos de preservação das leveduras: A- Tubo inclinado (meio YPD sólido em tubo falcon de 40 mL) e B- Criopreservados em freezer a -80 C, em solução YPD com 15% glicerol. 18
- Figura 9.** Características macroscópicas das leveduras isoladas. As características morfológicas das colônias foram observadas em meio cromogênico CHROMágar (lado esquerdo) e meio nutriente YPD (lado direito). Os números codificam os 15 isolados estudados, respectivamente: 1-A1, 2-V1, 3-V9, 4-110, 5-443, 6-591, 7-621, 8-626, 9-630, 10-632, 11-635, 12-642, 13-692, 14-698 e 15-707. 19
- Figura 10** Perfil eletroforético representativo da extração de DNA de leveduras de pólen, mel, alimento larval e cera de *Melipona interrupta* e *Cephalotrigona femorata* em gel de agarose a 1%. M1 – marcador DNA λ de 10 ng; M2 - marcador DNA λ de 20ng SM01–SM15 amostras de DNA. 20

Figura 11 Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% visualizado por brometo de etídio dos produtos da PCR da região 26S do rDNA amplificados a partir do pólen, mel, alimento larval e cera de *Melipona interrupta* e *Cephalotrigona femorata*. 21

Figura 12 Perfis de restrição das leveduras. Linhagens: SM01 *Candida* sp., SM02 *Hyphopichia* sp., SM03 *Rhodotorula* sp., SM04 *Wickerhamiella versalitis*, SM05 *Debaryomyces* sp., SM06 *Candida orthopsilosis*, SM07 *Candida apícola*, SM08 *Metschnikowia* sp., SM09 *Zygosaccharomyces siamensis*, SM10 *Hanseniaspora opuntiae*, SM11 *Pichia* sp., SM12 *Pichia kluyveri*, SM13 *Trichosporon asahii*, SM14 *Kodamaea ohmeri* e SM15 *Aureobasidium* sp. O padrão de restrição foi avaliado a partir do uso do marcador 1kb Plus (ao lado) de cada perfil. 21

Figura 13 Mapa de restrição da digestão com a enzima *Dde* I prevista pela ferramenta *Nebcutter*. A análise *in silico* mostra a digestão de 14 linhagens de leveduras, são: SM01 *Candida* sp., SM02 *Hyphopichia* sp., SM03 *Rhodotorula* sp., SM04 *Wickerhamiella versalitis*, SM05 *Debaryomyces* sp., SM06 *Candida orthopsilosis*, SM07 *Candida apícola*, SM08 *Metschnikowia* sp., SM10 *Hanseniaspora opuntiae*, SM11 *Pichia* sp., SM12 *Pichia kluyveri*, SM13 *Trichosporon asahii*, SM14 *Kodamaea ohmeri* e SM15 *Aureobasidium* sp. 22

Figura 14 Eletroferograma gerado pelo analisador genético correspondente aos primers internos 607 e 377 da linhagem SM15 (707), mostrando a qualidade das sequências. .. 23

Figura 15 Análise da história evolutiva das leveduras associadas às abelhas sem ferrão pelo método da máxima verossimilhança. A árvore apresentada refere-se ao consenso do bootstrap e mostra apenas as relações evolutivas, sem considerar o tempo decorrido. Os números próximos aos nós referem-se à taxa de repetição para cada relação, tomadas a partir de 1000 replicatas. SM se referem às linhagens propostas no presente trabalho 25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características físico-químicas do pólen coletados por <i>Melipona seminigra</i> e por <i>Melipona interrupta</i> da Amazônia e <i>Melipona scutellaris</i> do Nordeste (retirado de Rebelo et al., 2016 e Ferreira, 2012).....	8
Tabela 2 Primers utilizados na reação de PCR e sequenciamento com seus respectivos códigos e referências.	16
Tabela 3 Grau de pureza do DNA extraído de <i>Melipona interrupta</i> e <i>Cephalotrigona femorata</i> , quantificado em espectrofotômetro.....	20
Tabela 4 Identificação de oito linhagens em nível de gênero e sete em nível de espécie, baseado no critério de dissimilaridade $\geq 1\%$ a partir do alinhamento de sequências que compreendem os marcadores ITS1, ITS2 e D1/D2.	23
Tabela 5 Ocorrência de leveduras associadas aos microambientes do ninho das abelhas sem ferrão <i>Melipona interrupta</i> (MI) e <i>Cephalotrigona femorata</i> (C) de três Meliponários no Amazonas (Iranduba, Parintins e Paraná de Parintins).	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Aspectos gerais das leveduras	3
2.2 Aspectos importantes da simbiose entre insetos/abelhas nativas e leveduras .	4
2.3 Aspectos biológicos das abelhas sem ferrão	5
3 OBJETIVOS	10
3.1 Objetivos específicos	10
4 MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Áreas de coletas de pólen, mel, alimento larval e cera	11
4.2 Processamento do pólen, mel, alimento larval e cera	13
4.2.1 Pré-inóculo e plaqueamento	13
4.2.2 Extração de DNA dos isolados.....	14
4.2.3 PCR.....	15
4.2.4 Purificação do produto da PCR.....	15
4.2.5 RFLP	15
4.2.6 Gel de RFLP e análise dos fragmentos de restrição	15
4.2.7 Reação de sequenciamento	16
4.2.8 Precipitação das reações de sequenciamento	16
4.2.9 Análise automática e processamento das sequências	17
4.3 Confeção do mapa de restrição	17
4.4. Análise filogenética	17
4.5 Preservação das leveduras	18
5 RESULTADOS	19
6 DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÃO	30
8 PERSPECTIVAS	31
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
APÊNDICES	43

1 INTRODUÇÃO

As leveduras são microrganismos de grande importância na bioindústria, pois são potenciais fermentadoras de açúcares e/ou produtoras de enzimas úteis a bioprocessos utilizados pelo homem. A utilização das leveduras em diversos bioprocessos resulta de sua fácil prospecção e manipulação, pois são seres eucarióticos unicelulares de rápido crescimento em ampla variedade de substratos, curto tempo para fermentação, capacidade de secretar proteínas para o meio extracelular e baixo potencial patogênico (COUTO, 2008; BARRIGA et al. 2011).

As leveduras são ubíquas, podendo desenvolver as mais diversas interações simbióticas possíveis, abrangendo virtualmente todos os grupos. Entre esses, os insetos, que na maioria dos casos apresenta associação neutra (ou seja, nenhum dos dois participantes se beneficia ou sofre com a associação). Eventualmente a associação pode ser mutualística (positiva para ambos os participantes), comensal (positiva para um, neutra para o outro), amensal (negativa para um, neutra para outro) ou parasitária (negativa para um, positiva para outro) (STARMER e LACHANCE, 2011).

Um exemplo clássico da relação de simbiose entre levedura e insetos sociais é encontrado em formigas. Nesse caso as leveduras oferecem vários benefícios para seus anfitriões como nutrientes e proteção contra patógenos (KROISS et al. 2010; KALTENPOTH e ENGL, 2013). Estas simbioses impulsionaram a evolução de comportamentos complexos e estruturas de ninho associadas com a cultura dos microrganismos simbióticos (MUELLER e GERARDO, 2002; SACHS et al. 2011).

Em ninhos de abelhas nativas sem ferrão, microrganismos como bactérias (MACHADO, 1971), fungos filamentosos (KAČÁNIOVÁ et al. 2011) e leveduras (ROSA et al. 2003; DANIEL et al. 2013; PALUDO et al. 2018) vivem em sinergia. Tal interação é vista desde o nível de indivíduo (abelha) até os diferentes microambientes dispostos dentro do ninho (colmeia) (NACIF-MARÇAL, 2017), como os potes de armazenamento de alimento (pólen e mel), construídos a partir de cera secretada pelas próprias abelhas, contendo o substrato essencial para o crescimento de leveduras, os açúcares.

A associação entre leveduras e abelhas pode ser espécie-específica, relacionada à fase de desenvolvimento e até mesmo do microambiente encontrado no ninho

(PALUDO et al. 2018). Algumas leveduras são encontradas nas flores, no pólen, no néctar e conseguinte, recuperadas a partir do intestino de adultos. Outras são isoladas de disposições larvais e pupas (INGLIS et al. 1993; ROSA et al. 1999; TEIXEIRA et al. 2003; PIMENTEL et al. 2005; DANIEL et al. 2013; PALUDO et al. 2018). As leveduras isoladas desses locais pertencem principalmente ao clado *Starmerella*, que atualmente é composto por mais de 40 espécies identificadas. Este clado é definido como um ramo único dos ascomicetos que apresentam os traços ecológicos comuns da associação entre insetos e flores efêmeras (LACHANCE et al. 2001; ROSA et al. 2003; 2005).

A microbiota associada aos microambientes do ninho de abelhas sem ferrão da Amazônia ainda é, em boa parte, desconhecida. Há pouca informação acerca do envolvimento das leveduras na fermentação do alimento das melíponas, no processo estimulação olfativa que alimentos presentes nas flores exercem sobre estas abelhas e na saúde imunológica das mesmas. Entretanto, é notória a presença de leveduras em processos dentro da colmeia, como a fermentação de material de origem vegetal coletado pelas abelhas, ricos em carboidratos e proteínas. A própria arquitetura dos ninhos parece estabelecer as condições ideais para um biorreator natural, estes são construídos em ocos de árvores com alta umidade e temperatura, um ambiente favorável para o crescimento de leveduras e outros microrganismos com potencial biotecnológico.

Cientes da crescente procura por novos microrganismos com potencial biotecnológico, cuja etapa inicial de seleção pode ser feita através da exploração da biodiversidade, propôs-se, como modelo de estudo, prospectar leveduras em ninhos de abelhas nativas sem ferrão para criar uma coleção de referência desses microrganismos que possa ser usada em estudos futuros, seja do ponto de vista ecológico, ajudando no entendimento das complexas relações de simbiose entre microrganismos e insetos sociais ou contribuindo com conhecimentos acerca da microbiota funcional dos meliponídeos e principalmente, fornecer base para a prospecção de processos ou biomoléculas de interesse biotecnológico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais das leveduras

As leveduras são fungos eucarióticos unicelulares, não filamentosos, com ampla distribuição na natureza. São encontradas em tecidos vegetais (folhas, flores e frutos), no ar, solo, água, em relação de comensalismo ou parasitismo com animais, em ambientes especializados ou extremos, com altas concentrações de açúcar ou sal ou com baixa temperatura e baixa disponibilidade de oxigênio (WALKER, 2009; MONTES DE OCA et al. 2016).

A função das leveduras nesses ambientes é diversa, por exemplo, algumas espécies proporcionam uma barreira natural contra patógenos para as plantas, no solo contribuem para a reciclagem e a mineralização do carbono. Em simbiose com animais, por sua vez, são vitais; ao passo que juntamente com os fungos filamentosos e as bactérias heterotróficas são os principais decompositores de matéria orgânica da biosfera, considerados essenciais para a continuidade da vida (FOKKEMA et al. 1979; RAVEN et al. 2007; STARMER e LACHANCE, 2011).

As leveduras são evolutivamente diversas e estão agrupadas em dois filos separados, Ascomycota e Basidiomycota (KURTZMAN, 1994). Atualmente, existem mais de 1500 espécies conhecidas, sendo 700 espécies descritas e classificadas em 93 gêneros, as quais pertencem à classe Saccharomycetos, comumente chamadas de “leveduras verdadeiras” (VEGA e DOWD, 2005).

Algumas características morfológicas das leveduras são essenciais para a sua identificação, a saber: são exclusivamente unicelulares, não são filamentosas, as paredes celulares contêm os polissacarídeos glicana e manana, alimentam-se por absorção, contêm núcleo organizado com membrana nuclear, não possuem flagelo, são imóveis, possui cerca de $1 \times 10 \mu\text{m}$ de comprimento, tipicamente com células esféricas ou ovais, reproduzem-se via reprodução sexuada através de esporos e/ou reprodução assexuada por brotamento e as leveduras que realizam fissão para se dividir (KURTZMAN e FELL, 1998, TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

As leveduras são anaeróbicas facultativas, ou seja, podem utilizar o oxigênio para produzir energia ou não, pois na ausência do oxigênio também são capazes de continuar a crescer utilizando fermentação ou a respiração anaeróbica (TORTORA;

FUNKE; CASE, 2012). Os gêneros de leveduras mais utilizados nos processos fermentativos para produção de etanol e para produção de várias enzimas industriais (celulases, pectinases, lipases, proteases e xilanase) são: *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Sporobolomyces*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Saccharomyces*, *Bullera*, *Torulaspota*, *Rodotorula* e *Zygosacharomyce*.

O uso de algumas espécies desses gêneros de leveduras nas indústrias é possível: (1) por não apresentarem características patogênicas, o que torna seguro sua manipulação e aplicação (CRUZ et al. 2009); (2) pelo seu rápido crescimento em vários substratos; (3) curto tempo para fermentação; e (4) pela capacidade de secretar proteínas para o meio extracelular (COUTO, 2008, TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

2.2 Aspectos importantes da simbiose entre insetos/abelhas nativas e leveduras

As associações de insetos com fungos são comuns e podem ser ocasionais ou altamente específicas e até obrigatórias (VEGA e DOWD, 2005; PALUDO et al. 2018). Em um ecossistema os organismos estão constantemente interagindo entre si, através de relações que podem ser intraespecíficas ou interespecíficas. O termo simbiose foi cunhado por Albert Frank em 1877 para descrever interações não-parasitas envolvendo micróbios (SAPP, 1994). O significado foi refinado posteriormente pelo patologista Anton de Bary em 1879, em seu trabalho pioneiro sobre doenças fúngicas das plantas. Na sua formulação original, significa a associação entre diferentes espécies que vivem em constante contato, podendo ser ou não vantajosa para todos os participantes.

Um importante exemplo de interação entre leveduras e insetos, bem descritos na literatura, ocorre em gafanhotos e besouros, conhecidos por abrigarem fungos endossimbiontes no trato digestório que desempenham funções importantes na nutrição, aumentando a gama de recursos disponíveis, fornecendo enzimas para a degradação ou desintoxicação do material vegetal oriundo de sua alimentação (DOWD, 1992; DOUGLAS, 2009; VISSA e HOFSTETTER, 2017).

Os benefícios da associação entre leveduras e insetos têm continuamente despertados interesse (DOUGLAS e SMITH, 1989). Atualmente, supõe-se que os principais serviços oferecidos ao fungo pelo inseto estão relacionados à proteção e dispersão dos seus esporos (VEGA e DOWD, 2008). Para os insetos as leveduras poderiam fornecer muitas vantagens, tais como nutrição, desintoxicação de substâncias

prejudiciais, proteção a estresses bióticos, e comunicação química (CHRISTENSEN, 2010; GIBSON e HUNTER, 2010; WITZGALL et al. 2012; ENGEL e MORAN, 2013). Já a função das leveduras na alimentação dos insetos tem sido descrita de forma indireta, mediante a diminuição do desempenho do inseto na ausência de leveduras associadas (VEGA e DOWD, 2005). As leveduras são ricas em certas vitaminas do complexo B (B3 e B5), proteínas, alguns metais e ácidos aminados, além de possuírem melhor fonte de nitrogênio e outros nutrientes que o próprio tecido da planta (GIBSON e HUNTER, 2010; VEGA e DOWD, 2005).

A associação entre leveduras e meliponídeos (família taxonômica das abelhas sem ferrão) foi reportada no trabalho de Rosa e colaboradores, onde se constatou o cultivo de leveduras dos gêneros *Cândida*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia* e *Starmerella*. Estas são responsáveis por produzir e liberar enzimas que melhoram, protegem e preserva o pólen, principal alimento proteico das abelhas, podendo ter um papel na produção de antimicrobianos, protegendo a colônia de doenças (GILLIAM, 1997; ROSA et al. 2003).

2.3 Aspectos biológicos das abelhas sem ferrão

As abelhas da família Apidae (abelhas altamente sociais/eussociais), vivem em colônias perenes com divisões de castas e divisão etária de trabalho (CAMPOS et al. 1987). São popularmente denominadas “abelhas sem ferrão” pelo fato de serem incapazes de ferocar, pois possuem o acúleo atrofiado (NOGUEIRA-NETO, 1997; CAMARGO e PEDRO, 2013).

As abelhas sem ferrão ocorrem nos trópicos e subtropicais do mundo (MICHENER, 1974) e existem mais de 500 espécies descritas em 33 gêneros, exclusivamente neotropicais, sendo no Brasil 242 espécies descritas em 29 gêneros com possibilidade deste número estar subestimado (MICHENER, 2000; MICHENER, 2013; CAMARGO e PEDRO, 2013; PEDRO, 2014).

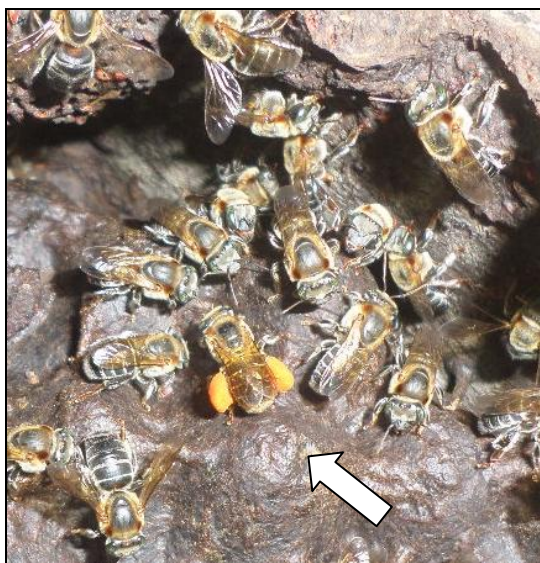
Melipona (Melikerria) interrupta Latreille, 1811 é nativa da Amazônia brasileira. No Brasil há registro de ocorrência em todo o território, sendo a bacia Amazônica a área de maior diversidade. *M. interrupta* é comumente conhecida como jupará ou jandaíra-preta-da-Amazônia (KERR et al. 2001; MICHENER, 2007).

Cephalotrigona femorata Smith, F. (1854) também é nativa da Amazônia brasileira, e tem como habitat ecossistemas de terra firme (OLIVEIRA et al. 1995), quanto a nidificação, são encontradas em ocos de árvores (CAMARGO, 1994) e popularmente são chamadas de “mombucão-da-Amazônia” (NOGUEIRA-NETO, 1997; CORTOPASSI-LAURINO et al. 2011; CAMARGO e PEDRO, 2013).

O ninho das abelhas sem ferrão tem como principal característica o armazenamento de alimento em potes de cera construídos pelas próprias abelhas, sendo pólen apícola (principal fonte de proteína) (MICHENER, 1974) e néctar (fonte de carboidratos) (ROUBIK, 1982; MAIA-SILVA et al. 2015). O alimento (néctar e pólen) é transportado para as colônias por abelhas operárias, responsáveis pelo forrageamento, e armazenado em potes construídos de cerume (NOGUEIRA-NETO, 1997).

O grão de pólen recolhido pelas abelhas é composto por proteínas, lipídios, vitaminas e minerais (NOGUEIRA-NETO, 1997). As abelhas em contato com o pólen na flor produzem substâncias salivares, juntamente com a deposição de pequenas quantidades de néctar para adesão dos grãos nas corbículas, estrutura com formato de “cesta” localizada na tíbia do terceiro par de pernas das abelhas, em destaque na figura 1. O pólen apícola é o resultado da aglutinação do pólen das flores com néctar ou secreções salivares da abelha (HERBERT e SHIMANUKI, 1978; VIT e SANTIAGO, 2008). Estes são posteriormente depositados em “potes de pólen” (FREITAS, 2003).

Figura 1 Colônia de *Melipona interrupta*, em destaque (seta), operária transportando o pólen apícola em corbículas.



Fonte própria.

O pote de pólen está localizado geralmente ao redor das células de cria, juntamente com os potes de mel (KERR et al. 1996; NOGUEIRA, 1997) (Figura 2). A descrição do mecanismo de armazenagem do pólen conforme se segue, é importante para contextualizar a interação entre substrato/inóculo (no caso a levedura), as quais nortearam as decisões metodológicas deste projeto. No pote de pólen as abelhas usam as mandíbulas para depositar a massa de pólen apícola recém-colhida, regurgitam secreções ricas em enzimas α e β glucosidase provenientes das glândulas mandibulares e hipofaríngeas (NOGUEIRA-NETO, 1997), juntamente com microrganismo. Em seguida, o pote é vedado com cera, onde processos bioquímicos são continuados resultando em um novo produto, popularmente conhecido como saburá, rico em nutrientes essenciais para a sobrevivência da colônia (NOGUEIRA-NETO, 1997).

A composição bioquímica do pólen antes de ser processado no ninho varia de acordo com cada espécie de planta (ZUCOLOTO, 1994) e os fatores como idade e as condições nutricionais do vegetal de onde o pólen é obtido podem influenciar a sua composição (PORTELA e GALLEGO, 1999).

Os componentes do pólen da flor são: exina (membrana mais externa) constituída por terpenos polímeros, material resistente conhecido como esporopolenina; Intina (membrana mais interna), composta por celulose e pectina, substâncias passíveis de digestão bacteriana; Protoplasma (conteúdo interno do pólen) no qual estão mergulhadas duas células: I - célula vegetativa, responsável pela organização do tubo polínico e, II - célula germinativa, composta pelo material genético destinado a unir-se à célula feminina. Esse conteúdo interno do pólen pode ser digerido por enzimas digestivas proteolíticas das abelhas (BRAND, 2011).

A composição nutricional do pólen consiste em proteínas, lipídios, fibras, mais de 21 sais minerais (cálcio, cloro, cobre, ferro, magnésio, iodo, molibdênio, selênio e etc) (MARCHINI et al., 2006), cerca de 34 vitaminas (A, B, C, D, E), oligo-minerais (cobalto, níquel, silício, titânio e etc.) (RIBEIRO e SILVA, 2007) e aminoácidos.

Já o pólen fermentado apresenta características distintas do pólen *in natura*. Este (pólen fermentado) é distribuído nas células de cria pelas abelhas operárias, homogeneizado com mel e enzimas em preparação à oviposição da rainha, em seguida a célula é vistoriada e fechada pelas operárias, permanecendo assim até a emergência do adulto. (MACHADO, 1971).

O pólen de *Melipona seminigra* e *M. interrupta* foram analisados por Rebelo et al (2016), assim como o de *Melipona scutellaris* por Ferreira (2012), de acordo com a tabela abaixo.

