

LEVEDURAS ASSOCIADAS A FRUTOS DE PLANTAS NATIVAS DO CERRADO: **EUGENIA LUTESCENS CAMBESS, CAMPOMANESIA XANTHOCARPA (MART.) O. BERG E BROSIMUM GUADICHAUDII TRÉC**

GEISIANNY AUGUSTA MONTEIRO MOREIRA

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília (UnB), Campus Darcy Ribeiro, CEP 70910-900. Asa Norte, Brasília, Distrito Federal, Brasil. E-mail: gamm.bio@gmail.com

EUGENIO MIRANDA SPERANDIO

Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília (UnB), Campus Darcy Ribeiro, CEP 70910-900. Asa Norte, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

HELSON MARIO MARTINS DO VALE

Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília (UnB), Campus Darcy Ribeiro, CEP 70910-900. Asa Norte, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

104

RESUMO: Leveduras são fungos unicelulares e cosmopolitas, porém com ocorrência e diversidade pouco conhecida no Bioma Cerrado. Objetivou-se neste trabalho avaliar a diversidade de leveduras em frutos de três plantas nativas do Cerrado do Jardim Botânico de Brasília: *Eugenia lutescens* (perinha do Cerrado), *Campomanesia xanthocarpa* (gabirola) e *Brosimum guadichaudii* (mama-cadela). As amostras foram agitadas, diluídas seriadamente e 0,1mL de cada diluição foi plaqueado em meio de cultivo MYGP. Após a incubação, foi feita a contagem de UFC e colônias morfológicamente diferentes foram isoladas em cultura pura e caracterizadas. O DNA dos isolados foi extraído e amplificado por meio de PCRs utilizando primers para a região D1/D2 do gene 26S do rDNA, sendo posteriormente sequenciada. 19 dos DNA isolados foram recuperados dos frutos. A densidade de leveduras totais em frutos variou de 2.10^3 UFC.g de fruto⁻¹ (perinha do Cerrado) a 7.10^3 UFC.g de fruto⁻¹(mama-cadela). Os isolados foram agrupados em 10 morfotipos de acordo com as características morfológicas. Os gêneros encontrados foram: *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Hanseniaspora* e *Aureobasidium*. A análise de diversidade demonstrou que frutos das plantas em estudo são habitats propícios para leveduras, podendo ser uma fonte de bioprospecção de substâncias bioativas com aplicação biotecnológica.

PALAVRAS-CHAVE: Diversidade, Ecologia Microbiana, RNA ribossomal.

YEASTS ASSOCIATED TO NATIVE PLANT FRUITS OF CERRADO: *EUGENIA LUTESCENS CAMBESS, CAMPOMANESIA XANTHOCARPA (MART.) O. BERG AND BROSIMUM GUADICHAUDII TRÉC*

ABSTRACT: Yeasts are unicellular fungi and cosmopolitan, but with little known occurrence and diversity in the Biome Cerrado. The aim of this work was to evaluate the yeasts diversity in Cerrado fruits. The study was made with three Cerrado native plants: *Eugenia lutescens* (perinha do cerrado), *Campomanesia xanthocarpa* (gabirola) and *Brosimum guadichaudii* (mama-cadela). The samples were shaken and serially diluted, 0,1 mL of each serial dilution was plated in MYGP culture medium. After incubation, UFC count was made and the morpho-

logically different colonies were isolated in pure culture and characterized. The DNA of isolated yeasts was extracted and amplified by PCR using primers for the D1/D2 region of LSU 26S rDNA gene and then sequenced. Nineteen yeasts species were recovered from fruits. The yeasts density was evaluated and it ranged from 2.10^3 UFC (perinha do cerrado) to 7.10^3 UFC (mama-cadela) per gram of fruit. Isolated yeasts were grouped into 10 morphotypes according to morphological characteristics. The genera founded were *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Hanseniaspora* and *Aureobasidium*. This study showed that Cerrado plants are suitable habitats for yeasts and may be a source of bioprospecting for bioactive substances with biotechnological applications.

KEY WORDS: Diversity, Microbial Ecology, RNA ribosomal.

INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando uma área de 204,7 milhões de hectares na porção central do Brasil. Engloba todo estado de Goiás e Distrito Federal, além de parte da Bahia, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, São Paulo e Tocantins (Sano et al., 2008), sendo considerada a última fronteira agrícola do planeta (Borlaug, 2002). Em função da expansão da agropecuária e intensa exploração local de produtos nativos, o Cerrado é considerado um dos hotspots mundiais de biodiversidade, com pelo menos 137 espécies de animais ameaçadas de extinção. Esse bioma tem sido alvo constante de desmatamento, ocasionado principalmente para fins agrícolas, onde boa parte de sua área original já foi utilizada para pastagens plantadas e culturas anuais (Klink & Machado, 2005).

O Bioma Cerrado abriga mais de 11 mil espécies vegetais, das quais 4.400 são endêmicas (Medeiros, 2011). Estima-se que para cada espécie de planta vascular estão associados de seis a oito fungos (Hawksworth, 2001). Porém, segundo Dianese (2000), existem cerca de 70 a 100 mil espécies de fungos, incluindo os liquenizados, no Cerrado, onde haveria uma associação de mais de 25 fungos por espécie de planta vascular.

Segundo definição de Kurtzman & Fell (1998), as leveduras, assim como fungos verdadeiros, são micro-organismos pertencentes ao Reino *Fungi*, com parede celular rígida, núcleo organizado com membrana nuclear, aclorofilados, heterotróficos, nutrem-se por absorção, com reprodução sexuada por meio de células especializadas denominadas esporos e com ausência de motilidade. Diferenciam-se dos demais fungos por possuírem um talo unicelular e realizarem a reprodução assexuada por brotamento ou fissão, além de não formarem corpos de frutificação.

As leveduras são cosmopolitas, sendo encontradas em diversos habitats, desde ambientes extremos como o Ártico (Zalar et al., 2008) e águas hipersalinas (Gunde-Cimerman et al., 2000) a ambientes com disponibilidade de substratos ricos em açúcares, como folhas, frutos e flores. Esses nichos são tradicionalmente consi-

derados excelentes substratos para isolamento de leveduras (Santos et al., 1996).

Alguns estudos sobre diversidade de leveduras realizados no Brasil demonstraram que diferentes habitats como insetos, flores e frutos, apresentam comunidades de leveduras características, com biotipos diferentes, e até mesmo novas espécies (Morais et al., 1995).

Outros trabalhos relatam a ocorrência de leveduras em goiabas (Abranches et al., 2000), frutos de maçã (Camatti-Shartori et al., 2005), em frutos de *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke (Morais et al., 1995) e grãos de café despolpados (Silva et al., 2008).

No entanto, trabalhos relatando a diversidade de leveduras em frutos nativos do Cerrado ainda são escassos.

Entendendo a importância do bioma em estudo e a escassez de pesquisas sobre a diversidade de leveduras em frutos nativos do Cerrado, o objetivo deste trabalho foi estudar a ocorrência e diversidade de leveduras em frutos de plantas nativas do Cerrado por meio de métodos de cultivo e técnicas moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAGEM

A coleta foi realizada em áreas nativas com frutos provenientes de três espécies de plantas do Cerrado: *Eugenia lutescens* Cambess (Perinha do Cerrado), *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg (Gabirola), *Brosimum guadichaudii* Tréc (Mama-cadela), coletados no Jardim Botânico de Brasília - DF (Coordenadas geográficas: 047° 49' 39,6" W 15° 52' 02,6" S).

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE LEVEDURAS

As amostras utilizadas nesta análise consistiram em dois frutos por espécie de planta avaliada. Os frutos foram homogeneizadas com água peptonada 0,1% (0,1% Peptona), com três repetições para cada fruto, e agitadas a 150 rpm por