Tabela 1. Características físico-químicas do pólen coletados por *Melipona seminigra* e por *Melipona interrupta* da Amazônia e *Melipona scutellaris* do Nordeste (retirado de Rebelo et al., 2016 e Ferreira, 2012).

Características físico-químicas	Pólen coletado por <i>M. seminigra</i>	Pólen coletado por <i>M. interrupta</i>	Pólen coletado por <i>M. scutellaris</i>
Umidade	53,39%	37,12%	51,7%
Proteína	37,63%	24,00%	19,7%
Lipídeos	10,81%	6,47%	2,5%;
Cinzas	4,03%	2,74%	2,4%;
Fibra bruta	9,30%	13,65%	2,76%
Carboidratos	25,66%	44,27%	
Energia	350,47%	331,33kcal%	
pH	3,70%	3,34	3,8
Sólidos totais	46,60%	62,87%	
Atividade de água	0,91%	0,85%	

Rebelo e colaboradores (2016), além dos dados acima também observaram traços característicos de substâncias fenólicas por cromatografia em camada delgada e, em espectros de RMN ^1H , sinais similares aos de α e β -glicose, alanina, etanol e ácido acético.

No trabalho de Vollet-Neto et al (2016) observou-se uma maior preferência de pólen fermentado (pólen) pelas abelhas do que pelo pólen fresco (apícola). De acordo com os autores esse comportamento pode ter sido acarretado pela existência de uma tendência inata das abelhas jovens, ou devido à aprendizagem associativa remanescente dos hábitos alimentares das larvas diante dos níveis elevados de substâncias atrativas no pólen.

A fermentação é o processo de degradação anaeróbia de nutrientes orgânicos para obtenção de energia na forma de Trifosfato de Adenosina (ATP) e é um processo biológico no qual diferentes tipos de microrganismos promovem a transformação de compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas e lipídios) em produtos mais simples, tais como ácidos orgânicos voláteis (ácidos acético, propiônico, isobutírico e butírico), álcoois (etanol, butanol), dióxido de carbono (CAMPOS, 1999; TORTORA,

FUNKE e CASE et al. 2012). Para produzir energia a partir da glicose, os microrganismos utilizam dois processos gerais: a respiração e a fermentação. Ambos os processos normalmente iniciam com a glicólise que é a oxidação da glicose em ácido pirúvico, mas seguem vias diferentes posteriormente (TORTORA, FUNKE e CASE et al. 2012).

Em estudo sobre diversidade polínica de pólen no trato digestório da abelha *M. seminigra* foi mostrado haver grupos de pólen que não são processados no intestino, indicando a necessidade de processamento anterior, provavelmente mediado por microrganismos (UEIRA-VIEIRA et al. 2015).

A identificação de leveduras associadas às abelhas sem ferrão contribuirá para o conhecimento da estrutura microbiota da colmeia, podendo elucidar relações importantes para a vida em sociedade nestes insetos, bem como prospectar potenciais leveduras para uso em bioprocessos.

Figura 2 Ninho de *Melipona. interrupta*, no centro as células de cria e circundando, os potes de pólen e mel.



Fonte própria.

3 OBJETIVOS

Identificar leveduras associadas ao ninho das abelhas sem ferrão *Melipona interrupta* e *Cephalotrigona femorata* (Apidae: Meliponini) obtidas de três meliponários no Estado do Amazonas.

3.1 Objetivos específicos

- Validar o método RFLP para identificação de leveduras ambientais, especialmente de leveduras associadas às abelhas sem ferrão da Amazônia;
- Identificar leveduras associadas ao ninho das abelhas sem ferrão *M. interrupta* e *C. femorata* obtidas de três Meliponários do Amazonas, utilizando o sequenciamento dos transcritos internos ITS1, ITS2 e D1/D2 do fragmento do gene 26S rDNA;
- Estabelecer um banco de referência de leveduras associadas aos meliponídeos amazônicos para posterior prospecção de processos e biomoléculas de interesse biotecnológico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

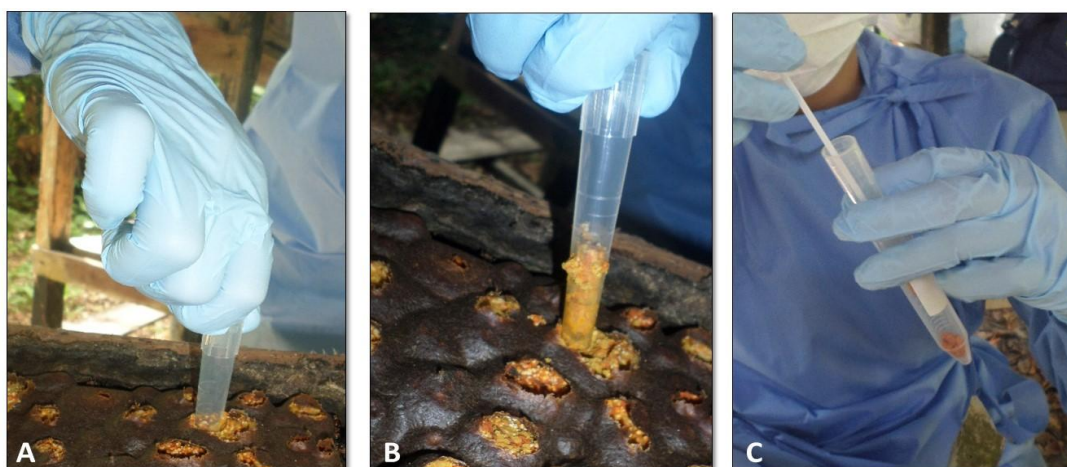
4.1 Áreas de coletas de pólen, mel, alimento larval e cera

As amostras de pólen, mel, alimento larval e cera de *M. interrupta* e *C. femorata* foram coletadas no Meliponário localizado em Iranduba (03° 12' 59.72" S, 60° 79' 41.89" W) em setembro de 2017. Em outubro de 2017, outras duas coletas de pólen, mel, alimento larval e cera de *M. interrupta* foram realizadas nos meliponários localizados em Parintins (02° 38' 04.3" S, 56° 44' 02.5" W) e Paraná de Parintins (02° 32' 38.4" S, 56° 31' 22.6" W).

Uma colmeia (em estado de vigor) foi escolhida em cada Meliponário para extração de pólen de abelha (doravante denominado de pólen), mel, alimento larval e cera. Para a extração das amostras foi utilizado materiais estéreis e de cada colmeia três potes de pólen, três potes de méis e células de cria, as quais tiveram o material extraído e armazenados em *pools* em recipientes estéreis (falcon, 50 mL).

Para a obtenção do pólen, utilizou-se uma ponteira de plástico de 5000 µL, adaptada, conforme mostra a figura 3. A ponteira foi introduzida no pote de pólen na posição vertical para atingir uma profundidade suficiente, atingindo os diversos extratos de pólen que estavam depositados. Em seguida, as amostras foram armazenadas em tubos falcon de 20 mL com auxílio de *swab*.

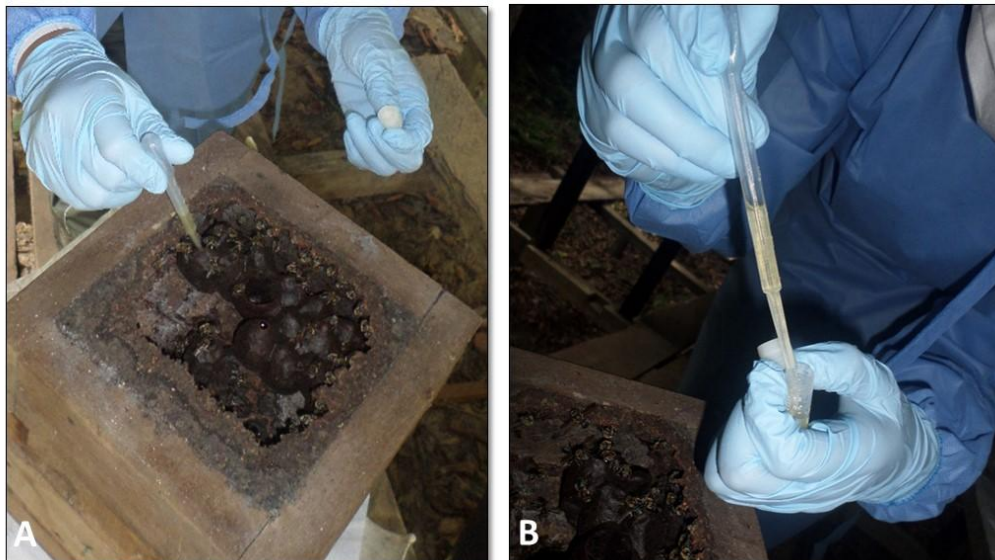
Figura 3 Representação das etapas de coleta de pólen de *Melipona interrupta*. A – Introdução da ponteira no pote de pólen para coleta (posição vertical) em diferentes camadas; B – Retirada da ponteira contendo diferentes camadas de pólen. C – Armazenamento do pólen coletado. O mesmo procedimento foi realizado para a abelha *Cephalotrigona femorata*.



Fonte própria.

Para obtenção do mel, utilizou-se uma pipeta Pasteur graduada e estéril para a retirada de 2 mL, os quais foram armazenados em tubos criogênicos de 2 mL (Fig. 4).

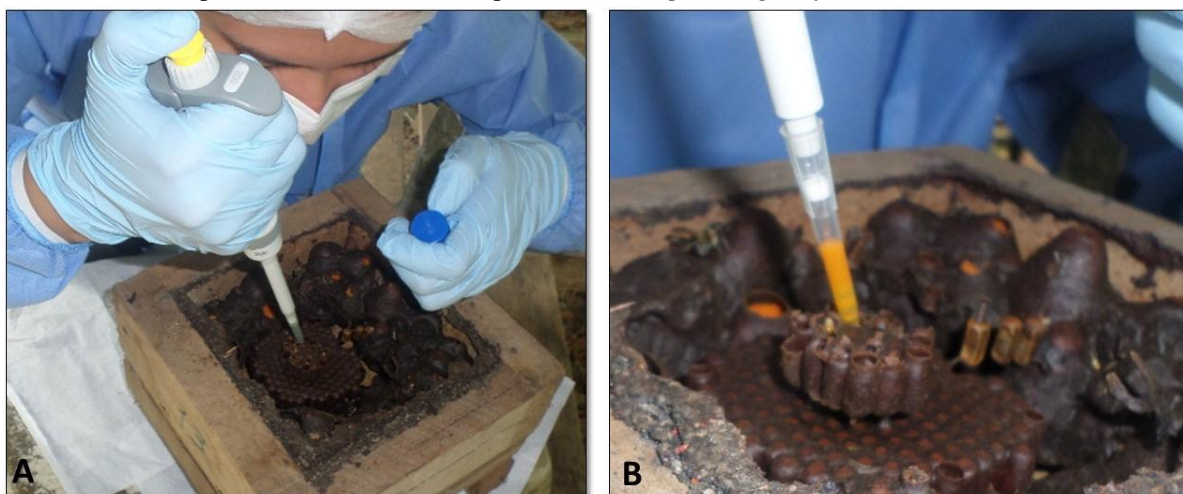
Figura 4 Obtenção de mel de *Melipona interrupta*. A – Introdução da pipeta no pote de mel; B – armazenamento do mel extraído. O mesmo procedimento foi realizado para a abelha *Cephalotrigona femorata*.



Fonte própria.

Os alvéolos de cada célula de cria foram abertos e com auxílio de pipeta automática estéril foi coletado 1mL de alimento larval, composto por pólen, néctar e secreções salivares, e armazenado em tubo Falcon de 15mL, conforme mostra a figura 5.

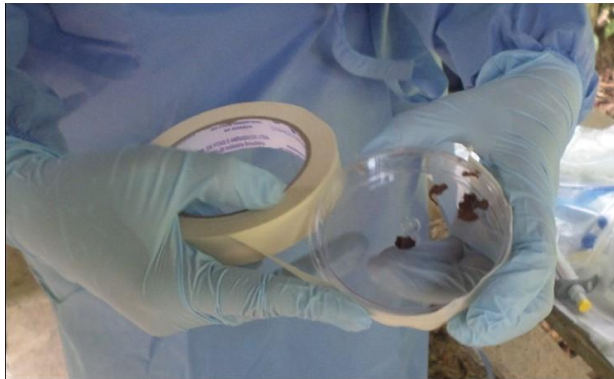
Figura 5 Coleta do alimento larval depositado nas células de cria de *Melipona interrupta* com auxílio de pipeta automática. A – Introdução da pipeta na célula de cria. B – Retirada da pipeta contendo alimento larval. O mesmo procedimento foi realizado para a abelha *Cephalotrigona femorata*.



Fonte própria.

Para a obtenção de cera, utilizou-se pinças estéreis para cortar fragmentos de 5 cm a qual foi armazenada em placa de Petri descartável (Fig. 6).

Figura 6 Armazenamento dos fragmentos de cera obtidos do ninho de *Melipona interrupta*. O mesmo procedimento foi realizado para a abelha *Cephaltrigona femorata*.



Fonte própria.

A temperatura e a umidade das colmeias foram medidas com Termo-Higrômetro Digital com Sonda de Temperatura Externa (*Incoterm*).

4.2 Processamento do pólen, mel, alimento larval e cera

Os experimentos foram realizados nas dependências da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Setor Sul, no Laboratório de Biodegradação (Bloco D) e Laboratório de Biotecnologia (Bloco M).

4.2.1 Pré-inóculo e plaqueamento

No preparo do pré-inóculo, utilizou-se: 1,0 g de pólen, 200 μ L de mel e alimento larval e 1 cm de cera.

Cada amostra de pólen (n=12) foi diluído sucessivamente até a concentração de 10^{-3} para suspensão em meio de cultura líquida YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose, 0.02% cloranfenicol), seguida de incubação por 24 horas a 28°C sob agitação constante a 150rpm (*Cientec*, CT-712). Para a obtenção de isolados, após o período de incubação, cada diluição foi semeada pela técnica de espalhamento em placa no meio de cultura sólido (2% de ágar) e incubadas a 28°C em estufa BOD pelo período de até seis dias.

Após incubação, com auxílio de um palito de dente, uma pequena porção de cada colônia isolada foi semeada em meio sólido BDTM CHROMagarTM *Candida medium*, para a separação das leveduras em grupos de cores. As placas foram mantidas em incubadora BOD a 28 ± 0 , 2°C até que houvesse crescimento das leveduras e produção de cores. Isolados que apresentaram o mesmo padrão de cores foram separados em grupos. Os grupos contendo até três isolados, tiveram todos os seus representantes selecionados para as etapas seguintes do estudo. Grupos contendo mais de três isolados foram estudados por amostragem: apenas três foram selecionados para a extração de DNA e posterior identificação molecular.

4.2.2 Extração de DNA dos isolados

As extrações de DNA foram realizadas de acordo com o protocolo estabelecido por Mota e Nobrega (2013) com modificações. Dois mililitros de uma cultura fresca em YPD foram centrifugados por 5 minutos, em minicentrífuga ajustada para velocidade máxima, seguido de descarte de sobrenadante e adição de 100 µL de tampão de lise [100 mM EDTA; 50 mM Tris pH 7,5; 1% SDS; 50 mM DTT; 0,2 mg/mL PK]. As amostras foram incubadas por 30 min a 60 °C. Logo em seguida, foram acrescidos 100 µL de 5 M acetato de potássio (v/v), homogeneizado e resfriado por 15 min em freezer -20 °C. Em seguida os microtubos foram centrifugados por 15 min a 10.000 g. O sobrenadante foi recuperado e homogeneizado em 200 µL de isopropanol, seguido de centrifugação por 10 min em velocidade máxima. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de 70% etanol. Após centrifugação por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram levadas ao banho seco a 37 °C, para a evaporação do etanol residual. O DNA foi ressuscitado em 30 µL de TE-RNase (10 mM Tris-Cl pH 7,5, 1 mM EDTA, 10 µg/mL RNase) e incubado por 30 minutos a 37 °C.

O DNA extraído foi quantificado em aparelho espectrofotômetro – *NanoDrop* 2000 (*Thermo Scientific*), e a integridade foi avaliada a partir do perfil eletroforético em 1% gel de agarose corado com 0.5 µg/mL brometo de etídio. Em cada canaleta do gel foram adicionados 2 µL da amostra + 2 µL de corante azul de bromofenol, tendo como referência um marcador lambda da *Invitrogen*. O gel foi fotografado em transluminador ultravioleta Quantum (*Vilber Lourmat*).

4.2.3 PCR

A PCR foi realizada com o *kit* GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA). Foi utilizado o volume final de 25 μL , e para tanto as concentrações finais foram: 1X do tampão para PCR, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTPs, 0.2 mM de cada iniciador, 377 e UniR (Tabela 1), 1- 100 ng/ μL dos produtos de extração, 0.13 μL Taq DNA polimerase (5 U. μL^{-1}) e água ultrapura q.s.p. A amplificação foi realizada no termociclador ProFlex-PCR System (*Applied Biosystems*), segundo o programa que consta de uma desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de: 95 °C 3 min, 58 °C 30 s, 72 °C 3 min. e um ciclo transferase terminal a 72 °C por 7 min. Seguida de eletroforese em 0,8% gel de agarose e subsequente fotodocumentação.

4.2.4 Purificação do produto da PCR

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o *kit* AGENCOURT[®] AMPURE[®] XP, seguindo as recomendações do fabricante.

4.2.5 RFLP

Foi montado uma reação de digestão de 20 μL para todas as amostras, utilizando 2,0 μL de tampão 10X NEB 3, 0,4 μL de enzima *DdeI*, 10 μL de amplicon, completando com água ultrapura. O sistema foi incubado a 37 °C *overnight* (MOTA e NÓBREGA, 2013).

4.2.6 Gel de RFLP e análise dos fragmentos de restrição

Os padrões dos fragmentos de restrição foram verificados através de eletroforese horizontal a 140V por 120 min. em 2% gel de agarose corado com 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ brometo de etídio. Em cada canaleta do gel foi adicionado todo o volume do sistema de digestão + corante azul de bromofenol. O perfil eletroforético foi avaliado a partir do uso do marcador 1kb *Plus* (Invitrogen). O gel foi fotografado a cada 30 min. para acompanhamento da separação dos fragmentos de restrição, totalizando 120 min. A análise do padrão de restrição foi feita com base no *Pattern Identification Guide* proposto por Mota e Nobrega (2013).

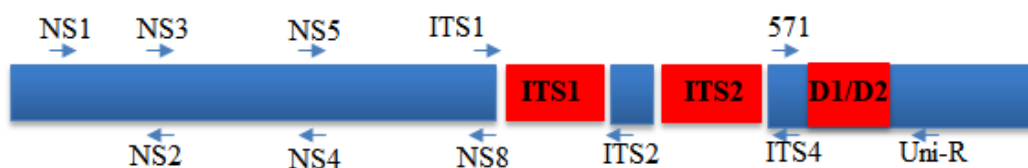
4.2.7 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento por terminação de cadeia foi realizada com volume final de 10 μL , sendo 0.5 μL de *BigDye Terminator* (v3.1) (Applied Biosystems by Thermo), 2 μL de 5X tampão para sequenciamento, 50 ng do produto da PCR e 0.2 μM do iniciador e água ultrapura q.s.p. A ciclagem foi realizada em termociclador ProFlex-PCR System (*Applied Biosystems*), nas seguintes condições: 40 ciclos de 95 °C 30 s, 50 °C 30 s e 60 °C por 2 min (Tabela 1 e Fig. 7).

Tabela 2 *Primers* utilizados na reação de PCR e sequenciamento com seus respectivos códigos e referências.

Primer	Código	Sequência	Referência
NS1	377	5' AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT - 3'	WHITE, T.B.; LEE, 1990.
NS2	607	5' - GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC - 3'	
NS3	608	5' - GCA AGT CTG GTG CCA GCA GCC - 3'	
NS4	609	5' - CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG - 3'	
NS5	610	5' - AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G - 3'	
ITS3	350	5' GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC - 3'	
ITS4	351	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3'	
Uni-f	571	5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG- 3'	FELL, J.W, 1993.
Uni-r	572	5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG - 3'	FELL, J.W, 1993.
NS8	378	5' TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC - 3'	WHITE, T.B.; LEE, 1990.

Figura 7 Representação física do amplicon, correspondente às regiões 18S, ITS1-5,8S-ITS2 e D1/D2 do gene 26S rRNA com seus respectivos *primers* internos. Números e setas indicam os *primers*, com suas posições relativas, e direção da síntese.



Fonte: Própria

4.2.8 Precipitação das reações de sequenciamento

Foram adicionados 4 μL da solução NG (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de glicogênio dissolvido em 5 M NH_4OAc) e 40 μL de etanol absoluto, homogeneizando-os por inversão e em seguida mantidos a -20 °C por 30 min. Os tubos foram centrifugados em velocidade máxima em centrífuga de bancada com rotor de placas. O sobrenadante foi desprezado

por inversão dentro da centrífuga com um pulso de 300 rpm. O precipitado foi lavado duas vezes com 110 µL de 70% etanol, com centrifugação entre as lavagens, a primeira por 20 min e a segunda por 10 min. O etanol foi descartado por inversão dentro da centrífuga, aumentando o pulso para 500 rpm, para secagem do precipitado final os tubos, ou placas, permaneceram em temperatura ambiente por alguns minutos e guardados a -20 °C, até o momento do sequenciamento.

4.2.9 Análise automática e processamento das sequências

As amostras foram dissolvidas em 10 µL de formamida, submetidas à desnaturação por 5 min. a 95 °C, seguido de um rápido resfriamento em gelo. Em seguida, as amostras foram injetadas em analisador genético ABI 3500 (*Applied Biosystems by Thermo*) no protocolo de corrida *SeqStander*, capaz de determinar sequências de até 1000 nt.

As sequências obtidas foram analisadas com o programa *SeqManPro* da suíte de aplicativos DNASTAR 12 (LASERGENE, 2016). A identificação por comparação das sequências obtidas contra os bancos de dados (GenBank, DDBJ, EMBL) foi realizada através da ferramenta BLAST, configurada na opção BLASTN contra o banco não redundante (nr) (ALTSCHUL et al. 1990).

4.3 Confeção do mapa de restrição

As sequências de cada grupo de leveduras (padrão de cores) foram submetidas à digestão, *in silico*, com a enzima *Dde* I, utilizando a ferramenta NEBcutter[®] da plataforma BioLabs[®]. Essa ferramenta prevê o padrão a ser obtido após a digestão *in vitro*, etapa essencial no processo de validação de novos padrões.

4.4. Análise filogenética

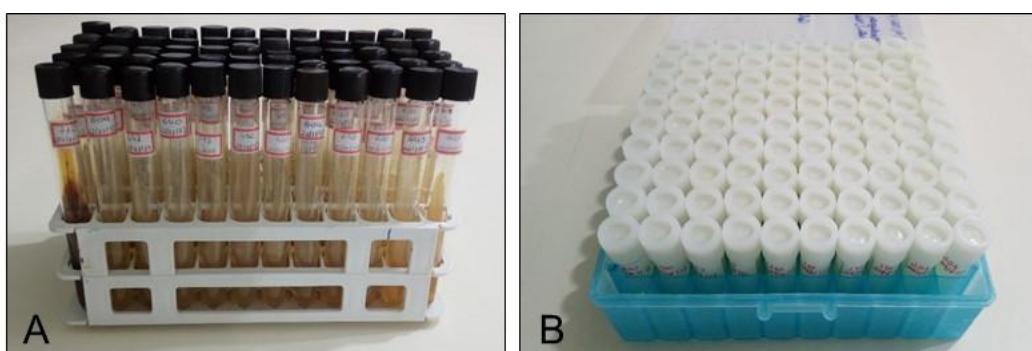
A história evolutiva foi inferida por um método probabilístico baseado no modelo de Tamura e Nei (1993), indicado pela ferramenta BestModel. A estabilidade da árvore foi determinada pelo teste estatístico de *bootstrap* a partir de 1000 replicatas (FELSENSTEIN, 1985). A análise envolveu quinze sequências de nucleotídeos não codificantes. As posições contendo *indels* foram eliminadas. Todas as etapas da análise

filogenética, incluindo o alinhamento múltiplo e a matriz de dissimilaridade, foram realizadas com o programa MEGA7 (KUMAR et al. 2016).

4.5 Preservação das leveduras

Os isolados obtidos foram submetidos à preservação em tubo inclinado (meio YPD sólido em tubo falcon de 40 mL) e criopreservados em freezer a -80 C, em solução YPD, 15% glicerol.

Figura 8 Representação dos métodos de preservação das leveduras: A- Tubo inclinado (meio YPD sólido em tubo falcon de 40 mL) e B- Criopreservados em freezer a -80 C, em solução YPD com 15% glicerol.

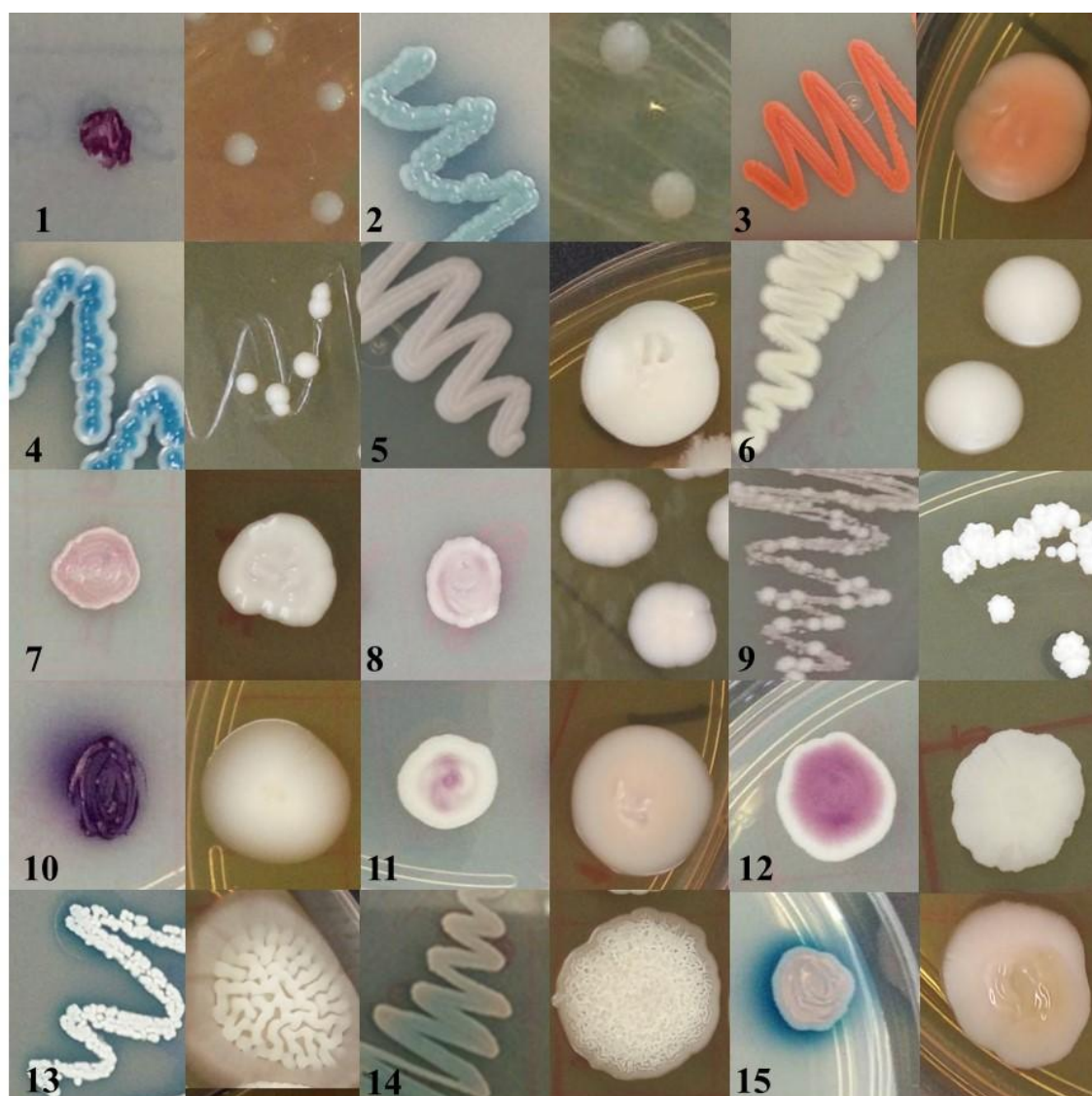


Fonte: Própria.

5 RESULTADOS

Foram isoladas 749 colônias de leveduras no total, considerando todos os substratos amostrados (pólen, mel, alimento larval e cera) dos três meliponários. Dessas, 402 leveduras foram isoladas na primeira coleta em Iranduba, no ninho de *M. interrupta* e 187 na segunda coleta. Em Parintins e Paraná de Parintins, também para *M. interrupta*, foram isoladas 60 e 87 leveduras, respectivamente. Já a partir dos substratos de *Cephalotrigona femorata*, coletados em Iranduba, foram isoladas 13 leveduras. Os 749 isolados foram subagrupados em 15 padrões distintos de cores (Fig. 9).

Figura 9. Características macroscópicas das leveduras isoladas. As características morfológicas das colônias foram observadas em meio cromogênico CHROMágar (lado esquerdo) e meio nutriente YPD (lado direito). Os números codificam os 15 isolados estudados, respectivamente: 1-A1, 2-V1, 3-V9, 4-110, 5-443, 6-591, 7-621, 8-626, 9-630, 10-632, 11-635, 12-642, 13-692, 14-698 e 15-707.



A partir da triagem em substrato cromogênico, foram selecionadas três amostras de cada padrão de cor para extração de DNA genômico (Fig. 10 e Tab. 2) e os testes subsequentes de genotipagem.

Figura 10 Perfil eletroforético representativo da extração de DNA de leveduras de pólen, mel, alimento larval e cera de *Melipona interrupta* e *Cephalotrigona femorata* em gel de agarose a 1%. M1 – marcador DNA λ de 10 ng; M2 - marcador DNA λ de 20ng SM01–SM15 amostras de DNA.

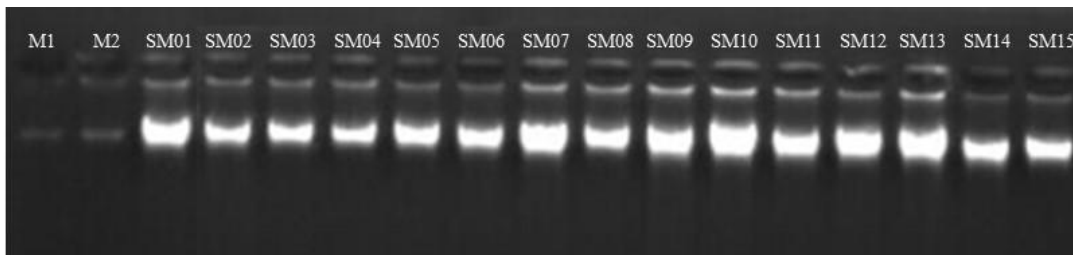


Tabela 3 Grau de pureza do DNA extraído de *Melipona interrupta* e *Cephalotrigona femorata*, quantificado em espectrofotômetro.

Linagem	260/280	260/230
SM01	2.17	2.30
SM02	2.15	2.23
SM03	2.15	2.24
SM04	2.13	2.15
SM05	2.15	2.18
SM06	2.14	2.13
SM07	2.14	2.21
SM08	2.10	2.05
SM09	2.12	2.12
SM10	2.13	2.18
SM11	2.11	2.18
SM12	2.13	2.13
SM13	2.10	2.11
SM14	2.10	2.05
SM15	2.11	2.22

A PCR convencional com os primers 377 e Uni-R, que flanqueiam o gene rRNA 18S e região D1/D1 do gene rRNA 26S, resultou em amplicons com aproximadamente 3000 pb (Fig. 11). A RFLP dessa região amplificada revelou que os 15 morfotipos escolhidos possuem também polimorfismos de fragmentos de restrição (Fig. 12). Os 15 perfis de RFLP foram validados a partir do sequenciamento do amplicon e digestão, *in silico*, das sequências com a enzima de restrição *Dde* I, cujos sítios de restrição estão detalhados nos mapas de restrição de cada padrão (Fig. 13 e Apêndice 1), sugerindo uma coleção de microrganismos realmente distintos.

Figura 11 Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% visualizado por brometo de etídio dos produtos da PCR da região 26S do rDNA amplificados a partir do pólen, mel, alimento larval e cera de *Melipona interrupta* e *Cephalotrigona femorata*.

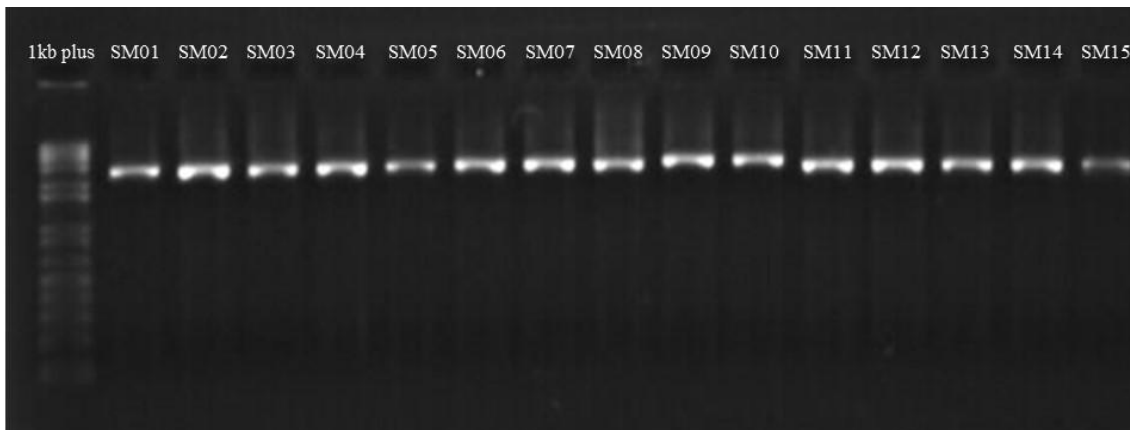


Figura 12 Perfis de restrição das leveduras. Linhagens: SM01 *Candida* sp., SM02 *Hyphopichia* sp., SM03 *Rhodotorula* sp., SM04 *Wickerhamiella versalitis*, SM05 *Debaryomyces* sp., SM06 *Candida orthopsilosis*, SM07 *Candida apícola*, SM08 *Metschnikowia* sp., SM09 *Zygosaccharomyces siamensis*, SM10 *Hanseniaspora opuntiae*, SM11 *Pichia* sp., SM12 *Pichia kluyveri*, SM13 *Trichosporon asahii*, SM14 *Kodamaea ohmeri* e SM15 *Aureobasidium* sp. O padrão de restrição foi avaliado a partir do uso do marcador 1kb Plus (ao lado) de cada perfil.

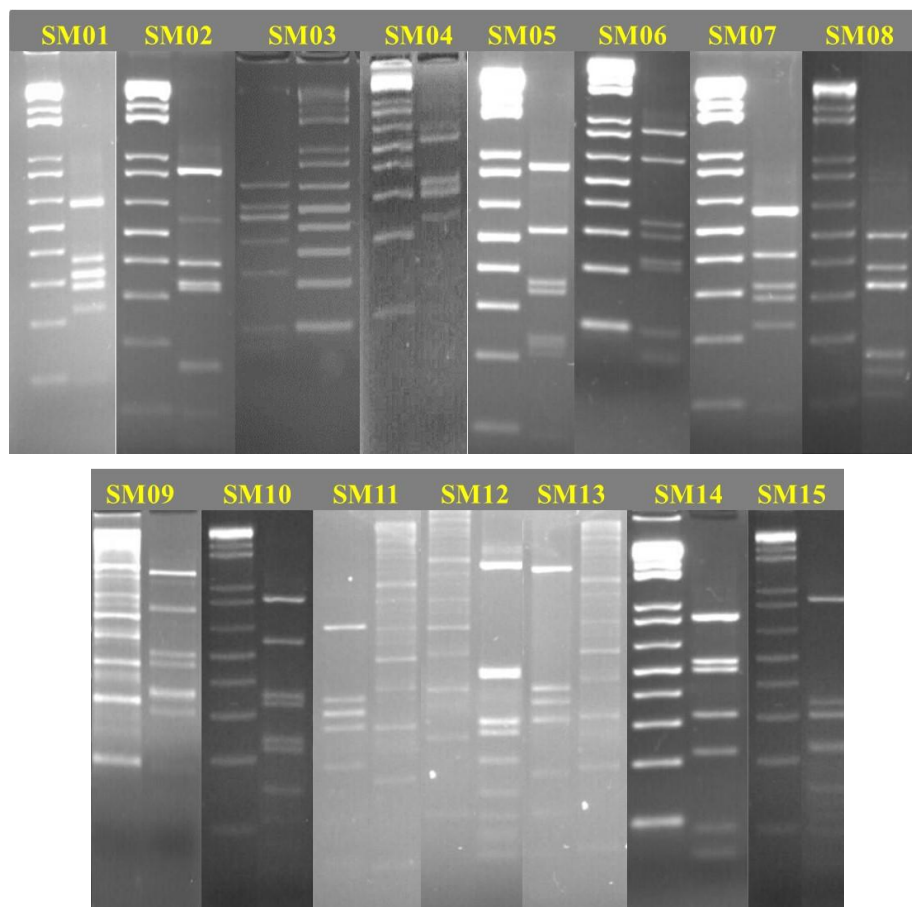
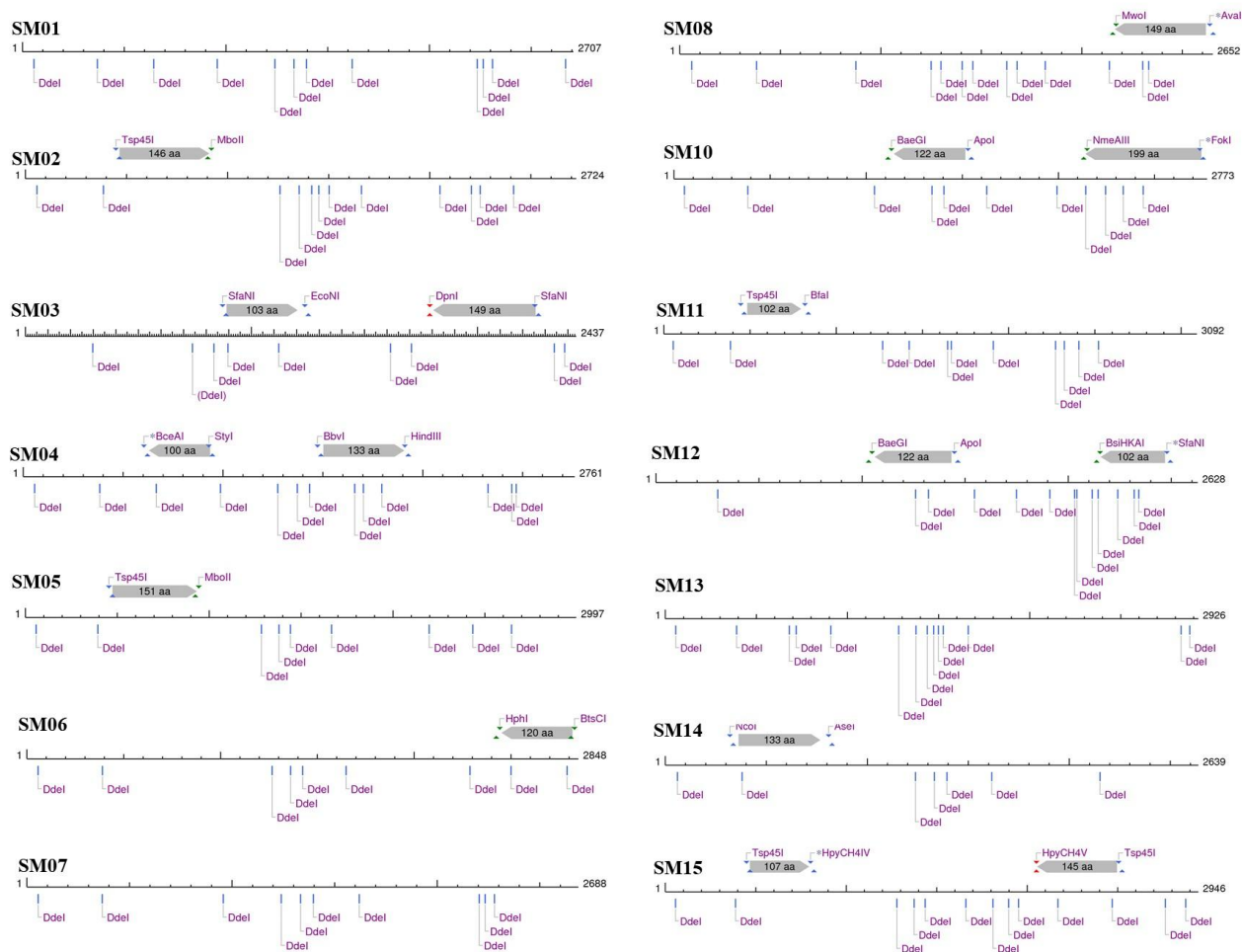


Figura 13 Mapa de restrição da digestão com a enzima *Dde* I prevista pela ferramenta *Nebcutter*. A análise *in silico* mostra a digestão de 14 linhagens de leveduras, são: SM01 *Candida* sp., SM02 *Hyphopichia* sp., SM03 *Rhodotorula* sp., SM04 *Wickerhamiella versalitis*, SM05 *Debaryomyces* sp., SM06 *Candida orthopsilosis*, SM07 *Candida apícola*, SM08 *Metschnikowia* sp., SM10 *Hanseniaspora opuntiae*, SM11 *Pichia* sp., SM12 *Pichia kluyveri*, SM13 *Trichosporon asahii*, SM14 *Kodamaea ohmeri* e SM15 *Aureobasidium* sp.



A grande maioria dos perfis de restrição não foi identificada entre os padrões estabelecidos por Mota e Nóbrega, (2013). Assim, foi necessário fazer uma busca em bancos de dados de seqüências de nucleotídeos para identificação em nível de espécie, preferencialmente, ou em nível de gênero. Apesar de ter cerca de 3.000 pares de bases sequenciados, somente as seqüências que compreendem o ITS1, ITS2 e D1/D2 foram utilizadas para fins de comparação, isto porque as seqüências disponíveis nos bancos de dados em geral estão limitadas a estas regiões, a qualidade das seqüências obtidas está no eletroferograma (Fig. 14). Com essa abordagem, foram identificadas as 15 linhagens apresentadas nesse trabalho, sete em nível de gênero (SM01 *Candida* sp., SM02 *Hyphopichia* sp., SM03 *Rhodotorula* sp., SM05 *Debaryomyces* sp., SM08 *Metschnikowia* sp., SM11 *Pichia* sp. e SM15 *Aureobasidium* sp.) e oito em nível de

espécie (SM04 *Wickerhamiella versalitis*, SM06 *Candida orthopsilosis*, SM07 *Candida apícola*, SM10 *Hanseniaspora opuntiae*, SM12 *Pichia kluyveri*, SM13 *Trichosporon asahii*, SM14 *Kodamaea ohmeri*, e SM09 *Zygosaccharomyces siamensis*) (Tabela 3 e Apêndice 2).

Figura 14 Eletroferograma gerado pelo analisador genético correspondente aos *primers* internos 607 e 377 da linhagem SM15 (707), mostrando a qualidade das sequências.