20 minutos, para facilitar a liberação das células microbianas. As amostras homogeneizadas foram então diluídas seriadamente até a diluição de 10^{-4} . Da suspensão resultante de cada diluição, 100 μL foram semeados, em triplicata, no meio de cultivo MYGP (0,3% Extrato de malte; 0,3% Extrato de levedura; 0,5% Peptona; 1% Glucose; 2% Ágar) em pH ajustado para 5,6 (Masoud et al., 2004), contendo 250 mg.L^{-1} de Cloranfenicol. As placas foram incubadas a 28°C , por um período de três a cinco dias, onde foi observado o crescimento de colônias de leveduras nas placas, após esse período fez-se a contagem de UFCs (Unidades Formadoras de Colônias). Os diferentes morfotipos de leveduras crescidas a partir das diluições, em placa com meio de cultura, foram isolados separadamente até a obtenção de culturas puras. A caracterização morfológica das colônias foi realizada em meio de cultura MYGP com pH ajustado para 5,6 (Masoud et al., 2004), e colônias com cinco dias de cultivo, de acordo com a metodologia descrita por Dias & Schwan (2010), onde foram observados características como: cor (branca, bege, laranja, rosa, entre outros), tamanho (pequena, média ou grande) e aspecto da colônia (pastoso ou cremoso); formato da borda (lisa ou filamentosa), perfil (lisa e convexa, achatada, elevada) e superfície da colônia (granulosa, estrias concêntricas); bem como o tempo de crescimento de cada uma (lento ou rápido).

Para as características morfológicas observadas foi feita a construção de uma matriz de presença (1) e ausência (0), e esta analisada no programa MVSP v3.1 (Multi-Variate Statistical Package) (Kovach, 2007). O dendograma de similaridade fenética foi construído pelo algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) utilizando o coeficiente Jaccard para cálculo de similaridade.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

A extração de DNA foi feita a partir do precipitado de células obtido após centrifugação de 1,5 mL da cultura crescida em meio de cultivo MYGP líquido. O DNA foi extraído pelo método de clorofórmio/álcool isoamílico, utilizando *beads* de vidro para a lise mecânica das células e tampão de extração (2% Triton X, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,1 mM EDTA pH 8) (Kurtzmann & Fell, 1998).

O fragmento de DNA referente ao domínio D1/D2 do gene 26S do RNA ribossomal foi amplificado por PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) utilizando os iniciadores NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') e NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGAGGG

3') (Kurtzman & Robnett, 1998), gerando um fragmento de aproximadamente 600bp, em reação com volume final de 25 μL contendo 20-30 ng de DNA molde, 20 pmol de cada iniciador, 1,5 mM MgCl_2 e 0,2 mM dNTP's (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). As condições de PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 92°C por 4 minutos, seguida por 34 ciclos de desnaturação a 92°C por 40 segundos, anelamento a 57°C por 1 minuto e 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os fragmentos amplificados foram tratados com a enzima ExoSAP-IT® conforme instruções do fabricante e enviados para sequenciamento na Universidade Católica de Brasília (UCB), utilizando o sequenciador ABI 3130xl da Applied Biosystems, pela metodologia de sequenciamento de Sanger (Sanger et al., 1977).

As sequências resultantes do sequenciamento foram analisadas no programa BioEdit (7.1.3.0) (Hall, 1999), para verificação da qualidade e comparadas com sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando o software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altsch et al., 1990). O alinhamento e as relações filogenéticas entre as sequências dos isolados de leveduras e as sequências do GenBank foram calculadas no programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013) utilizando o método de Máxima Verossimilhança pelo modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros. Os limites de confiança para a construção das árvores filogenéticas foram estimados com análises de *bootstrap*, com 1000 replicações. A espécie *Schizosaccharomyces pombe* Lindner (AY048171) foi utilizada como grupo externo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Foram recuperados 19 isolados de leveduras das três espécies de plantas nativas do Cerrado, sendo nove isolados da *Eugenia lutescens*, seis da *Brosimum guadichaudii* e quatro da *Campomanesia xanthocarpa*.

A presença de leveduras nas três amostras de frutos de plantas do Cerrado foi constatada em meio MYGP e a densidade populacional em todas as amostras variou de $2 - 7.10^3 \text{ UFC.g}^{-1}$ (Tabela 1).

Frutos de *Brosimum guadichaudii* apresentaram-se como melhores habitats para leveduras com a maior densidade de células por fruto ($7,57.10^3 \text{ UFC.g}^{-1}$).

Tabela 1 - Número de isolados e UFC.grama de frutos⁻¹ por espécie coletada.

Espécie coletada	Nº de isolados	UFC.grama de frutos-1
<i>Eugenia lutescens</i>	9	$2,80.10^3$
<i>Campomanesia xanthocarpa</i>	4	$5,66.10^3$
<i>Brosimum guadichaudii</i>	6	$7,57.10^3$

Tecidos de plantas, como caules, flores e frutos, são ricos em compostos orgânicos o que consequentemente os tornam um habitat favorável para o crescimento de leveduras (Starmer & Lachance, 2011). Porém, algumas diferenças na composição química e disponibilidade de açúcares simples, polissacarídeos e outros compostos de carbono presentes entre os frutos analisados

pode refletir na densidade de leveduras encontrada.