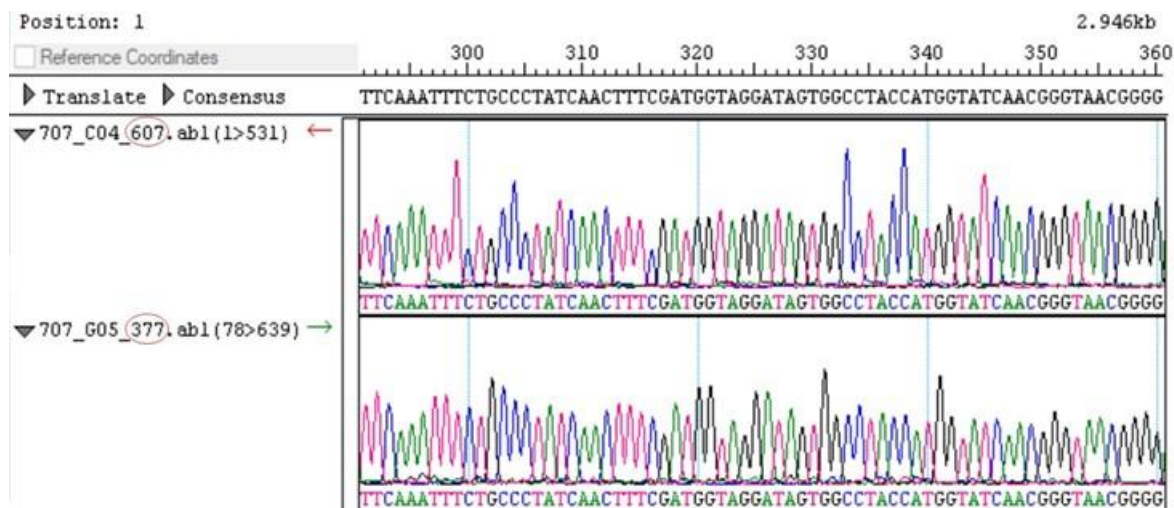


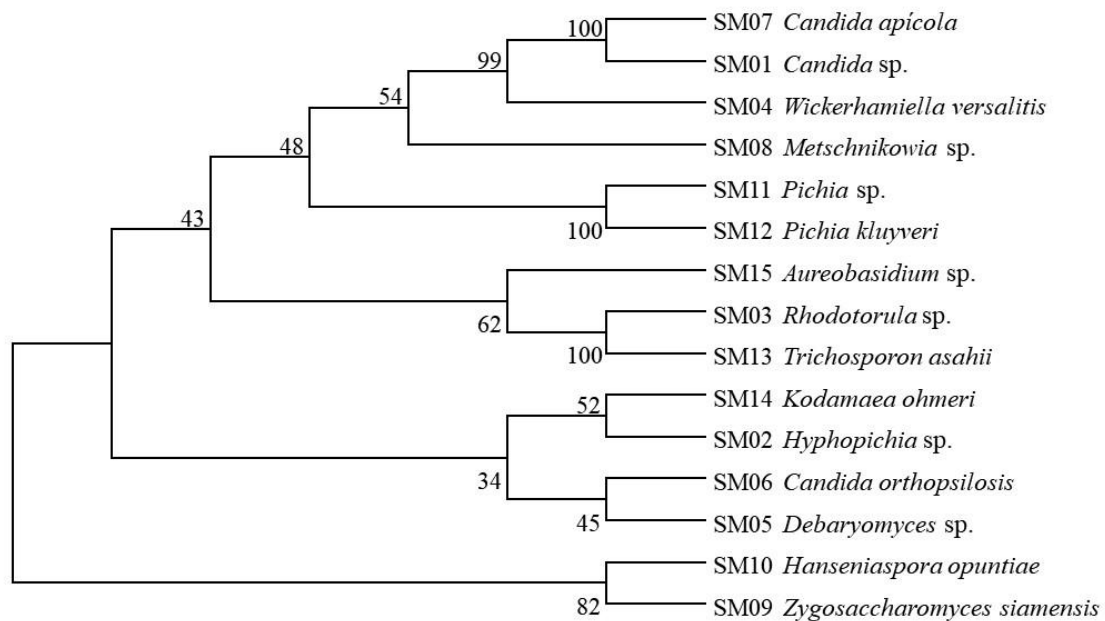
Tabela 4 Identificação de oito linhagens em nível de gênero e sete em nível de espécie, baseado no critério de dissimilaridade $\geq 1\%$ a partir do alinhamento de sequências que compreendem os marcadores ITS1, ITS2 e D1/D2.

Linhagem	Identificação	Genbank ID	Cobertura (%)	E-value	Identidade (%)
SM10	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	KC870065.1	100	0.0	99.90
SM03	<i>Rhodotorula</i> sp.	JX310560.1	100	0.0	99.84
SM09	<i>Zygosaccharomyces siamensis</i>	MF420378.1	53	0.0	99.80
SM12	<i>Pichia kluyveri</i>	JX188199.1	96	0.0	99.78
SM13	<i>Trichosporon asahii</i>	KT282395.1	100	0.0	99.74
SM14	<i>Kodamaea ohmeri</i>	KC111448.1	99	0.0	99.56
SM04	<i>Wickerhamiella versalitis</i>	KY106878.1	95	0.0	99.47
SM06	<i>Candida orthopsilosis</i>	FN812686.1	100	0.0	99.46
SM15	<i>Aureobasidium</i> sp.	FN665418.1	100	0.0	99.36
SM07	<i>Candida</i> sp.	EU926480.1	94	0.0	98.80
SM05	<i>Debaryomyces</i> sp.	GQ458025.1	100	0.0	98.40
SM11	<i>Pichia</i> sp.	DQ104714.1	97	0.0	98.25

<i>opuntiae</i>								
SM14 <i>Kodamaea ohmeri</i>						6		6
Total	207	8	299	5	76	148		749

A análise filogenética com base nas sequências obtidas nesse projeto apresenta o padrão característico de grupos polifiléticos, com baixa repetição de padrões para alguns ramos (*bootstrap* < 48%) ou ainda a separação de um mesmo gênero em ramos diferentes (Fig. 15). O gênero *Candida* é o mais polimórfico, isso porque esse gênero é dito virtual ou transitório, onde são classificadas as leveduras imperfeitas, isto é, sem o ciclo definido de reprodução sexuada. Entretanto, a partir da definição da fase sexuada as leveduras são reclassificadas para um gênero mais apropriado, em função da estrutura reprodutiva.

Figura 15 Análise da história evolutiva das leveduras associadas às abelhas sem ferrão pelo método da máxima verossimilhança. A árvore apresentada refere-se ao consenso do *bootstrap* e mostra apenas as relações evolutivas, sem considerar o tempo decorrido. Os números próximos aos nós referem-se à taxa de repetição para cada relação, tomadas a partir de 1000 replicatas. SM se referem às linhagens propostas no presente trabalho



6 DISCUSSÃO

Os insetos estão associados a microrganismos por meio de interações simbióticas, que provavelmente contribuíram para seu sucesso evolutivo. (FELDHAAR e GROSS, 2009). As leveduras, associadas aos insetos, vêm sendo descritas em diversas ordens, como: Neuroptera (NGUYEN et al. 2007), Lepidoptera (WITZGALL et al. 2012), Isoptera (BAUWENS et al. 2013), Hemiptera (PODSIADŁO et al. 2018), Coleoptera (JANICE et al. 2011), Diptera e finalmente, na ordem himenóptera, cujos principais representantes são os insetos sociais.

Os ninhos de insetos sociais fornecem uma fonte rica de alimentos para a sobrevivência de muitos microrganismos que, por sua vez, oferecem vários benefícios para os seus hospedeiros, como nutrientes e proteção contra patógenos. (MUELLER et al. 2005). Os estudos sobre identificação de leveduras associadas aos meliponídeos têm gerado dados taxonômicos importantes, pois, geralmente é reportado a identificação de novas espécies, tanto associada às provisões da colmeia (pote de pólen e pote de mel), quanto ao intestino das abelhas e no material fecal (ROSA et al. 2003; DANIEL et al. 2013; PALUDO et al. 2018).

Treze gêneros de leveduras foram identificados neste estudo (*Aureobasidium*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hyphopichia*, *Kodamaea*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Wickerhamiella* e *Zygosaccharomyces*) e espécies desses gêneros geralmente estão associadas a flores efêmeras e insetos florícolas (LACHANCE e KURTZMAN, 2011). Estes dados corroboram com os achados de Rosa e colaboradores (2003), onde, ao estudar provisões alimentares de abelha sem ferrão, identificaram leveduras dos gêneros: *Aureobasidium*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Pseudozyma*, *Starmerella* e várias espécies de *Cryptococcus* e *Rhodotorula*.

É atribuído às leveduras um papel metabolicamente ativo no processamento e transformação do pólen dentro dos ninhos, pois enzimas secretadas por esses microrganismos contribuem para a biodisponibilização de nutrientes do substrato vegetal, melhorando assim a qualidade nutricional do alimento. Também são atribuídas às relações simbióticas entre leveduras e insetos, funções anabólicas (incluindo a síntese de aminoácidos, vitaminas, lipídios, esteróis, feromônios) e protetivas, como a

degradação de compostos tóxicos à colmeia (VEGA e DOWD, 2005, STARMER e LACHANCE, 2011; PALUDO et al. 2018; VAN ARNAM et al. 2018).

Os meliponídeos têm como preferência alimentar, o pólen fermentado (VOLLET-NETO et al. 2016), entretanto, o envolvimento direto das leveduras na biodisponibilização e/ou conversão metabólica dos nutrientes encontrados no pólen e mel ainda não estão elucidados. Sabe-se que o pólen fermentado apresenta características físico-químicas distintas do pólen *in natura*. Há indícios de produção de álcool e ácido acético, provenientes da fermentação promovida pelas leveduras (REBELO et al. 2016), que seriam os responsáveis pelo odor acre característico do pólen de *M. interrupta*.

A biotransformação do pólen, em alimento foi a principal motivação desse projeto, pois pode ser fonte de novas enzimas com potencial aplicação na indústria biotecnológica. Assim, o delineamento experimental do projeto esteve voltado mais para a identificação de leveduras diferentes do que para a relação ecológica entre leveduras e abelhas ou um estudo restrito à diversidade.

A primeira coleta resultou em maior número de isolados porque o esforço amostral foi maior. Entretanto, entre as 402 leveduras isoladas dos substratos da abelha *M. interrupta* em Iranduba, foram identificadas apenas duas espécies diferentes: SM01 *Candida* sp. (401 isolados) e SM04 *Wickerhamiella versalitis* (1 isolado). É notável a baixa diversidade de leveduras isoladas da abelha *M. interrupta* em relação à abelha *C. femorata* coletada no mesmo meliponário (n=13 isolados). O extenso trabalho de isolamento de leveduras foi inicialmente desenhado para garantir a maior cobertura possível da diversidade existente, entretanto a grande repetição e a baixa diversidade reorientaram as coletas subsequentes que objetivaram alcançar um core diverso de leveduras.

A regra de ouro que define 3% de dissimilaridade para agrupamento em nível de espécie foi estabelecida com base na sequência do gene rRNA 18S, cujo produto compõe a subunidade menor do ribossomo, entretanto, quando se amplia a janela de análise contendo 4 regiões variáveis, a adoção dos 3% pode agrupar diferentes espécies, principalmente quando se trabalha com um grupo polifilético, como é o gênero *Candida* (ALID et al. 2013; PORTER et al. 2016). Portanto, nesse estudo foi adotado um *cutoff* conservador até que estudos futuros sejam realizados, caracterizando padrões de cultivo e microcultivo, bioquímicos e eventualmente outras regiões gênicas sequenciadas.

Adotando esse critério, foram identificadas oito linhagens em nível de espécie e sete linhagens em nível de gênero. O gênero *Metschnikowia* contem espécies intimamente associadas às flores. Há relatos de isolamento a partir do néctar, corola das flores, frutos e outras partes das plantas. Neste estudo, foi descrito pela primeira vez a ocorrência de levedura deste gênero (SM08 *Metschnikowia* sp) a partir do pólen e mel de *M. interrupta*. A presença dessas leveduras em diversos habitats pode estar associada ao fato de que esses fungos são vetorizados por meio de insetos como abelhas e moscas (LACHANCE et al. 2001). Estudos recentes têm mostrado que no néctar floral há presença de espécies de *Metschnikowia* produzindo compostos voláteis atrativos para os insetos que se alimentam em flores. O nicho dessa levedura está se tornando melhor compreendido com o conhecimento sobre sua diversidade genética e sua relação de mutualismo entre planta-polinizador (VEGA e HERRERA, 2012; RERING et al. 2017).

A linhagem SM09 *Zygosaccharomyces siamensis* foi isolada no presente estudo do mel de *M. interrupta*. Outras espécies deste gênero têm sido isoladas do estômago, pólen e mel de *Apis mellífera* (*Zygosaccharomyces* sp. e *Zygosaccharomyces favi*) (GILLIAM et al. 1974; CADEZ et al. 2015), assim como em pelotas de lixo da abelha sem ferrão *Tetragonista angustula* (*Zygosaccharomyces machadoi*). A função dessas leveduras no ninho está relacionada com a deterioração do alimento rico em carboidratos (PIMENTEL et al. 2005). No entanto, em estudo recente, realizado por Paludo e colaboradores (2018), foi descrito pela primeira vez uma relação de simbiose mutualística íntima entre larvas da abelha sem ferrão *Scaptutrigona depilis* com a levedura do gênero *Zygosaccharomyces* sp., provavelmente por fornecer precursores esteroides essenciais para a metamorfose da pupa, por meio da alimentação.

Os nossos achados são inéditos sobre a micobiota associada às abelhas sem ferrão e promissores numa perspectiva de melhor compreensão da ecologia de comunidades de leveduras associadas às abelhas (e insetos sociais em geral) e também biotecnológica, pois entre as linhagens identificadas, existem espécies que vislumbram aplicação na bioindústria, como: i) *Aureobasidium* sp., gênero composto por leveduras de importante aplicabilidade na bioindústria, capazes de produzir enzimas (amilase, proteinase, lipase, celulase, xilanase, mananase e transferases, antibióticos e polissacarídeos (PRASONGSUK et al. 2018); ii) *Debaryomyces* sp. com espécies capazes de acumular substâncias químicas finas lipossolúveis de alto valor, como carotenóides, surfactantes e aromatizantes, tem aplicação aminoxidase na degradação de aminas biogênicas em alimentos (BÄUMLISBERGER et al. 2015), são utilizadas no

controle biológico de fungos patogênicos em alimentos (MEDINA-CÓRDOVA et al. 2018), na produção de toxinas assassinas para o controle de doenças pós-colheita em indústrias agrícolas (ÇORBACI e UÇAR, 2017) e produção de álcoois secundários quirais, enantiomericamente puros, que podem ser facilmente convertidos em diferentes grupos funcionais (SAHIN, 2017); iii) *Kodamaea ohmeri*, utilizada na cofermentação de açúcares mistos, com excelente crescimento, tolerância a inibidores e produção de etanol em hidrolisados de palha de arroz (SHARMA et al. 2018) e; iv) *Pichia kluyveri* com potencial aromático e pectinolítico na fermentação mista de cacau (CRAFACK et al. 2013).

Quinze linhagens obtidas em três locais distintos de coleta é um número representativo, pois em geral, leveduras são restritivas em relação à colonização mútua de um mesmo habitat, em decorrência de um comportamento denominado *killer*, que é resultante da produção de toxinas *killer* (SANGORRIN, 2001). Assim, os dados obtidos neste trabalho em relação às leveduras associadas às abelhas *M. interrupta* e *C. femorata* abrem novas perspectivas para estudos posteriores com abordagens ecológicas e biotecnológicas, em especial (1) confirmação da identificação em nível de espécie por métodos dependentes de cultivo das oito linhagens identificadas em nível de espécie pela abordagem molecular; (2) definir se as sete linhagens identificadas em nível de gênero são de fato novas espécies, (3) prospectar biocompostos e bioprocessos nessas quinze linhagens, em especial enzimas, antioxidantes, aromatizantes, pigmentos naturais e antimicrobianos.

7 CONCLUSÃO

- ✓ O uso combinado do método de cultivo em YPD e triagem em CHROMágar permitiram pela primeira vez o acesso a leveduras associadas às abelhas nativas;
- ✓ A técnica de RFLP foi validada para amostras ambientais, a qual pode servir de modelo para estudos posteriores;
- ✓ Catalogou-se 15 linhagens de leveduras, das quais, seis são sugestivas para novas espécies e quatro apresentam potencial biotecnológico em diferentes ramos na bioindústria;
- ✓ Os achados inéditos deste trabalho contribuíram com os bancos de dados por meio do depósito de sequências nucleotídicas completas de grande interesse na identificação de leveduras.

8 PERSPECTIVAS

- ✓ Os dados obtidos permitem reiterar a necessidade de estudos ecológicos a fim de compreender o tipo de relação simbiótica que ocorre entre as leveduras e abelhas nativas;
- ✓ Recomenda-se a realização da caracterização morfológica, bioquímica e filogenética para a identificação das leveduras sugestivas como novas espécies e ainda, novas parcerias com grupos de pesquisas especializados em taxonomia de leveduras;
- ✓ E, numa perspectiva biotecnológica, sugere-se a disponibilização das leveduras para prospecção de processos e biomoléculas de interesse biotecnológico em trabalhos futuros, principalmente das linhagens apontadas com potenciais aplicações na bioindústria (*Debaryomyces* sp. e *Aureobasidium* sp.).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990).

BARRIGA, E.J.C.; LIBKIND, D.; BRIONES, A.I.; IRANZO, J.Ú.; PORTERO, P.; ROBERTS, I.; JAMES, S.; MORAIS, P. B.; ROSA, C. A. Yeasts biodiversity and its significance: case studies in natural and human-related environments, ex situ preservation, applications and challenges. In: GRILLO, O.; VENORA, G. (Eds.), *Changing Diversity in Changing Environment*. InTech – Open Access Company, 55–86p (2011).

BÄUMLISBERGER, M.; MOELLECKEN, U.; KÖNIG, H.; CLAUS, H. The Potential of the yeast *Debaryomyces hansenii* H525 to degrade biogenic amines in food. *Microorganisms*. 3(4): 839-850 (2015).

BAUWENS, J.; MILLET, C.; TARAYRE, C.; BRASSEUR, C.; DESTAIN, J.; VANDENBOL, M.; THONART, P.; PORTETELLE, D.; DE PAUW, E.; HAUBRUGE, E.; FRANCIS, F. Symbiont diversity in reticulitermes santonensis (Isoptera: Rhinotermitidae): investigation strategy through proteomics. *Environ Entomol.* 42(5): 882-7 (2013).

BRAND, H. O pólen coletado pelas abelhas sem ferrão (Anthophila , Meliponinae),
Nota (Short communication). *Acta Biol. Par., Curitiba.* 40 (3-4): 129-133 (2011).

ČADEZ, N.; FÜLÖP, Z.; DLAUCHY, D.; PÉTER, G. *Zygosaccharomyces favi* sp. nov., an obligate osmophilic yeast species from bee bread and honey. *Antonie van Leeuwenhoek.* 107 (3): 645–654 (2015).

CAMARGO, J.M.F. Biogeografia de Meliponini (Hymenoptera, Apidae, Apinae): A Fauna Amazônica. *Anais do Encontro Sobre Abelhas, Ribeirão Preto, SP, Brasil.* 1(194): 46-59, 194 (1994).

CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.R.M. Meliponini Lepeletier, 1836. Em MOURE, J.S.; URBAN, D.; MELO, G.A.R (Orgs). *Catálogo das Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) na Região Neotropical - versão online* (2013). Disponível em <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acessado em 12 /07/2018.

CAMPOS, L.A.O. Abelhas indígenas sem ferrão: o que são? Informe agropecuário, Belo Horizonte. 13 (149): 3-6 (1987).

ÇORBACI, C.; UÇAR, F.B. Production and optimization of killer toxin in *Debaryomyces hansenii* strains. Braz. Arch. Biol. Technol. 60: e170339 (2017).

CORTOPASSI-LAURINO, M.; ASSIS, M. da G.P.; NASCIMENTO, R.V. Observações de visita a um meliponário nos arredores de Manaus-AM. Revista Mensagem Doce, APACAME. 110, 4p. (2011). Disponível em: <http://www.apacame.org.br/msgdoce.htm>

COUTO, F. M. M. Leveduras produtoras de b-glicosidase e pectinase. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Biologia de fungos da Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 66p. (2008).

CHRISTENSEN, T.A. Methods in insect sensory neuroscience: CRC Press (2010).

CRAFACK, M.; MIKKELSEN, M.B.; SAERENS, S.; KNUDSEN, M.; BLENNOW, A.; LOWOR, S.; TAKRAMA, J.; SWIEGERS, J.H.; PETERSEN, G.B.; HEIMDAL, H.; NIELSEN, D.S. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. International Journal of Food Microbiology. 167, 103–116 (2013).

CRUZ, T.M.L.; COUTO F.M.M.; FRANÇA, G.S.; LARANJEIRA, D.; NEVES, R.P. Atividade da celulase de leveduras isoladas de frutos de meloeiro. In: IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (2009).

DANIEL, H.M.; ROSA, C.A.; THIAGO-CALAÇA, P.S.S.; ANTONINI, Y.; BASTOS, E.M.A.F.; EVRARD, P.; HURET, S.; FIDALGO-JIMÉNEZ.; LACHANCE, M.A. *Starmerella neotropicalis* f. a., sp. nov., a yeast species found in bees and pollen. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 63, 3896-3903 (2013).

DE BARY, A. Die Erscheinung der Symbiose. Straburg: Verlag Trubner (1879).

DOUGLAS, A.; SMITH, D. Are endosymbioses mutualistic? Trends in ecology and evolution. 4 (11): 350-352 (1989).

DOUGLAS, A.E. The microbial dimension in insect nutritional ecology. Nutritional Ecology. 23, 38-47 (2009).

- DOWD, P.F. Insect fungal symbionts: a promising source of detoxifying enzymes. *J Indust Microbiol.* 9, 149–161 (1992).
- ENGEL, P.; MORAN, N.A. The gut microbiota of insects-diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews.* 37, 699-735 (2013).
- FELL, J.W. Rapid identification of yeast species using three primers in a polymerase chain reaction. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 2, 174-180 (1993).
- FELDHAAR H.; GROSS R. Insects as hosts for mutualistic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 299, 1–8 (2009).
- FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791 (1985).
- FERREIRA, R.C. *Avaliação das características físico-químicas e microbiológicas do pólen da Melipona scutellaris Latreille submetido a diferentes processos de desidratação.* Dissertação, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia. 105p. (2012).
- FREITAS, B. M. Meliponíneos. A vida das abelhas. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, CD-ROM (2003).
- FOKKEMA, N.J.; DEN-HOUTER J.G.; KOSTERMAN Y.J.C.; NELIS A.L. Manipulation of yeasts on field-grown wheat leaves and their antagonistic effect on *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 72, 19-29 (1979).
- GIBSON, C.M.; HUNTER, M.S. Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects. *Ecology Letters.* 13 (2): 223-234 (2010).
- GILLIAM, M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiol. Lett.* 155, 1-10 (1997).
- GORI, K.; SORENSEN, L.M.; PETERSEN, M.A.; JESPERSEN, L.; ARNEBORG, N. *Debaryomyces hansenii* strains differ in their production of flavor compounds in a cheese-surface model. *Microbiology open.* 1 (2): 161-168 (2012).
- HERBERT, E.W.JR; SHIMANUKI, H. Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidologie.* 9 (1): 33-40 (1978).

INGLIS, G.D.; SIGLER, L.; GOETTEL, M.S. Aerobic microorganisms associated with alfalfa leafcutter bees (*Megachile-Rotundata*). *Microb. Ecol.* 26, 125-143 (1993).

JANICE L. HOUSEKNECHT, ERICA L. HART, SUH, S.U.; ZHOU, J.J. Yeasts in the *Sugiyamaella* clade associated with wood-ingesting beetles and the proposal of *Candida bullrunensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 61, 1751–1756 (2011).

KAČANIOVÁ, M.; JURÁČEK, M.; CHLEBO, R.; KNAZOVICKA, V.; KADASHORÁKOVÁ, M.; KUNOVA, S.; LEJKOVÁ, J.; HAŠČÍK, P.; MAREČEK, J.; SIMKO, M. Mycobiota and mycotoxins in bee pollen collected from different areas of Slovakia. *Journal of Environmental Science and Health, Part B.* 46, 623-9 (2011).

KALTENPOTH, M.; ENGL, T. Defensive microbial symbionts in Hymenoptera. *Funct. Ecol.* 28, 315–327 (2013).

KROISS, J.; KALTENPOTH, M.; SCHNEIDER, B.; SCHWINGER, M.G.; HERTWECK, C.; MADDULA, R.K.; STROHM, E.; SVATOS, A. Symbiotic Streptomycetes provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring. *Nat. Chem. Biol.* 6, 261–263 (2010).

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution.* 33:1870-1874 (2016).

KURTZMAN, C.P. Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast.* Volume 10, Issue 13 December. 1727-1740p (1994).

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. *The Yeasts, a Taxonomic Study.* Elsevier Science, Amsterdam (1998).

LACHANCE, M.A.; BOWLES, J.M.; CHAVARRIA-DIAZ, M.M.; JANZEN, D.H. *Candida cleridarum*, *Candida tilneyi*, and *Candida powellii*, three new yeast species isolated from insects associated with flowers. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1201-1207 (2001).

LACHANCE, M. A.; KURTZMAN, C. P. *Kodamaea* Y. Yamada, T. Suzuki, Matsuda.; Mikata emend. Rosa, Lachance, Starmer, Barker, Bowles and Schlag-Edler (1999). In

The Yeasts – a Taxonomic Study, 5th edn, pp. 483–490. Edited by C. P. Kurtzman, J. W. Fell and T. Boekhout. Amsterdam: Elsevier (2011).

MACHADO, J.O. Simbiose entre as abelhas sociais brasileiras (Meliponinae, Apidae) e uma espécie de bactéria. *Ciência e Cultura*. 23, 625–633 (1971).

MARCHINI, L.C.; DOS REIS, V.D.A.; MORETI, A.C.C.C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. *Ciência Rural*. 36, 949-953 (2006).

MAIA-SILVA, C.; HRNCIR, M.; SILVA, C.I.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. Survival strategies of stingless bees (*Melipona subnitida*) an unpredictable environment, the Brazilian tropical dry forest. *Apidologie*. 46, 631–643 (2015).

CÓRDOVA, N.M.; MENDOZA, S.R.; HERNÁNDEZ-MONTIEL, L.G.; ÂNGULO, C. The potential use of *Debaryomyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. *Biological Control*. 121, 216-222 (2018).

MICHENER, C.D. The social behavior of the bees. Harvard University Press, Massachusetts (1974).

MICHENER, C.D. The Bees of the World. Johns Hopkins, Baltimore. MD (2000).

MICHENER, C.D. The Bees of the World. 2nd Edition, John Hopkins University Press, Baltimore (2007).

MICHENER, C.D. The Meliponini. In: Vit P, Pedro SRM, Roubik D (eds) Pot-honey: a legacy of stingless bees. Springer, New York. 3–17p. (2013).

MONTES DE OCA, R.; SALEM, A.Z.M.; KHOLIF, A.E.; MONROY, H.; PÉREZ, L.S.; ZAMORA, J.L.; GUTIÉRREZ, A. Yeast: Description And Structure. In book: YEAST ADDITIVE AND ANIMAL PRODUCTION, Publisher: PubBioMed Central Research Publishing Services (India), Editors: A.Z.M. Salem, A.E. Kholif, A.K. Puniya. 4-13p. (2016).

MOTA, A.J.; NOBREGA, F.G. Unequivocal Identification of Fungi, Especially *Candida* and related species of medical interest. *J Med Diagn Meth*. 2 (142): 1-13 (2013).

MUELLER, U.G.; GERARDO, N. Fungus-farming insects: Multiple origins and diverse evolutionary histories. *Proceedings of the National Academic Society*, Washington .99 (24): 15247-15249 (2002).

NACIF-MARÇAL L. *Comunidades bacterianas associadas a colônias de abelhas amazônicas sem ferrão da espécie Melipona seminigra: diversidade e potencial enzimático*. Tese (Doutorado), Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas. 66p (2017).

NGUYEN, N.H.; SUH, S.O.; BLACKWELL, M. Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from neuroptera and other insects. *Mycologia*. 99, 842–858 (2007).

NOGUEIRA-NETO, P. *Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão*. São Paulo: Ed. Nogueirapis. 446p. (1997).

OLIVEIRA, M.L.; MORATO, E.F.; GARCIA, M.V.B. Diversidade de espécies e densidade de ninhos de abelhas sociais sem ferrão (Hymenoptera: Meliponinae) em floresta de terra firme na Amazônia Central. *Rev. Bras. Zool.* 12(1):13-14 (1995).

REBELO, K. S. *Caracterização química, físico-química e espectroscópica do pólen coletado por abelhas sem ferrão amazônicas*. Dissertação, Programa de pós-graduação em biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas. 112p. (2011).

REBELO, K.S.; FERREIRA, A.G.; CARVALHO-ZILSE, G.A. Physicochemical characteristics of pollen collected by Amazonian stingless bees. *Ciência Rural*, Santa Maria. 46 (5): 927-932 (2016).

RIBEIRO, J. G.; SILVA, R. A. Estudo comparativo da qualidade de pólen apícola fresco, recém processado, não processado e armazenado em freezer e pólen de marca comercial através de análises físico-químicas. *Tecnologia & Desenvolvimento Sustentável*, Ano 1, março (2007).

ROSE, A.H.; Harrison, J.S. (Eds.), *The yeasts* Academic Press: New York. 123-180 (1987).

PEDRO, S.R.M. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*. 61 (4): 348-354 (2014).

PIMENTEL, M.R.C.; ANTONINI, Y.; MARTINS, R.P.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. *Candida riodecensis* and *Candida cellae*, two new yeast species from the *Starmerella* clade associated with solitary bees in the Atlantic rain forest of Brazil. *FEMS Yeast Research*. 5, 875–879 (2005).

PRASONGSUK, S.; LOTRAKUL, P.; ALI, I.; BANKEEREE, W.; PUNNAPAYAK, H. The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology. *Folia Microbiol (Praha)*. 63 (2): 129-140 (2018).

PODSIADŁO, E.; MICHALIK, K.; MICHALIK, A.; SZKLARZEWICZ, T. Yeast-like microorganisms in the scale insect *Kermes quercus* (Insecta, Hemiptera, Coccothraupidae: Kermesidae). Newly acquired symbionts?. *Arthropod Struct Dev*. 47 (1): 56-63 (2018).

PORTELA, E. M. R.; GALLEGOS, J. C. S. Alimentación de las abejas: Aplicación práctica de los fundamentos fisiológicos de la nutrición. Portada y gráficos: Elena M. Roblas Portela. 195p. (1999).

RAVEN, P.H.; EVERT, E.F.; EICHHORN, S.E. *Biología Vegetal*, 7^o ed. Guanabara Koogans. RJ (2007).

REBELO, K.S.; FERREIRA, A.G.; CARVALHO-ZILSE, G.A. Physicochemical characteristics of pollen collected by Amazonian stingless bees. *Ciência Rural*, Santa Maria. 46 (5): 927-932 (2016).

RERING, C.C.; BECK, J.J.; HALL, G.W.; MCCARTNEY, M.M.; VANNETTE, R.L. Nectar-inhabiting microorganisms influence nectar volatile composition and attractiveness to a generalist pollinator. *New Phytologist*. 1-10 (2017).

ROSA, C.A.; VIANA, E. M.; MARTINS, R. P.; ANTONINI, Y.; LACHANCE, M.A. *Candida batistae*, a new yeast species associated with solitary digger nesting bees in Brazil. *Mycologia*. 91, 428-433 (1999).

ROSA, C.; LACHANCE, M.A.; SILVA, J.O.C.; TEIXEIRA, A.C.; MARINI, M.M.; ANTONINI, Y.; MARTINS, R.P. Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Research*. 4, 271-275 (2003).

ROSA, C.R.; LACHANCE, M.A. *Zygosaccharomyces machadoi* sp. n., a yeast species isolated from a nest of the stingless bee *Tetragonisca angustula*. *Lundiana* 6 (supplement). 27-29 (2005).

ROUBIK, D.W.; WHELER, Q.D. Flightless beetles and stingless bees: Phoresy of *Scotocryptine beetles* (Leiodidae) on their meliponine hosts (Apidae). *J. Kansas Entomol. Soc.* 55, 125-135 (1982).

SACHS, J.L.; SKOPHAMMER, R.G.; REGUS, J.U. Evolutionary transitions in bacterial symbiosis. *PNAS.* 10, 10800-10807 (2011).

SANGORRIN. Killer behaviour in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from Northwestern Patagonia (Argentina). 41 (2):105-113 (2001).

ŞAHİN, E. *Debaryomyces hansenii* as a new biocatalyst in the asymmetric reduction of substituted acetophenones, *Biocatalysis and Biotransformation.* (35):5, 363-371 (2017).

SHARMA, S.; ARORA, A.; SHARMA, P.; SINGH, S.; NAIN, L.; PAUL, B. Notable mixed substrate fermentation by native *Kodamaea ohmeri* strains isolated from *Lagenaria siceraria* flowers and ethanol production on paddy straw hydrolysates. *Chemistry Central Journal.* 12:8 (2012).

SAPP, J. *Evolution by association: a history of symbiosis.* Oxford University Press, Oxford (1994).

STARMER, W. T.; LACHANCE, M.A. *Yeast Ecology.* In: *The Yeasts A Taxonomic Study.* 5th Ed. KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. Elsevier: Amsterdam. 65-86p (2011).

TAMURA K.; NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution.* 10:512-526 (1993).

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

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia.* Artmed Editora SA. Ed 10, 123-132p. (2012).

UEIRA-VIEIRA, C.; ALMEIDA, L.O.; ALMEIDA, F.C.; AMARAL, I.M.R.; BRANDEBURGO, M.A.M.; BONETTI, A.M. Scientific note on the first molecular detection of the acute bee paralysis virus in Brazilian stingless bees. *Apidologie*. 46, 628–630 (2015).

URUBSCHUROV, V.; JANCZYK, P. Biodiversity of yeasts in the gastrointestinal ecosystem with emphasis on its importance for the host. Edited by Oscar Grillo and Gianfranco Venora, 277 (2011).

VAN ARNAM, E.B.; CURRIE, C.R.; CLARDY, J. Defense contracts: molecular protection in insect-microbe symbioses. *Chem. Soc. Rev.* (2018). VEGA, F.E.; DOWD, P.F. The role of yeasts as insect endosymbionts. In *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*; Vega, F.E., Blackwell, M., Eds.; Oxford University Press: New York, NY, USA. 211–243 (2005).

VEGA, F.E.; POSADA, F.; CATHERINE AIME, M.; PAVA-RIPOLL, M.; INFANTE, F.; REHNER, S.A. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological control* 46 (1): 72-82 (2008).

VEGA, C.; HERRERA, C.M. Relationships among nectar-dwelling yeasts, flowers and ants: patterns and incidence on nectar traits. *Oikos* 121 (11): 1878-1888 (2012).

VISSA, S.; HOFSTETTER, R.W. The Role of Mites in Bark and Ambrosia Beetle-Fungal Interactions. In book: *Insect Physiology and Ecology*, Edition: 1, Chapter: 6, Publisher: InTech, Editors: Vonnice D.C. Shields. 135-156 (2017).

VIT, P.; SANTIAGO, B. Composición química de polen apícola fresco recolectado em el páramo de Misintá de los Andes venezolanos. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. 58, 411-415 (2008).

VOLLET-NETO, A.; MAIA-SILVA, C.; MENEZES, C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. Newly emerged workers of the stingless bee *Scaptotrigona* aff. *depilis* prefer stored pollen to fresh pollen. *Apidologie*. 48, 204-210 (2016).

WALKER, G.M. *Yeasts*. University of Abertay Dundee, Dundee, Scotland. 1174-1187 (2009).

WINSTON, M. L. A biologia da abelha. Porto Alegre: Magister. (2003).

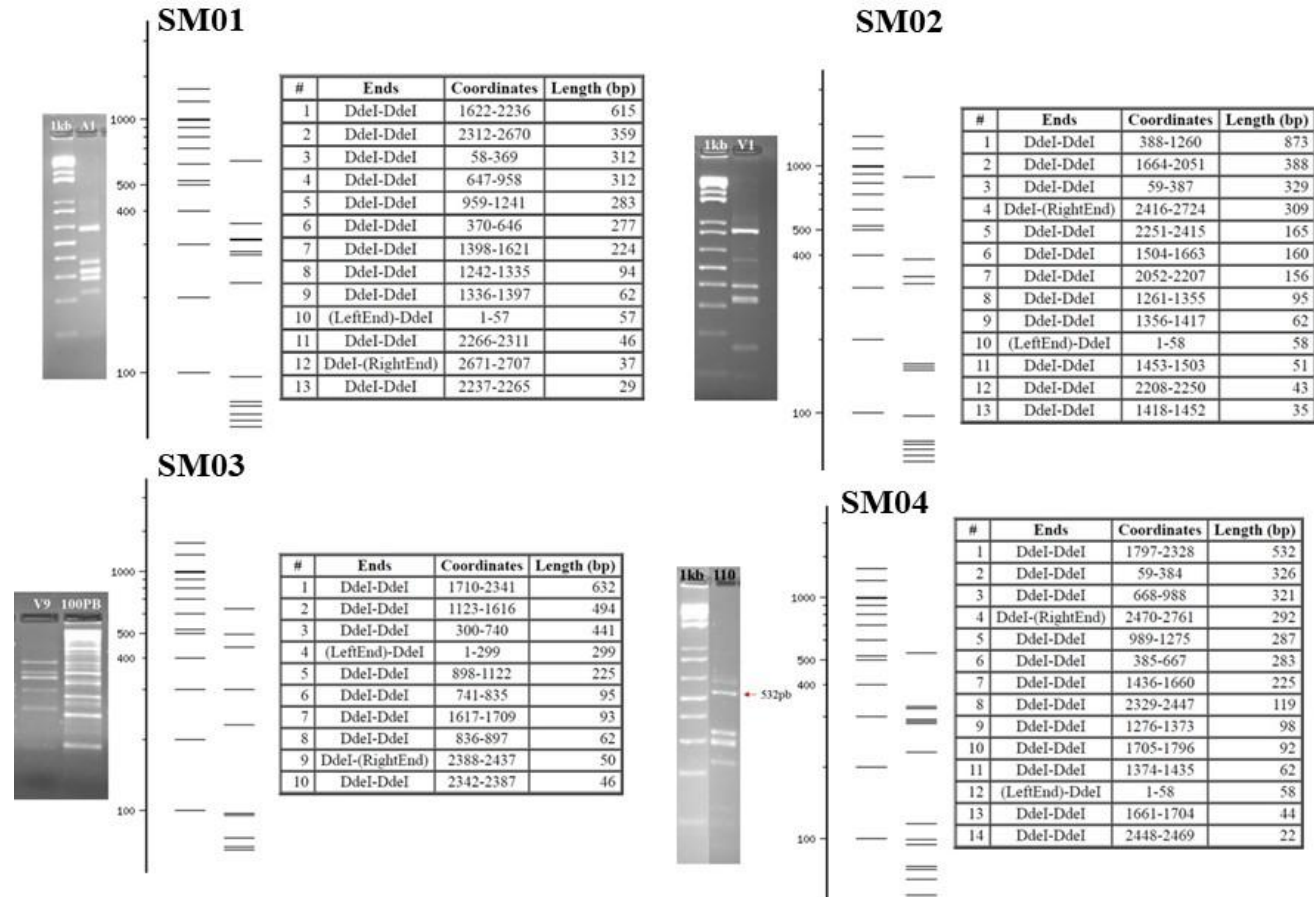
WITZGALL, P.; PROFFIT, M.; ROZPEDOWSKA, E.; BECHER, P.; ANDREADIS, S.; CORACINI, M.; LINDBLOM, T.T.; REAM, L.; HAGMAN, A.; BENGTSSON, M.; KURTZMAN, C.; PISKUR, J.; KNIGHT, A. “This Is not an Apple”—Yeast Mutualism. In Codling Moth. *Journal of Chemical Ecology* 38 (8): 949- 957 (2012).

WHITE, T.B.; LEE, S. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p 315-322. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (ed), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, USA. (1990).

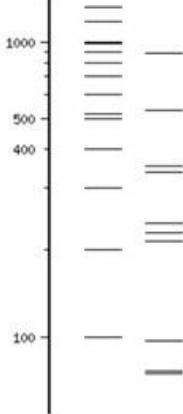
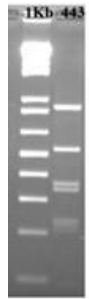
ZUCOLOTO, F. S. Aspectos gerais da nutrição de insetos, com especial referência em abelhas pp. 27-37 in Zucchi, R., Drumond, P. M., Fernandes-da-Silva, P. G. & Augusto, S. C. (ed.) Anais do I Encontro Sobre Abelhas. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 308. 32 (1994).

APÊNDICES

APÊNDICE I: Comparação do padrão de restrição físico com o padrão *in silico* gerado pela ferramenta *NEBcutter*[®].

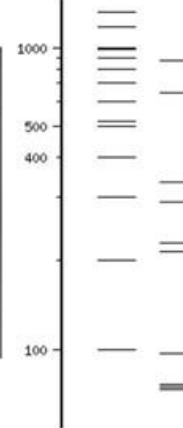
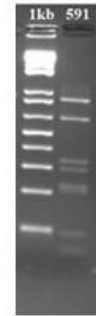


SM05



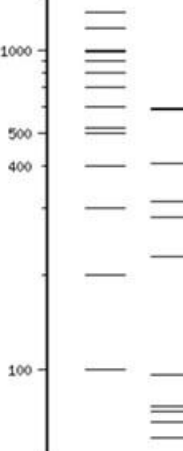
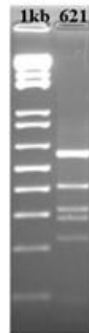
#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	DdeI-DdeI	396-1285	890
2	DdeI-DdeI	1668-2198	531
3	DdeI-(RightEnd)	2647-2997	351
4	DdeI-DdeI	60-395	336
5	DdeI-DdeI	2199-2435	237
6	DdeI-DdeI	1444-1667	224
7	DdeI-DdeI	2436-2646	211
8	DdeI-DdeI	1286-1381	96
9	DdeI-DdeI	1382-1443	62
10	(LeftEnd)-DdeI	1-59	59

SM06



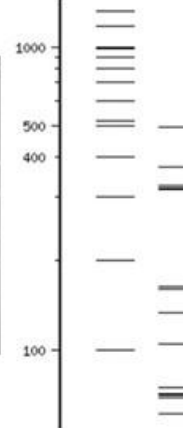
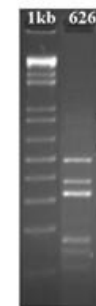
#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	DdeI-DdeI	392-1267	876
2	DdeI-DdeI	1650-2289	640
3	DdeI-DdeI	60-391	332
4	DdeI-DdeI	2502-2791	290
5	DdeI-DdeI	1426-1649	224
6	DdeI-DdeI	2290-2501	212
7	DdeI-DdeI	1268-1363	96
8	DdeI-DdeI	1364-1425	62
9	(LeftEnd)-DdeI	1-59	59
10	DdeI-(RightEnd)	2792-2848	57

SM07



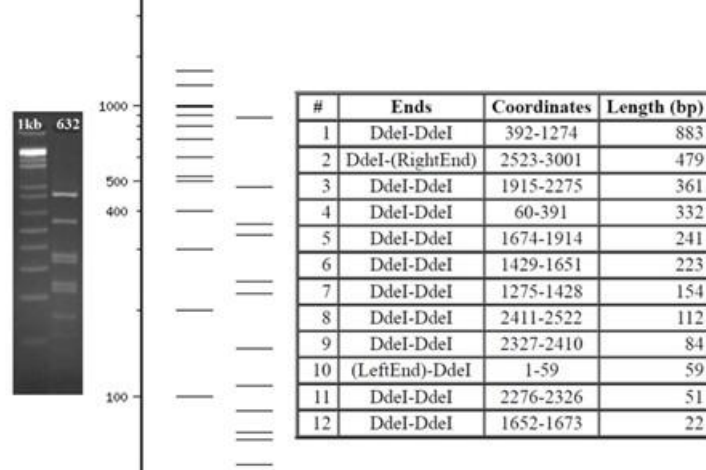
#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	DdeI-DdeI	369-958	590
2	DdeI-DdeI	1622-2206	585
3	DdeI-(RightEnd)	2281-2688	408
4	DdeI-DdeI	57-368	312
5	DdeI-DdeI	959-1241	283
6	DdeI-DdeI	1398-1621	224
7	DdeI-DdeI	1242-1335	94
8	DdeI-DdeI	1336-1397	62
9	(LeftEnd)-DdeI	1-56	56
10	DdeI-DdeI	2236-2280	45
11	DdeI-DdeI	2207-2235	29

SM08

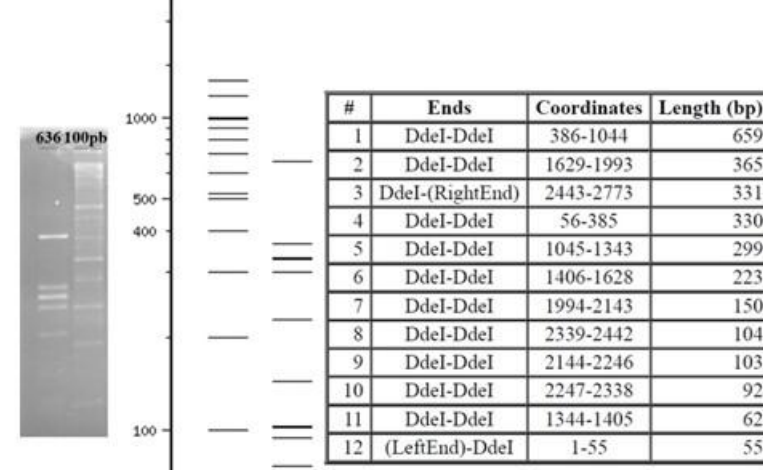


#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	DdeI-DdeI	384-877	494
2	DdeI-DdeI	878-1251	374
3	DdeI-DdeI	61-383	323
4	DdeI-DdeI	1820-2138	319
5	DdeI-(RightEnd)	2335-2652	318
6	DdeI-DdeI	1460-1628	169
7	DdeI-DdeI	2139-2304	166
8	DdeI-DdeI	1680-1819	140
9	DdeI-DdeI	1301-1406	106
10	(LeftEnd)-DdeI	1-60	60
11	DdeI-DdeI	1407-1459	53
12	DdeI-DdeI	1629-1679	51
13	DdeI-DdeI	1252-1300	49
14	DdeI-DdeI	2305-2334	30

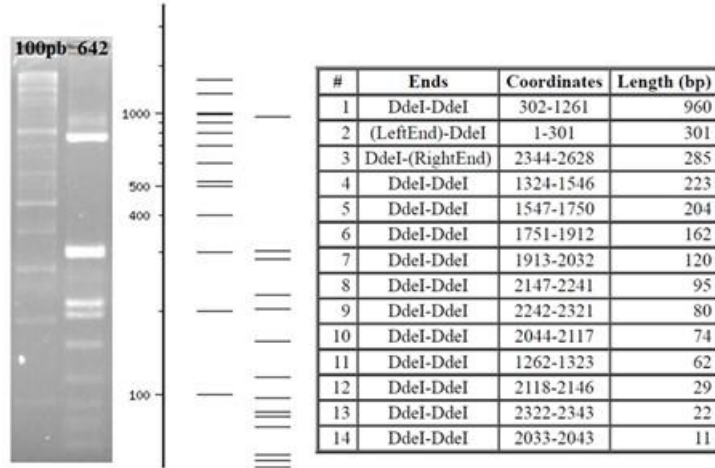
SM10



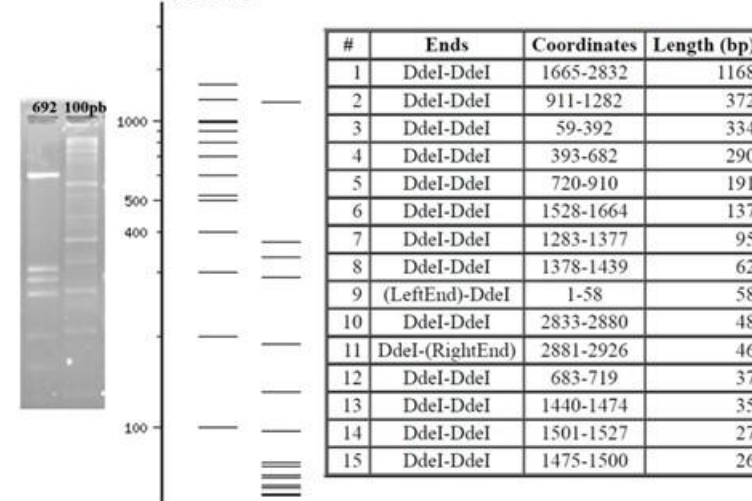
SM11



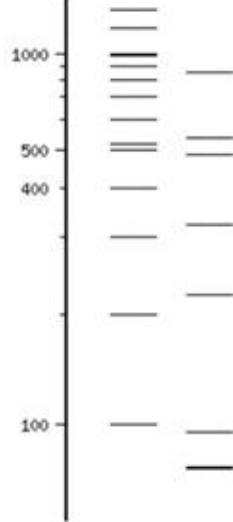
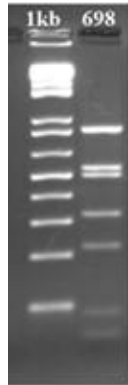
SM12



SM13

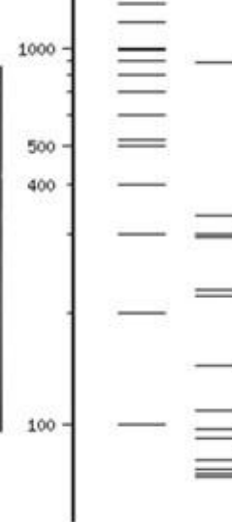


SM14



#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	DdeI-DdeI	382-1240	859
2	DdeI-DdeI	1618-2153	536
3	DdeI-(RightEnd)	2154-2639	486
4	DdeI-DdeI	62-381	320
5	DdeI-DdeI	1396-1617	222
6	DdeI-DdeI	1241-1333	93
7	DdeI-DdeI	1334-1395	62
8	(LeftEnd)-DdeI	1-61	61

SM15



#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	DdeI-DdeI	390-1281	892
2	DdeI-DdeI	58-389	332
3	DdeI-DdeI	2172-2471	300
4	DdeI-DdeI	2472-2765	294
5	DdeI-DdeI	1438-1662	225
6	DdeI-DdeI	1954-2171	218
7	DdeI-DdeI	1663-1812	150
8	DdeI-DdeI	2766-2877	112
9	DdeI-DdeI	1282-1376	95
10	DdeI-DdeI	1813-1899	87
11	DdeI-(RightEnd)	2878-2946	69
12	DdeI-DdeI	1377-1437	61
13	(LeftEnd)-DdeI	1-57	57
14	DdeI-DdeI	1900-1953	54


```

Sbjct 421 CTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGGAATCTCAGTCTTTCAGGCTG 480

Query 538 CGAGTTGTAATTTGAAGACGTATTTTGAAGTAAGCACATGTGCGAAGTTCCTTGAACAGG 597
          |||
Sbjct 481 CGAGTTGTAATTTGAAGACGTATTTTGAAGTAAGCACATGTGCGAAGTTCCTTGAACAGG 540

Query 598 ACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGTGTTCACTGCTTCATGTAAAATGCAGTCG 657
          |||
Sbjct 541 ACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGTGTTCACTGCTTCATGTAAAATGCAGTCG 600

Query 658 AAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAA 717
          |||
Sbjct 601 AAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAA 660

Query 718 ATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGA 777
          |||
Sbjct 661 ATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGA 720

Query 778 AAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTCGGG 837
          |||
Sbjct 721 AAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTCGGG 780

Query 838 CAACCGGGCCAGCATGGGGTGGGGGAGTAGGATAACCCTGCAGGAAAGTGGCTTCGCTTC 897
          |||
Sbjct 781 CAACCGGGCCAGCATGGGGTGGGGGAGTAGGATAACCCTGCAGGAAAGTGGCTTCGCTTC 840

Query 898 GGTGGAGTGTTATAGCCTGTAGCTATACTGCTACCCTCGCCCAGGACTGCGGAAACAAG 957
          |||
Sbjct 841 GGTGGAGTGTTATAGCCTGTAGCTATACTGCTACCCTCGCCCAGGACTGCGGAAACAAG 900

Query 958 GATGCTGGCATAATGATCTTAAGCCGCCCGTCTTGAAA 995
          |||
Sbjct 901 GATGCTGGCATAATGATCTTAAGCCGCCCGTCTTGAAA 938

```

Linagem: SM03

JX310560.1 *Rhodotorula* sp.

Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.
Reference for database indexing: Aleksandr Morgulis, George Coulouris, Yan Raytselis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schaffer (2008), "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", *Bioinformatics* 24:1757-1764.

ALIGNMENTS

>JX310560.1 *Rhodotorula* sp. VITJzN03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed
spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1731

Score = 2278 bits (1233), Expect = 0.0

Identities = 1237/1239 (99%), Gaps = 0/1239 (0%)

```

Query 1      TTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTA 60
          |||
Sbjct 61      TTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTA 120

Query 61     GTGAATATAGGACGTCCAACCTAACTTGGAGTCCGAACTCTCACTTTCTAACCTGTGCA 120
          |||
Sbjct 121    GTGAATATAGGACGTCCAACCTAACTTGGAGTCCGAACTCTCACTTTCTAACCTGTGCA 180

Query 121    CTTGTTTGGGATAGTAACTCTCGCAAGAGAGCGAACTCCTATTCACTTATAAACACAAAG 180
          |||

```

Sbjct 181 CTTGTTTGGGATAGTAACTCTCGCAAGAGAGCGAACTCCTATTCACTTATAAACACAAAAG 240

Query 181 TCTATGAATGTATTAATTTTATAACAAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTC 240
 |||

Sbjct 241 TCTATGAATGTATTAATTTTATAACAAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTC 300

Query 241 TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA 300
 |||

Sbjct 301 TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA 360

Query 301 ATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCATGGTATTCCGTGGAGCATGCCTGTTTG 360
 |||

Sbjct 361 ATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCATGGTATTCCGTGGAGCATGCCTGTTTG 420

Query 361 AGTGTGCATGAATACTTCAACCCCTCCTTTCTTAATGATTGAAGAGGTGTTTGGTTTCTG 420
 |||

Sbjct 421 AGTGTGCATGAATACTTCAACCCCTCCTTTCTTAATGATTGAGGAGGTGTTTGGTTTCTG 480

Query 421 AGCGCTGCTGGCCTTTACGGTCTAGCTCGTTTCGTAATGCATTAGCATCCGCAATCGAACT 480
 |||

Sbjct 481 AGCGCTGCTGGCCTTTACGGTCTAGCTCGTTTCGTAATGCATTAGCATCCGCAATCGAACT 540

Query 481 TCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGAATTCTAGTCTTCGGATTAGAGCC 540
 |||

Sbjct 541 TCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGAATTCTAGTCTTCGGATTAGAGCC 600

Query 541 GGGTTGGGTAAAGGAAGCTTCTAATCAGAATGTCTACATTTTAAGATTAGATCTCAAAAT 600
 | |||

Sbjct 601 GAGTTGGGTAAAGGAAGCTTCTAATCAGAATGTCTACATTTTAAGATTAGATCTCAAAAT 660

Query 601 CAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAA 660
 |||

Sbjct 661 CAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAA 720

Query 661 GGATTCCCCTAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATCTGGCACCTT 720
 |||

Sbjct 721 GGATTCCCCTAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATCTGGCACCTT 780

Query 721 CGGTGTCCGAGTTGTAATCTCTAGAAATGTTTTCCGCGTTGGACCGCACACAAGTCTGTT 780
 |||

Sbjct 781 CGGTGTCCGAGTTGTAATCTCTAGAAATGTTTTCCGCGTTGGACCGCACACAAGTCTGTT 840

Query 781 GGAATACAGCGGCATAGTGGTGGAGACCCCGTATATGGTGCGGACGCCAGCGCTTTGTG 840
 |||

Sbjct 841 GGAATACAGCGGCATAGTGGTGGAGACCCCGTATATGGTGCGGACGCCAGCGCTTTGTG 900

Query 841 ATACATTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATTTCCA 900
 |||

Sbjct 901 ATACATTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATTTCCA 960

Query 901 TCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAA 960
 |||

Sbjct 961 TCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAA 1020

Query 961 AAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAACAGTACGTGAAATGTTGGAAGGAAACGCTTGAAGT 1020
 |||

Sbjct 1021 AAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAACAGTACGTGAAATGTTGGAAGGAAACGCTTGAAGT 1080

Query 1021 CAGACTTGCTTGCCGAGCAATCGGTTTGCAGGCCAGCATCAGTTTTCCGGGATGGATAAT 1080
 |||

Sbjct 1081 CAGACTTGCTTGCCGAGCAATCGGTTTGCAGGCCAGCATCAGTTTTCCGGGATGGATAAT 1140

Query 1081 GGTAGAGAGAAGGTAGCAGTTTCCGGCTGTGTTATAGCTCTCTGCTGGATACATCTTGGGG 1140
 |||

Sbjct 1141 GGTAGAGAGAAGGTAGCAGTTTCCGGCTGTGTTATAGCTCTCTGCTGGATACATCTTGGGG 1200

```

Query 1141 GACTGAGGAACGCAGTGTGCCTTTGGCGGGGGTTTCGACCTCTTCACACTTAGGATGCTG 1200
          |||
Sbjct 1201 GACTGAGGAACGCAGTGTGCCTTTGGCGGGGGTTTCGACCTCTTCACACTTAGGATGCTG 1260

Query 1201 GTGGAATGGCTTTAAACGACCCGCTCTGAAACACGGACC 1239
          |||
Sbjct 1261 GTGGAATGGCTTTAAACGACCCGCTCTGAAACACGGACC 1299

```

Linhagem: SM04

KY106878.1 *Wickerhamiella versatilis*

Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.
Reference for database indexing: Aleksandr Morgulis, George Coulouris, Yan Raytselis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schaffer (2008), "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", Bioinformatics 24:1757-1764.

ALIGNMENTS

>KY106878.1 *Wickerhamiella versatilis* culture CBS:5007 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1170

Score = 1038 bits (562), Expect = 0.0
Identities = 568/571 (99%), Gaps = 0/571 (0%)

```

Query 413 ACTTGACACCAAGCTTTCTTTAAAAGACCTCGTATCAGGCAAGACTACCCGCTGAACTT 472
          |||
Sbjct 600 ACTTGACACCAAGCTTTCTTTAAAAGACCTCGTATCAGGCAAGACTACCCGCTGAACTT 659

Query 473 AAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTG 532
          |||
Sbjct 660 AAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTG 719

Query 533 AAGCGGCAAAGCCCAAATTTGAAATCCTCTTTTGAGGAGTTGTAATTTGGAGATGGAGT 592
          |||
Sbjct 720 AAGCGGCAAAGCCCAAATTTGAAATCCTCTTTTGAGGAGTTGTAATTTGGAGATGGAGT 779

Query 593 GCTGGACTCAGCTCTGTGGAAGTTGGCTGGAAAGCCGCGCCTTGGAGGGTGATAGCCCCG 652
          |||
Sbjct 780 GCTGGACTCAGCTCTGTGGAAGTTGGCTGGAAAGCCGCGCCTTGGAGGGTGATAGCCCCG 839

Query 653 TGCCACGGAGGTCCTGTGTCTGTGTAGTACTCTTCTACGAGTCGCGTTGTTGGGAATG 712
          |||
Sbjct 840 TGCCACGGAGGTCCTGTGTCTGTGTAGTACTCTTCTACGAGTCGCGTTGTTGGGAATG 899

Query 713 CAGCGCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAGGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCG 772
          |||
Sbjct 900 CAGCGCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAGGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCG 959

Query 773 AACAACTACTGTAAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAATAGCACGTGA 832
          |||
Sbjct 960 AACAACTACTGTAAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAATAGCACGTGA 1019

Query 833 AATCGTTGAAGTGGAAAGGGCTTAAAGCTACACACCTTCTTCGGAAGGGGCTAACATCAGT 892
          |||
Sbjct 1020 AATCGTTGAAGTGGAAAGGGCTTAAAGCTACACACCTTCTTCGGAAGGGGCTAACATCAGT 1079

Query 893 TCTGCCGGACGGATAAATGGTAAAGAAAGTGGCATTTCGGATGTGTTATAGCTTTATCA 952
          |
Sbjct 1080 TTTGCCGGATGGATAAATGGTAAAGAAAGTGGCATTTCGGATGTGTTATAGCTTTATCA 1139

```

```

Query 953  AATACGTCCCGGCGGGATTGAGGACCGCGCT 983
          |||
Sbjct 1140  AATACGTCCCGGCGGGATTGAGGACCGCGCT 1170

```

Score = 859 bits (465), Expect = 0.0
Identities = 473/477 (99%), Gaps = 0/477 (0%)

```

Query 1  GGTCATTTAGAGGAAGTACAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT 60
          |||
Sbjct 124  GGTCATTTAGAGGAAGTACAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT 183

Query 61  CATTTCTGAGATCAATATCACATTTCTGTGAACCTTCTCATTGTGTTTTGGCGGGGCGCT 120
          |||
Sbjct 184  CATTTCTGAGATTACTATCACATTTCTGTGAACCTTCTCATTGTGTTTTGGCGGGGCGCT 243

Query 121  TTTATAGCAAGCCGCAATCATAAAAACCTCAACCATTATTATTTATTCAGAATAACTAT 180
          |||
Sbjct 244  TTTATAGCAAGCCGCAATCATAAAAACCTCAACCATTATTATTTATTCAGATTAACTAT 303

Query 181  AAATTATACAAGCTTCAACGACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCAA 240
          |||
Sbjct 304  AAATTATACAAGCTTCAACGACGGATCTCTCGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCAA 363

Query 241  AGCGCGATAGGTAATGCGAATTGCAGACGTGAGTCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCG 300
          |||
Sbjct 364  AGCGCGATAGGTAATGCGAATTGCAGACGTGAGTCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCG 423

Query 301  CTGTTAGGTTTCTCCTAACAGCATGCCTGTGCGAGCGTCTATCTTTCTCACCAATGGTGGT 360
          |||
Sbjct 424  CTGTTAGGTTTCTCCTAACAGCATGCCTGTGCGAGCGTCTATCTTTCTCACCAATGGTGGT 483

Query 361  TGCTGACGCTATGCAGAGTGTGCGAAAAGAATGGAGATGTACACGTTAGTGAAACTTGAC 420
          |||
Sbjct 484  TGCTGACGCTATGCAGAGTGTGCGAAAAGAATGGAGATGTACACGTTAGTGAAACTTGAC 543

Query 421  ACCAAGCTTTCTTTAAAAGACCTCGTATCAGGCAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCA 477
          |||
Sbjct 544  ACCAAGCTTTCTTTAAAAGACCTCGTATCAGGCAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCA 600

```

Linhagem SM05

GQ458025.1 *Debaryomyces hansenii*

Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.
Reference for database indexing: Aleksandr Morgulis, George Coulouris, Yan Raytseis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schaffer (2008, "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", Bioinformatics 24:1757-1764.

ALIGNMENTS

>GQ458025.1 *Debaryomyces hansenii* strain MA09-AK 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=2991

Score = 2206 bits (1194), Expect = 0.0
Identities = 1235/1255 (98%), Gaps = 3/1255 (0%)

```

Query 1  TTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT 60
          |||
Sbjct 1723  TTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT 1782

Query 61  CAGTATTCTTTTTGCCAGCGCTTAATGCGCGGCGAAAAACCTTACACACAGTGTTTTT 120

```

Sbjct	1783	 CAGTATTCTTTTTGCCAGCGCTTAATTGCGCGGCGAAAAACCTTACACACAGTGTTTTT	1842
Query	121	TGTTATTACAAGAACTCTTGCTTTGGTCTGGACTAGAAAATAGTTTGGGCCAGAGGTTTAC	180
Sbjct	1843	 TGTTATTACAAGAACTTTTGGCTTTGGTCTGGACTAGAAAATAGTTTGGGCCAGAGGTTTAC	1902
Query	181	TGAACTAAACTTCAATATTTATATTGAATTGTTATTTATTTAATTGTCAATTTGTTGAT	240
Sbjct	1903	 TGAACTAAACTTCAATATTTATATTGAATTGTTATTTA-TTTAATTGTCAATTTGTTGAT	1961
Query	241	TAAATTCAAAAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAA	300
Sbjct	1962	 TAAATTCAAAAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAA	2021
Query	301	GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTT	360
Sbjct	2022	 GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTT	2081
Query	361	TGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTC	420
Sbjct	2082	 TGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCAGAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTC	2141
Query	421	TCTCAAACCTTCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTTAGTCAAACCTAGGCGTTTGCCTGA	480
Sbjct	2142	 TCTCAAACCTTCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTTAGTCAAACCTAGGCGTTTGCCTGA	2201
Query	481	AATGTATCGGCATGAGTGGTACTGGATAGTGCTATATGACTTTCAATGTATTAGGTTTAT	540
Sbjct	2202	 AATGTATTGGCATGAGTGGTACTGGATAGTGCTATATGACTTTCAATGTATTAGGTTTAT	2261
Query	541	CCAACTCGTTGAACAGTTTAAATGGTATATTTCTCGGTATTCTAGGCTCGGCCTTACAACA	600
Sbjct	2262	 CCAACTCGTTGAATAGTTTAAATGGTATATTTCTCGGTATTCTAGGCTCGGCCTTACAATA	2321
Query	601	TAACAAACAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAAT	660
Sbjct	2322	 TAACAAACAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAAT	2381
Query	661	AAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAAG	720
Sbjct	2382	 AAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAAG	2441
Query	721	CTCAAATTTGAAATCTGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTAACTTTG	780
Sbjct	2442	 CTCAAATTTGAAATCTGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTAACTTTG	2501
Query	781	GAGTTGGCTCTTGCTATGTTCCCTTGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGC	840
Sbjct	2502	 GAGTTGGCTCTTGCTATGTTCCCTTGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGC	2561
Query	841	GATGAGATGCCCAATTCTATGTAAAGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAG	900
Sbjct	2562	 GATGAGATGCCCAATTCTATGTAAAGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAG	2621
Query	901	CTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAAC	960
Sbjct	2622	 CTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAAC	2681
Query	961	AAGTACAGTGATGGAAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAAT	1020
Sbjct	2682	 AAGTACAGTGATGGAAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAAT	2741
Query	1021	TGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATCCTTTTCTTTTGGTT	1080
Sbjct	2742	 TGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATCCTTTTCTTTTGGTT	2801


```

Query  1081  GGGTTCCTCCGAGCTTACTGGGCCAGCATCGGTTTGATGGTAGGATAATGATTAAGGAA  1140
        |||||||  |||||||
Sbjct  2802  GGGTTCCTCCGAGCTTACTGGGCCAGCATCGGTTTGATGGTAGGATAATGACTAAGGAA  2861

Query  1141  TGTGGCTCAACTTCGGTGGAGTGTTATAGCCTTGGTTGATACTGCCTGTCTAGACCGAGG  1200
        |||||||  |||||||
Sbjct  2862  TGTGGCTCTACTTCGGTGGAGTGTTATAGCCTTGGTTGATACTGCCTGTCTAGACCGAGG  2921

Query  1201  ACTGCGTC-TTTGACTAGGATGCTGGCATAATGATTTAAGCCGCCGCTTTGAA  1254
        |||||||  |||||||
Sbjct  2922  ACTGCGTCTTTTACTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAANCCACCCGCT-T-GAA  2975

```

Linhagem: SM06**HE681725.1** *Candida orthopsilosis***FN812686.1** *Candida orthopsilosis*

Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.
Reference for database indexing: Aleksandr Morgulis, George Coulouris, Yan Raytseilis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schaffer (2008), "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", Bioinformatics 24:1757-1764.

ALIGNMENTS

>HE681725.1 *Candida orthopsilosis* Co 90-125, chromosome 7draft sequence

Length=937312

Score = 2019 bits (1093), Expect = 0.0

Identities = 1106/1112 (99%), Gaps = 2/1112 (0%)

```

Query  1      AAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAATGAAAGT  60
        |||||||  |||||||
Sbjct  344595  AAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAATGAAAGT  344536

Query  61      GCTTAACTGCAttttttacacatgtgtttttcttttttttGAAAACTTTGCTTTGGTG  120
        |||||||  |||||||
Sbjct  344535  GCTTAACTGCATTTTTTACACATGTGTTTTTCTTTTTTTTGAACCTTTGCTTTGGTG  344476

Query  121     GGCCCATGGCCTGCCAGAGATTAACCAAAATTTTTATTTAAGTCAACTGATTAAC  180
        |||||||  |||||||
Sbjct  344475  GGCCCATGGCCTGCCAGAGATTAACCAAAATTTTTATTTAAGTCAACTGATTAAC  344416

Query  181     TAATAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCG  240
        |||||||  |||||||
Sbjct  344415  TAATAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCG  344356

Query  241     AAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA  300
        |||||||  |||||||
Sbjct  344355  AAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA  344296

Query  301     TTGCGCCCTTTGGTATTCCAAGGGCATGCCTGTTTGGAGCGTCATTCTCCCTCAAACCT  360
        |||||||  |||||||
Sbjct  344295  TTGCGCCCTTTGGTATTCCAAGGGCATGCCTGTTTGGAGCGTCATTCTCCCTCAAACCT  344236

Query  361     TCGGGTTTGGTGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCCTTGAAAGAAAGCGGAGTATAAACTA  420
        |||||||  |||||||
Sbjct  344235  TCGGGTTTGGTGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCCTTGAAAGAAAGCGGAGTATAAACTA  344176

Query  421     ATGGATAGGtttttttCCACTCATTTGGTACAACTCCAAAATTTCTCAAATTCGACCTC  480
        |||||||  |||||||
Sbjct  344175  ATGGATAGGTTTTTTTCCACTCATTTGGTACAACTCCAAAATTTCTCAAATTCGACCTC  344116

Query  481     AAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCA  540
        |||||||  |||||||
Sbjct  344115  AAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCA  344056

```

```

Query 541      ACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCA 600
                |||
Sbjct 344055    ACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCA 343996

Query 601      CTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGT 660
                |||
Sbjct 343995    CTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGT 343936

Query 661      TTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGTCCCAGACCTA 720
                |||
Sbjct 343935    TTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGTCCCAGACCTA 343876

Query 721      TGTAAGTTCCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAAT 780
                |||
Sbjct 343875    TGTAAGTTCCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAAT 343816

Query 781      TCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGA 840
                |||
Sbjct 343815    TCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGA 343756

Query 841      TGAAAAGAAGTTTAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTT 900
                |||
Sbjct 343755    TGAAAAGAAGTTTAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTT 343696

Query 901      GAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGG 960
                |||
Sbjct 343695    GAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGG 343636

Query 961      GCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGACAATTGCAAAGAAATGTGGCACTGCCTCGGTAGTG 1020
                |||
Sbjct 343635    GCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGACAATTGCAAAGAAATGTGGCACTGCCTCGGTAGTG 343576

Query 1021     TGTATAGTCTTTGTGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCAAGGAT 1080
                |||
Sbjct 343575    TGTATAGTCTTTGTGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGAT 343516

Query 1081     GTTGGCATAATGGT-TAAATGCCGCCCGTCTT 1111
                |||
Sbjct 343515    GTTGGCATAATGATCTTAA-GTCGCCCGTCTT 343485

```

>FN812686.1 *Candida orthopsilosis* 5S rRNA gene, 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 25S rRNA gene, strain 90-125
Length=7240

Score = 2019 bits (1093), Expect = 0.0
Identities = 1106/1112 (99%), Gaps = 2/1112 (0%)

```

Query 1        AAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAATGAAAGT 60
                |||
Sbjct 3075       AAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAATGAAAGT 3134

Query 61       GCTTAACTGCAttttttacacatgtgttttcttttttttGAAAACTTTGCTTTGGTG 120
                |||
Sbjct 3135       GCTTAACTGCATTTTTTACACATGTGTTTTTCTTTTTTTTGGAAAACTTTGCTTTGGTG 3194

Query 121      GGCCCATGGCCTGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAAGTCAACTGATTAAC 180
                |||
Sbjct 3195      GGCCCATGGCCTGCCAGAGATTAAACTCAACCAAATTTTATTTAAGTCAACTGATTAAC 3254

Query 181      TAATAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCG 240
                |||
Sbjct 3255      TAATAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCG 3314

```

```

Query 241 AAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA 300
          |||
Sbjct 3315 AAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA 3374

Query 301 TTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCT 360
          |||
Sbjct 3375 TTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCT 3434

Query 361 TCGGGTTTGGTGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGCGGAGTATAAACTA 420
          |||
Sbjct 3435 TCGGGTTTGGTGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGCGGAGTATAAACTA 3494

Query 421 ATGGATAGGtttttttCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAATCTTCCAAATTCGACCTC 480
          |||
Sbjct 3495 ATGGATAGGTTTTTTTCCACTCATTGGTACAAACTCCAAAATCTTCCAAATTCGACCTC 3554

Query 481 AAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCA 540
          |||
Sbjct 3555 AAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCA 3614

Query 541 ACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCA 600
          |||
Sbjct 3615 ACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCA 3674

Query 601 CTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGT 660
          |||
Sbjct 3675 CTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGT 3734

Query 661 TTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCCTGCGATGAGATGTCCAGACCTA 720
          |||
Sbjct 3735 TTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCCTGCGATGAGATGTCCAGACCTA 3794

Query 721 TGTAAGTTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAAT 780
          |||
Sbjct 3795 TGTAAGTTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAAT 3854

Query 781 TCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTATGGAAGA 840
          |||
Sbjct 3855 TCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTATGGAAGA 3914

Query 841 TGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGGCTT 900
          |||
Sbjct 3915 TGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGGCTT 3974

Query 901 GAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCTCGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGG 960
          |||
Sbjct 3975 GAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCTCGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGG 4034

Query 961 GCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGACAATTGCAAAGAAATGTGGCACTGCCTCGGTAGTG 1020
          |||
Sbjct 4035 GCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGACAATTGCAAAGAAATGTGGCACTGCCTCGGTAGTG 4094

Query 1021 TGTTATAGTCTTTGTCGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCAAGGAT 1080
          |||
Sbjct 4095 TGTTATAGTCTTTGTCGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGAT 4154

Query 1081 GTTGGCATAATGGT-TAAATGCCGCCGCTCTT 1111
          |||
Sbjct 4155 GTTGGCATAATGATCTTAA-GTCGCCGCTCTT 4185

```

Linhagem SM07

EU926480.1 *Candida apicola*

Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.

Reference for database indexing: Aleksandr Morgulis, George Coulouris, Yan Raytseis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schaffer (2008), "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", *Bioinformatics* 24:1757-1764.

ALIGNMENTS

>EU926480.1 *Candida apicola* strain UWOPS01-663b2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
 Length=921
 Score = 1640 bits (888), Expect = 0.0
 Identities = 910/921 (99%), Gaps = 0/921 (0%)

```

Query 21 TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAAGGCTACACGCCGACATTGTGAAACGCTCC 80
      |||
Sbjct 1 TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAAGGCTACACGCCGACATTGTGAAACGCTCC 60

Query 81 TCGGAGCACTACTTGGGTGTCCACTCGGATACCCAACGTTTAAACTCTTATGTTTATCTC 140
      |||
Sbjct 61 TCGGAGCACTACTTGGGTGTCCCTCTGGGCGCCCAACGTTTAAACTCTTATGTTTATCTC 120

Query 141 TGACAACCAAGAAATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAG 200
      |||
Sbjct 121 TGACAACCAAGAAATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAG 180

Query 201 AACGCAGCAAAGCGCGATAGGTAATGCGAATTGCACACGTGAGTCATTGAATCTTTGAAC 260
      |||
Sbjct 181 AACGCAGCAAAGCGCGATAGGTAATGCGAATTGCACACGTGAGTCATTGAATCTTTGAAC 240

Query 261 GCACATTGCGCCATTAGGTTCTCCTAATGGCATGCTTGTGGAGCGCCGATCTTTCTCTC 320
      |||
Sbjct 241 GCACATTGCGCCATTAGGTTCTCCTAATGGCATGCTTGTGGAGCGCCGATCTTTCTCTC 300

Query 321 ATACTACTTCATTGTAGTACGAGGTTCTGCTCCTTTTAGGAGTCAAAGAATGGAAGTGC 380
      |||
Sbjct 301 ATACTACTTCATTGTAGTACGAGGTTCTGCTCCTTTTAGGAGTCAAAGAATGGAAGTGC 360

Query 381 ACACGTTAGATAAATCTGTGCAGTTACTTACAATCTTTTGGCCTCCAATCAAGCAAGGCT 440
      |||
Sbjct 361 ACACGTTAGATAAATCTGTGCAGTTACTTACAATCTTTTGGCCTCCAATCAAGCAAGGCT 420

Query 441 ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTA 500
      |||
Sbjct 421 ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTA 480

Query 501 GTAGCGGCGAGTGAACAGGCAAAAGCTCAGATTTGAAAGCCCTCGGGCATTGTATTCTGA 560
      |||
Sbjct 481 GTAGCGGCGAGCGAACAGGCAAGAGCTCAGATTTGAAAGCCCTCGGGCATTGTATTCTGA 540

Query 561 AGCCTTGGTCCTGAGAATCGGTGTTTAAAGTCTTCTGGAAAGGAGCGCCATGGAGGGTGT 620
      |||
Sbjct 541 AGCCTTGGTCCTGAGAATCGGTGTTTAAAGTCTTCTGGAAAGGAGCGCCATGGAGGGTGT 600

Query 621 AGCCCGTACGACACCACTCTCATTGTAGGACTTTGGCATGGAGTCGAGTTGTTGGGAA 680
      |||
Sbjct 601 AGCCCGTACGACACCACTCTCATTGTAGGACTTTGGCATGGAGTCGAGTTGTTGGGAA 660

Query 681 TGCAGCTCAAATGGGTGGTATGCTCCATCTAAAGCTAAATATCTGCGAGAGACCGATAGC 740
      |||
Sbjct 661 TGCAGCTCAAATGGGTGGTATGCTCCATCTAAAGCTAAATATCTGCGAGAGACCGATAGC 720

Query 741 GAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTG 800
      |||
Sbjct 721 GAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTG 780
  
```

```

Query 801 AAATTGTTGAAATGGAAGGATAGGCCGCTAACCATGTAGGGTCGTGTTGAGGGGAGGAT 860
          |||
Sbjct 781 AAATTGTTGAAATGGAAGGATAGGCCGCTAACCATGTAGGGTCGTGTTGAGGGGAAGAT 840

Query 861 AAAAGCTGAAGAATGTGGCTCCTCGGAGTGTTATAGCTTCAGTCCATACTCCCTCTCGAG 920
          |||
Sbjct 841 AAAAGCTGAAGAATGTAGCTCCTCGGAGTGTTATAGCTTCAGTCCATATCCCTCTCGAG 900

Query 921 CGCGAGGATCGAAGACTCTGC 941
          |||
Sbjct 901 CGCGAGGATCGAAGACTCTGC 921

```

Linhagem SM08

AY188370.1 *Metschnikowia* sp.

Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.
Reference for database indexing: Aleksandr Morgulis, George Coulouris, Yan Raytselis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schaffer (2008), "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", *Bioinformatics* 24:1757-1764.

ALIGNMENTS

>AY188370.1 *Metschnikowia* sp. M-040.2p internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA, partial sequence

Length=893

Score = 1482 bits (802), Expect = 0.0

Identities = 860/886 (97%), Gaps = 11/886 (1%)

```

Query 27 GAAGGATCATTAAAAATAAT-TTATACAACACTTTTAGGaaaaaaCACTTAATATTAAT 85
          |||
Sbjct 2 GAAGGATCATTAAAAA-AATATTATACAACACTTTTAGGAAAAAA-CCCTTAAATTTTAT 59

Query 86 TTATCAATCT-AAGTTTaaaaaaaaCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGA 144
          |||
Sbjct 60 ATATTAAACTAAAGTTAAAAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGA 119

Query 145 TGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATTTT 204
          |||
Sbjct 120 TGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATTTT 179

Query 205 TGAACGCACATTGCGCCTTAAGGTATTCCTCAAGGCATGCGTGGATGAGCGATATTTACT 264
          |||
Sbjct 180 TGAACGCACATTGCGCCTTAAGGTATTCCTCAAGGCATGCGTGGATGAGCGATATTTACT 239

Query 265 CTCAAAC-TTCTAGTTTGGTCTTGTAAC--CTAAATATCAAATGGCTGTAGAATAAGTTT 321
          |||
Sbjct 240 CTCAAACCTTC-GGTTGGTCTTGTAACCACAAAATATCAAATGGCTGTAGAATAAGTTT 298

Query 322 TACACCAACTACTCCTTCCTCATCTTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT 381
          |||
Sbjct 299 TACACCAACTACTCCTTCCTCATCTTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT 358

Query 382 AAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAG 441
          |||
Sbjct 359 AAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAG 418

Query 442 CTCAAATTTGAAATCCTCCGGAATTGTAATTTGAAGGTGGGGTTGAATAGGTCTAGATA 501
          |||

```

```

Sbjct  419  CTCAAATTTGAAATCCTCCGGAATTGTAATTTGAAGGTGGGGTTGAATAGGTCTAGATA  478
Query  502  CTTTAAGTCCATTGGAAAATGGCGCCATGGAGGGTGATAGCCCCGTAAGTATTCAAAC  561
      |||
Sbjct  479  CTTTAAGTCCATTGGAAAATGGCGCCATGGAGGGTGATAGCCCCGTAAGTATTCAAAC  538
Query  562  CTTCTTTTCTTCCCCTCCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGT  621
      |||
Sbjct  539  CTTCTTTTCTTCCCCTCCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGT  598
Query  622  AAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGA-CCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGG  680
      |||
Sbjct  599  AAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGG  658
Query  681  AAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG  740
      |||
Sbjct  659  AAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG  718

Query  741  GGCTTGCAAGCAGACACAACCTCGGTTGGGCCAGCATCGGAGTGGGGGAGACAAAAAAG  800
      |||
Sbjct  719  GGCTTGCAAGCAGACACAACCTCGGTTGGGCCAGCATCGGAGTGGGGGAGACAAAAAAG  778
Query  801  GTTAGGAATGTAGCTCCCTTTAGAGTATTATATCCTAGCCCTATATCTCCATCCCCTTCC  860
      |||
Sbjct  779  GTTAGGAATGTAGCTCA-TCTCGAGTATTATATCCTGGCCCTATATCTCCACCCCCTTCC  837
Query  861  GAGGCCTGCGATTCTTCAAGGATGCTGGCGTAATGGTTGCAAGTCG  906
      |||
Sbjct  838  GAGGCCTGCGATTCTTCAAGGATGCTGGCGTAATGGTTGCAA-TCG  882

```

Linhagem: SM09

MF420378.1 *Zygosaccharomyces siamensis*

Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.

Reference for database indexing: Aleksandr Morgulis, George Coulouris, Yan Raytselis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schaffer (2008), "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", *Bioinformatics* 24:1757-1764.

ALIGNMENTS

>MF420378.1 *Zygosaccharomyces siamensis* strain FM2-2 26S ribosomal RNA
gene,partial sequence

Length=591

Score = 1046 bits (566), Expect = 0.0

Identities = 568/569 (99%), Gaps = 0/569 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query  504  GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAA  563
      |||
Sbjct  4      GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAA  63
Query  564  GCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCATTCCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGA  623
      |||
Sbjct  64     GCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCATTCCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGA  123
Query  624  GAGCGATTCTGGGGCTGGCGCTTGCCATGTTCCCTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGA  683
      |||
Sbjct  124   GAGCGATTCTGGGGCTGGCGCTTGCCATGTTCCCTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGA  183
Query  684  GAACCCCGTGAGGCGAGATGTACCAGTTCTTTGTAGAGCGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGT  743
      |||

```

```

Sbjct 184 GAACCCCGTGAGGCGAGATGTACCAGTTCTTTGTAGAGCGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGT 243
Query 744 TTGGGAATGCAGCTCTAAGAGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGA 803
      |||
Sbjct 244 TTGGGAATGCAGCTCTAAGAGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGA 303
Query 804 CCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAA 863
      |||
Sbjct 304 CCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAA 363
Query 864 AGGACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTGTTTGTGCCCTC 923
      |||
Sbjct 364 AGGACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTGTTTGTGCCCTC 423
Query 924 GCTCCTCGTGGGTGGGGGAATCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCAGTTTGGTGGCAGG 983
      |||
Sbjct 424 GCTCCTCGTGGGTGGGGGAATCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCAGTTTGGTGGCAGG 483
Query 984 AGAAAGCCTCGGGAATGTGACTCTTGCCTTTTTGGCGGGGTGTTATAGCCCAGGGGAA 1043
      |||
Sbjct 484 AGAAAGCCTCGGGAATGTGACTCTTGCCTTTTTGGCGGGGTGTTATAGCCCAGGGGAA 543
Query 1044 TACTGCCAGCCGGGACTGAGGTATGCGAC 1072
      |||
Sbjct 544 TACTGCCAGCCGGGACTGAGGTATGCGAC 572

```

Linhagem: SM10

KC111446.1 *Hanseniaspora opuntiae*

Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.
Reference for database indexing: Aleksandr Morgulis, George Coulouris, Yan Raytseleis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schaffer (2008), "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", Bioinformatics 24:1757-1764.

ALIGNMENTS

>KC111446.1 *Hanseniaspora opuntiae* strain JEY269 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

KC111447.1 *Hanseniaspora opuntiae* strain JEY270 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1964

Score = 2468 bits (1336), Expect = 0.0

Identities = 1339/1340 (99%), Gaps = 1/1340 (0%)

```

Query 8 TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGATTGAATTATCATTGTTGCTCGAGTTCTT 67
      |||
Sbjct 1 TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGATTGAATTATCATTGTTGCTCGAGTTCTT 60
Query 68 GTTTAGATCTTTTACAATAATGTGTATCTTTATTGGAGATGTGCGCTTAATTGCGCTGCT 127
      |||
Sbjct 61 GTTTAGATCTTTTACAATAATGTGTATCTTTATTGGAGATGTGCGCTTAATTGCGCTGCT 120
Query 128 TCATTAGAGTGTGCGAGTAGAAGTAGTCTTGCTTGAATCTCAGTCAACGTTTACACACAT 187
      |||
Sbjct 121 TCATTAGAGTGTGCGAGTAGAAGTAGTCTTGCTTGAATCTCAGTCAACGTTTACACACAT 180
Query 188 TGGAG-TTTTTTACTTTAATTTAATTTCTTTCTGCTTTGAATCGAAAGGTTCAAGGcaaaa 246
      |||
Sbjct 181 TGGAGTTTTTTTTACTTTAATTTAATTTCTTTCTGCTTTGAATCGAAAGGTTCAAGGCAAAA 240

```

Query	247	aacaaacacaaacaatTTTTattttattataatTTTTtaactaaacaaaattcctaacg	306
Sbjct	241	AACAAACACAAACAATTTTATTTTATATAATTTTAAACTAAACCAAATTCCTAACG	300
Query	307	gaaatTTTaaataatTTTaaaactttCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAA	366
Sbjct	301	GAAATTTTAAATAATTTAAAACTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAA	360
Query	367	GAACGTAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATACTCGTGAATCATTGAATTTT	426
Sbjct	361	GAACGTAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATACTCGTGAATCATTGAATTTT	420
Query	427	TGAACGCACATTGCGCCCTTGAGCATTTCTCAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCCCT	486
Sbjct	421	TGAACGCACATTGCGCCCTTGAGCATTTCTCAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCCCT	480
Query	487	TCTCAAAAGATAAatTTTTatttttGGTTGTGGGCGATACTCAGGGTTAGCTTGAAATT	546
Sbjct	481	TCTCAAAAGATAAATTTTATTTTGGTTGTGGGCGATACTCAGGGTTAGCTTGAAATT	540
Query	547	GGAGACTGTTTCAGTCTTTTTTAATTC AACACTTAGCTTCTTTGGAGACGCTGTTCTCGC	606
Sbjct	541	GGAGACTGTTTCAGTCTTTTTTAATTC AACACTTAGCTTCTTTGGAGACGCTGTTCTCGC	600
Query	607	TGTGATGTATTTATGGATTTATTCGTTTACTTTTACAAGGGAAATGGTAATGTACCTTAG	666
Sbjct	601	TGTGATGTATTTATGGATTTATTCGTTTACTTTTACAAGGGAAATGGTAATGTACCTTAG	660
Query	667	GCAAAGGGTTGCTTTTAATATTCATCAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCT	726
Sbjct	661	GCAAAGGGTTGCTTTTAATATTCATCAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCT	720
Query	727	GAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACTGGGATTACCTTAGTAACGG	786
Sbjct	721	GAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACTGGGATTACCTTAGTAACGG	780
Query	787	CGAGTGAAGCGGTAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACTTTCAGTGCCCGAGTTGTAAT	846
Sbjct	781	CGAGTGAAGCGGTAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACTTTCAGTGCCCGAGTTGTAAT	840
Query	847	TTGTAGAATTTGTCTTTGATTAGGTCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATAGA	906
Sbjct	841	TTGTAGAATTTGTCTTTGATTAGGTCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATAGA	900
Query	907	GGGTGAGAATCCCGTTTGGCGAGGATACCTTTTCTCTGTAAGACTTTTTCGAAGAGTCGA	966
Sbjct	901	GGGTGAGAATCCCGTTTGGCGAGGATACCTTTTCTCTGTAAGACTTTTTCGAAGAGTCGA	960
Query	967	GTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCG	1026
Sbjct	961	GTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCG	1020
Query	1027	AGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGA ACTTTGAAAAGAGAGT	1086
Sbjct	1021	AGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGA ACTTTGAAAAGAGAGT	1080
Query	1087	GAAAAAGTACGTGAAATGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTTTTTTGC	1146
Sbjct	1081	GAAAAAGTACGTGAAATGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTTTTTTGC	1140
Query	1147	ATGCACTCGCCTCTCGTGGGCTTGGGCCTCTCAAAAATTTCACTGGGCCAACATCAATTC	1206
Sbjct	1141	ATGCACTCGCCTCTCGTGGGCTTGGGCCTCTCAAAAATTTCACTGGGCCAACATCAATTC	1200
Query	1207	TGGCAGTAGGATAAATCATTAAGAATGTAGCTACCTCGGTAGTGTATAGCTTATTGGAA	1266


```

Sbjct 1201 TGGCAGTAGGATAAATCATTAAGAATGTAGCTACCTCGGTAGTGTATATAGCTTATTGGAA 1260
Query 1267 TACTGCTAGCTGGGATTGAGGACTGCGCTTCGGCAAGGATGTTGGCATAATGGTTAAATG 1326
          |||
Sbjct 1261 TACTGCTAGCTGGGATTGAGGACTGCGCTTCGGCAAGGATGTTGGCATAATGGTTAAATG 1320

Query 1327 CCGCCCGTCTTGAAACACGG 1346
          |||
Sbjct 1321 CCGCCCGTCTTGAAACACGG 1340

```

Database: Nucleotide collection (nt)
 Posted date: Jun 5, 2018 11:03 PM

Linhagem: SM11
DQ104714.1 *Pichia manshurica*

Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.

Reference for database indexing: Aleksandr Morgulis, George Coulouris, Yan Raytsehis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schaffer (2008), "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", Bioinformatics 24:1757-1764.

ALIGNMENTS

>DQ104714.1 *Pichia manshurica* strain CBS 209 18S ribosomal RNA gene, partial Sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomalRNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1023

Score = 1792 bits (970), Expect = 0.0

Identities = 1012/1030 (98%), Gaps = 11/1030 (1%)

```

Query 11 TCCGTA-GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGTGAATTAACTTCCACACATGCGTGAG 69
          |||
Sbjct 1 TCCGTAGGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGTGAATTAACTTCCACACATGCGTGAG 60

Query 70 CGCACAAAACACATAAACCGTGAGTAATTTTAGTCGAAACTTGaaaaaaaTACAAAAC 129
          |||
Sbjct 61 CGCACAAAACACATAAACCGTGAGTAATTTTGTTCGAAACTTGAAAAAAAAATACAAAAC 120

Query 130 TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCT 189
          |||
Sbjct 121 TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCT 180

Query 190 AGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCGTCGGT 249
          |||
Sbjct 181 AGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCGTCGGT 240

Query 250 ATTCGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCGTTTCCTTCTTGGAGTCTTCTTTTGGAG-A 308
          |||
Sbjct 241 ATTCGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCGTTTCCTTCTTGGGA-ACTT-TTGTTAAAGAA 298

Query 309 AGATGCCAGAGTTGGCCGTGCCACTGGCCCGCCGAAAAGAAACGTTGCGGACGAAGCGA 368
          |||
Sbjct 299 AGAT-CCAGAGCTGGCCGTGCCACTGGCCCGCCGAAAAGAAACGTTGCGGACGAAGCGA 357

Query 369 ACGTACATCGGGACGCTTTGGCCGCCGAGCGAAA--ATATCATTGAGCTCGACCTCAGAT 426
          ||
Sbjct 358 AC-TACATCGGGACGCTTTGGCCGCCGAGCGAAAATATATCATTGAGCTCGACCTCAGAT 416

Query 427 CAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAG 486
          |||
Sbjct 417 CAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGC---GGAAAAGAAACCAACAG 473

```

```

Query 487  GGATTGCCCCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGTGTTCGG 546
          |||
Sbjct 474  GGATTGCCCCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGTGTTCGG 533

Query 547  CACGAGTTGTAGAGTGTAGGCGGGAGTCTCTGTGGAGCGCGGTGTCCAAGTCCCTTGAA 606
          |||
Sbjct 534  CACGAGTTGTAGAGTGTAGGCGGGAGTCTCTGTGGAGCGCGGTGTCCAAGTCCCTTGAA 593

Query 607  CAGGGTGCCTGAGAGGGTGAGAGCCCCGTAGGGTGTGCGCGAAGCTTTTGAGGCCCTGC 666
          |||
Sbjct 594  CAGGGTGCCTGAGAGGGTGAGAGCCCCGTAGGGTGTGCGCGAAGCTTTTGAGGCCCTGC 653

Query 667  TGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTCATCTAAGGCT 726
          |||
Sbjct 654  TGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTCATCTAAGGCT 713

Query 727  AAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCATT 786
          |||
Sbjct 714  AAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCATT 773

Query 787  GAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGGGCTCGACATG 846
          |||
Sbjct 774  GAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGGGCTCGACATG 833

Query 847  GGGGGTGCACCGCTGTCTCTTGTAGGCGGCGCTCTGGGCGCCCTCTGGGCCAGCATCG 906
          |||
Sbjct 834  GGGGGTGCACCGCTGTCTCTTGTAGGCGGCGCTCTGGGCGCCCTCTGGGCCAGCATCG 893

Query 907  GTTCTGTGTCGGGAGAAGGGGCTCCGAAAGTGGCTCTTCGGAGTGTATAGCCGGGGC 966
          |||
Sbjct 894  GTTCTGTGTCGGGAGAAGGGGCTCCGAAAGTGGCTCTTCGGAGTGTATAGCCGGGGC 953

Query 967  CAGATGCCGCGTGTGGGGACCGAGGACTGCGGCTTCTGTCTCGGATGCTGGCATAACGGC 1026
          |||
Sbjct 954  CAGATGCCGCGTGTGGGGACCGAGGACTGCGGCTTCTGTCTCGGATGCTGGCATAACGGC 1013

Query 1027 GCAATACCGC 1036
          |||
Sbjct 1014 GCAATACCGC 1023

```

Database: Nucleotide collection (nt)

Posted date: Jun 7, 2018 5:03 AM

Alinhamento: SM12

JX188199.1 *Pichia kluyveri*

Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.

Reference for database indexing: Aleksandr Morgulis, George Coulouris, Yan Raytselis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schaffer (2008), "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", *Bioinformatics* 24:1757-1764.

ALIGNMENTS

>JX188199.1 *Pichia kluyveri* strain P40A003 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=939

Score = 1720 bits (931, Expect = 0.0
 Identities = 935/937 (99%), Gaps = 0/937 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 14  ATATCTTATACACATGCGTGAGCGCACCAAACACCTAAAATTGTAATACTACCAGTCACT 73
          |||
Sbjct 1  ATATCTTATACACATGCGTGAGCGCACCAAACACCTAAAATTGTAATAATACTACCAGTCACT 60

Query 74  AAGTTTAAACAAAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAG 133
          |||
Sbjct 61  AAGTTTAAACAAAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAG 120
Query 134  CGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAA 193
          |||
Sbjct 121  CGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAA 180

Query 194  CGCACATTGCGCCCCATGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCGTTTCCTTCTT 253
          |||
Sbjct 181  CGCACATTGCGCCCCATGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCGTTTCCTTCTT 240

Query 254  GCGCAAGCAGAGTTGAGAACAGGCTATGCCTTTTTTCGAAATGGAACGTCGTGGACGAAGT 313
          |||
Sbjct 241  GCGCAAGCAGAGTTGAGAACAGGCTATGCCTTTTTTCGAAATGGAACGTCGTGGACGAAGT 300

Query 314  GAACTAAATTTTTAGCACGCTTTGGCCGCCGAACCTTTAACTAAGCTCGACCTCAGATCA 373
          |||
Sbjct 301  GAACTAAATTTTTAGCACGCTTTGGCCGCCGAACCTTTAACTAAGCTCGACCTCAGATCA 360

Query 374  GGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGG 433
          |||
Sbjct 361  GGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGG 420

Query 434  ATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCTCACCTAGTGT 493
          |||
Sbjct 421  ATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCTCACCTAGTGT 480

Query 494  GCGAGTTGTAAATTGCAGGTTGGAGTCTCGGGTTAGACGTGTGTGCAAGTCCCTTGGAAC 553
          |||
Sbjct 481  GCGAGTTGTAAATTGCAGGTTGGAGTCTCGGGTTAGACGTGTGTGCAAGTCCCTTGGAAC 540

Query 554  AGGGTGCCACTGAGGGTGAGAGCCCCGTAGCGTGCATGTCGACACCTGTGAGGCCCTTCT 613
          |||
Sbjct 541  AGGGTGCCACTGAGGGTGAGAGCCCCGTATCGTGCATGTCGACACCTGTGAGGCCCTTCT 600

Query 614  GACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAGGCTA 673
          |||
Sbjct 601  GACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAGGCTA 660

Query 674  AATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTG 733
          |||
Sbjct 661  AATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTG 720

Query 734  AAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGGGCTCGACATGG 793
          |||
Sbjct 721  AAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGGGCTCGACATGG 780

Query 794  GATTTACGCATCGTTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTGGGTTTTTCCTGGGCCAGCATCGG 853
          |||
Sbjct 781  GATTTACGCATCGTTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTGGGTTTTTCCTGGGCCAGCATCGG 840

Query 854  TTTTCGTTGCAGGATAAGGACAATTGGAATGTGGCTCCTCGGAGTGTATAGCCTTTTGT 913
          |||
Sbjct 841  TTTTCGTTGCAGGATAAGGACAATTGGAATGTGGCTCCTCGGAGTGTATAGCCTTTTGT 900

Query 914  AGATGCTGCGTATGGGGACCGAGGGCTGCGGCGGACT 950
          |||
Sbjct 901  AGATGCTGCGTATGGGGACCGAGGGCTGCGGCGGACT 937

```

Database: Nucleotide collection (nt)
 Posted date: Jun 7, 2018 5:03 AM

Linhagem: SM13

KT282395.1 *Trichosporon asahii*

Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.
 Reference for database indexing: Aleksandr Morgulis, George Coulouris, Yan Raytselis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schaffer (2008), "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", *Bioinformatics* 24:1757-1764.

>KT282395.1 *Trichosporon asahii* strain AP.MSU6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1659

Score = 2139 bits (1158), Expect = 0.0

Identities = 1165/1168 (99%), Gaps = 1/1168 (0%)

Query	1	GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGATTGCCTTTATAGGCT	60
Sbjct	69	GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGATTGCCTTTATAGGCT	128
Query	61	TATAACTATATCCACTTACACCTGTGAAGTGTCTACTACTTGACGCAAGTCGAGTATTT	120
Sbjct	129	TATAACTATATCCACTTACACCTGTGAAGTGTCTACTACTTGACGCAAGTCGAGTATTT	188
Query	121	TTACAAACAATGTGTAATGAACGTCGTTTTATTATAACAAAATAAACTTTCAACAACGG	180
Sbjct	189	TTACAAACAATGTGTAATGAACGTCGTTTTATTATAACAAAATAAACTTTCAACAACGG	248
Query	181	ATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGC	240
Sbjct	249	ATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGC	308
Query	241	AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAGCTTGCCTCTCTGGTATTCCGGAGAG	300
Sbjct	309	AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAGCTTGCCTCTCTGGTATTCCGGAGAG	368
Query	301	CATGCCTGTTTCAGTGTGATGAAATCTCAACCACTAGGGTTTCCCTAATGGATTGGATTG	360
Sbjct	369	CATGCCTGTTTCAGTGTGATGAAATCTCAACCACTAGGGTTTCCCTAATGGATTGGATTG	428
Query	361	GGCGTCTGCGATTTCTGATCGCTCGCCTTAAAAGAGTTAGCAAGTTGACATTAATGTCT	420
Sbjct	429	GGCGTCTGCGATTTCTGATCGCTCGCCTTAAAAGAGTTAGCAAGTTGACATTAATGTCT	488
Query	421	GGTGAATAAGTTTCACTGGGTCCATTGTGTTGAAGCGTGCTTCTAATCGTCCGCAAGGA	480
Sbjct	489	GGTGAATAAGTTTCACTGGGTCCATTGTGTTGAAGCGTGCTTCTAATCGTCCGCAAGGA	548
Query	481	CAATTAC-TTGACTCTGGCCTGAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA	539
Sbjct	549	CAATTACTTTGACTCTGGCCTGAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA	608
Query	540	ATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGGAAG	599
Sbjct	609	ATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGGAAG	668
Query	600	AGCTCAAATTTGAAATCTGGCAGTCTTCGATTGTCCGAGTTGTAATCTATAGAGGCGTTT	659
Sbjct	669	AGCTCAAATTTGAAATCTGGCAGTCTTCGATTGTCCGAGTTGTAATCTATAGAGGCGTTT	728

```

Query 660 TCCGTGCCGGACCGTGTCCAAGTCTCCTGGAAAGGAGTATCAAAGAGGGTGATAATCCCG 719
          |||
Sbjct 729 TCCGTGCCGGACCGTGTCCAAGTCTCCTGGAAAGGAGTATCAAAGAGGGTGATAATCCCG 788

Query 720 TACTTAACACGACCACCGGTGCTCTGTGATACGTCTTCTACGAGTCGAGTTGTTTGGGAA 779
          |||
Sbjct 789 TACTTAACACGACCACCGGTGCTCTGTGATACGTCTTCTACGAGTCGAGTTGTTTGGGAA 848

Query 780 TGCAGCTCAAAATGGGTGGTGAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG 839
          |||
Sbjct 849 TGCAGCTCAAAATGGGTGGTGAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG 908

Query 840 CGAACAAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAGAGAGTTAAACAGTACGT 899
          |||
Sbjct 909 CGAACAAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAGAGAGTTAAACAGTACGT 968

Query 900 GAAATTGTTGAAAGGAAACGATTGAAGTCAGTCGTGTTCTTTGGATTAGCCAGTTCTG 959
          |||
Sbjct 969 GAAATTGTTGAAAGGAAACGATTGAAGTCAGTCGTGTTCTTTGGATTAGCCAGTTCTG 1028

Query 960 CTGGTCTACTTCCTTGAACGGGTCAACATCAGTTTTGTCCGGTGGATAAAGGTAGTAGG 1019
          |||
Sbjct 1029 CTGGTCTACTTCCTTGAACGGGTCAACATCAGTTTTGTCCGGTGGATAAAGGTAGTAGG 1088

Query 1020 AATGTGACTTCTCCGGAAGTGTATAGCCTATTATCACATACACTGGGTGAGACTGAGGA 1079
          |||
Sbjct 1089 AATGTGACTTCTCCGGAAGTGTATAGCCTATTATCACATACACTGGGTGAGACTGAGGA 1148

Query 1080 CTGCAGCTCGCCTTTATGGCCGGCCTTCGGGCACGTTTCGAGCTTAGGATGTTGACATAAT 1139
          |||
Sbjct 1149 CTGCAGCTCGCCTTTATGGCCGGCCTTCGGGCACGTTTCGAGCTTAGGATGTTGACACAA 1208

Query 1140 GGCTTTAAACGACCCGTCTTGAACACAG 1167
          |||
Sbjct 1209 GGCTTTAAACGACCCGTCTTGAACACAG 1236

```

Linhagem: SM14**KC111448.1** *Kodamaea ohmeri*

Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.
Reference for database indexing: Aleksandr Morgulis, George Coulouris, Yan Raytselis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schaffer (2008), "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", *Bioinformatics* 24:1757-1764.

>KC111448.1 *Kodamaea ohmeri* strain JEY182 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1535

Score = 1672 bits (905, Expect = 0.0)

Identities = 914/918 (99%), Gaps = 1/918 (0%)

```

Query 2 TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACATAATATTCTTACACACTGtttttttAC 61
          |||
Sbjct 1 TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACATAATATTCTTACACACTGTTTTTTTAC 60

Query 62 AACAAAACAAACATATCTAATCTATAAATCTACGTTTTAAAATTCTTAAAACCTTCAACA 121
          |||
Sbjct 61 AACAAAACAAATCTATCTAATCTATAAATCTACGTTTTAAAATTCTTAAAACCTTCAACA 120

Query 122 ACGGATCTCTTGGTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATACGAA 181
          |||

```

Sbjct 121 ACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATACGAA 180

Query 182 TCGCAGCTCTCGGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCATTGGGTATTCCCAAT 241
 |||

Sbjct 181 TCGCAGCTCTCGGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCATTGGGTATTCCCAAT 240

Query 242 GGTATGCTTGTTTGAGCGAATACTTCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCACGA 301
 |||

Sbjct 241 GGTATGCTTGTTTGAGCGAATACTTCCTAATCCTCACGGATTGTATTGTGTTTGCACGA 300

Query 302 AAATAATGACGACAGTACTCTACAAAACGGTACCGTCAGTACGCTCAttttttttCCTC 361
 |||

Sbjct 301 AAATAATGACGACAGTACTCTACAAAACGGTACCGTCAGTACACTCA-TTTTTTTTCCTC 359

Query 362 AAATCAAGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCA 421
 |||

Sbjct 360 AAATCAAGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCA 419

Query 422 ACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCCCCC 481
 |||

Sbjct 420 ACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCCCCC 479

Query 482 GGGGAGTTGTAATTTGAAGATTGCGTCTTGAGGGCACCCTGTCTATGTTCCCTGGAACA 541
 |||

Sbjct 480 GGGGAGTTGTAATTTGAAGATTGCGTCTTGAGGGCACCCTGTCTATGTTCCCTGGAACA 539

Query 542 GGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGGCACGGCCCCGGCTCCTTATAAGGCGCTC 601
 |||

Sbjct 540 GGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGGCACGGCCCCGGCTCCTTATAAGGCGCTC 599

Query 602 TCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGC 661
 |||

Sbjct 600 TCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGC 659

Query 662 TAAATACAGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTT 721
 |||

Sbjct 660 TAAATACAGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTT 719

Query 722 TGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGGCATGCCGTCAGATTG 781
 |||

Sbjct 720 TGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGGCATGCCGTCAGATTG 779

Query 782 TCAGTGTGGGTAAGAAGCGGGGTACAAAGACTGTGGAACGTGGCCCTCGGGTGTTATAGC 841
 |||

Sbjct 780 TCAGTGTGGGTAAGAAGCGGGGTACAAAGACTGTGGAACGTGGCCCTCGGGTGTTATAGC 839

Query 842 CGCAGTTCATGCCCCGTCTCTTTCCGAGGCCTGCTTTGAGGACACCGACGTAATGACGGT 901
 |||

Sbjct 840 CGCAGTTCATGCCCCGTCTCTTTCCGAGGCCTGCTTTGAGGACACCGACGTAATGACGGT 899

Query 902 ACGCCGCCGTCTTGAAA 919
 |||

Sbjct 900 ACGCCGCCGTCTTGAAA 917

Database: Nucleotide collection (nt)
 Posted date: May 30, 2018 6:33 AM

Linhagem SM15

FN665418.1 *Aureobasidium* sp.

Reference for database indexing: Aleksandr Morgulis, George Coulouris, Yan Raytselis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schaffer (2008), "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", *Bioinformatics* 24:1757-1764.

ALIGNMENTS

>FN665418.1 *Aureobasidium* sp. RBF-6C1 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), isolate RBF-6C1

FN665419.1 *Aureobasidium* sp. RBF-8B1 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), isolate RBF-8B1
Length=1209

Score = 1982 bits (1073, Expect = 0.0
Identities = 1088/1095 (99%), Gaps = 1/1095 (0%)

Query	1	AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAGTAA	60
Sbjct	13	AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAGTAA	72
Query	61	GGGTGCTCAGCGCCCGACCTCCAACCCTTTGTTGTTAAAACCTACCTTGTTGCTTTGGCGG	120
Sbjct	73	GGGTGCTCAGCGCCCGACCTCCAACCCTTTGTTGTTAAAACCTACCTTGTTGCTTTGGCGG	132
Query	121	GACCGCTCGGTCTCGAGCCGCTGGGGATTTCGTCTCAGGCGAGCGCCCGCCAGAGTTAAAC	180
Sbjct	133	GACCGCTCGGTTCGAGCCGCTGGGGATTTCGTCCAGGCGAGTGCCCGCCAGAGTTAAAC	192
Query	181	CAAACCTCTTGTATTAAACCGTCTGAGTTAAAATTTTGAATAAATCAAACCTTTCA	240
Sbjct	193	CAAACCTCTTGTATTAAACCGTCTGAGTTAAAATTTTGAATAAATCAAACCTTTCA	252
Query	241	ACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT	300
Sbjct	253	ACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT	312
Query	301	GAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTC	360
Sbjct	313	GAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTC	372
Query	361	CGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACACCACTCAAGCTATGCTTGGTATTGGGTGT	420
Sbjct	373	CGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACACCACTCAAGCTATGCTTGGTATTGGGTGT	432
Query	421	CGTCCTTAGTTGGGCGCGCCTTAAAGACCTCGGCGAGGCCTCACCGGCTTTAGGCGTAGT	480
Sbjct	433	CGTCCTTAGTTGGGCGCGCCTTAAAGACCTCGGCGAGGCCTCACCGGCTTTAGGCGTAGT	492
Query	481	AGAATTTATTTCGAACGTCTGTCAAAGGAGAGGACTTCTGCCGACTGAAACCTTTATTTT	540
Sbjct	493	AGAATTTATTTCGAACGTCTGTCAAAGGAGAGGACTTCTGCCGATTGAAACC-TTATTTT	551
Query	541	TCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG	600
Sbjct	552	TCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG	611
Query	601	AGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAA	660
Sbjct	612	AGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAA	671
Query	661	TTTGAAAGCTGGCCTTCGGGTCGCATTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTGGGTGAAACGC	720
Sbjct	672	TTTGAAAGCTGGCCTTCGGGTCGCATTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTGGGTGAAACGC	731
Query	721	CAGTCTAAGTTCCTTGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTATGTGACTGGAA	780
Sbjct	732	CAGTCTAAGTTCCTTGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTATGTGACTGGAA	791
Query	781	ATGTTAACCTATGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAAT	840
Sbjct	792	ATGTTAACCTATGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAAT	851

```

Query 841 GGGAGGTAAATTTCTTCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAG 900
          |||
Sbjct 852 GGGAGGTAAATTTCTTCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAG 911

Query 901 TGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAAAAGCACGTGAAATTGTTGAAA 960
          |||
Sbjct 912 TGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAAAAGCACGTGAAATTGTTGAAA 971

Query 961 GGAAGCGCTTGAATCAGACTTGTTTAAACTGTTGCGCCGGTCTTCTGACCGGTTTACT 1020
          |||
Sbjct 972 GGAAGCGCTTGAATCAGACTTGTTTAAACTGTTGCGCCGGTCTTCTGACCGGTTTACT 1031

Query 1021 CAGTTTGGACAGGCCAGCATCAGTTTCGGCGGCCGGATAAAGGCTCTGGGAATGTGGCCT 1080
          |||
Sbjct 1032 CAGTTTGGACAGGCCAGCATCAGTTTCGGCGGCCGGATAAAGGCTCTGGGAATGTGGCCT 1091

Query 1081 TCACTTCGGTGAAGG 1095
          |||
Sbjct 1092 TCACTTCGGTGAAGG 1106

```