Os 19 isolados recuperados dos frutos foram fenotipicamente caracterizados e agrupados em dez diferentes morfotipos com base nas características coloniais avaliadas como cor, aspecto e tamanho da colônia, entre outras (Figura 1).

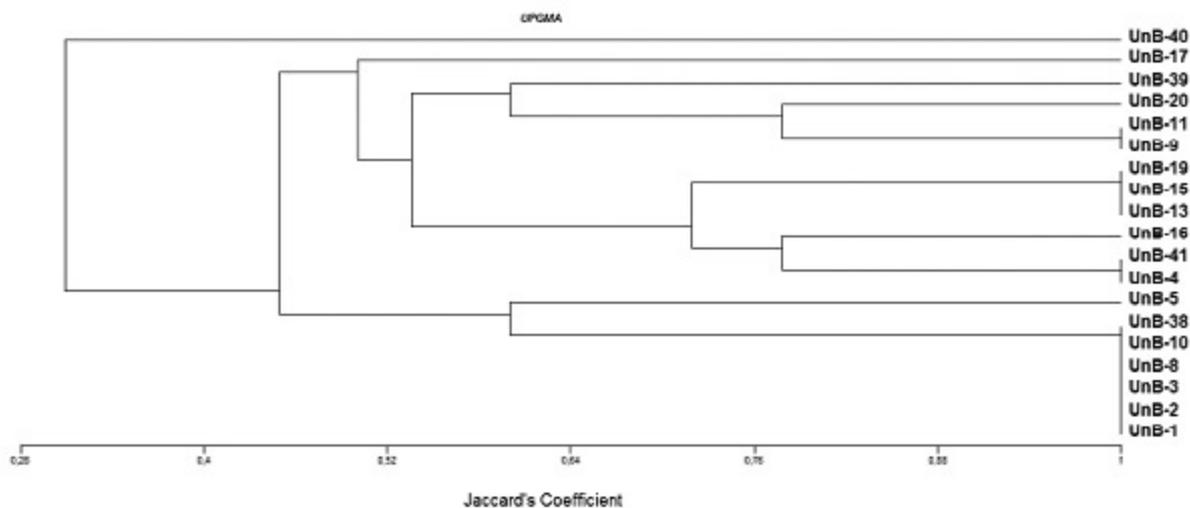


Figura 1 - Dendrograma de similaridade fenética gerado a partir da análise morfológica das colônias de leveduras em meio MYGP, pH 5,6, e construído com o algoritmo UPGMA utilizando o coeficiente Jaccard para cálculo de similaridade.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

A região D1/D2 do 26S rDNA de grande parte das leveduras conhecidas encontra-se sequenciada e sabe-se que essa região permite diferenciar quase todas as espécies de leveduras para fins taxonômicos (Fell et al., 2000; Kurtzman & Robnett, 1998). Os 19 isolados de leveduras recu-

perados dos frutos de espécies de plantas nativas do Cerrado foram identificadas com base no sequenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA, comparando com as sequências depositadas no GenBank, e levando em consideração os valores de identidade e cobertura (Tabela 2).

Tabela 2 - Identificação dos isolados de leveduras, número de acesso, cobertura e identidade das sequências no GenBank.

Isolado	Identificação (GenBank)	Cobertura	Identidade	Filo	Hospedeira
	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FJ515219)	96%	79%		
CLUnB-1	<i>Aureobasidium leucospermi</i> (JN712555)	96%	78%	Ascomycota	
	<i>Aureobasidium</i> sp. (JQ916062)	96%	78%		
CLUnB-2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (AF444749)	100%	98%	Basidiomycota	<i>Eugenia</i>
CLUnB-3	<i>Aureobasidium leucospermi</i> (JN712555)	94%	90%	Ascomycota	<i>lutescens</i>
	<i>Aureobasidium</i> sp. (JQ916062)	94%	90%		
CLUnB-4	<i>Rhodotorula</i> sp. (EU828522)	80%	91%	Basidiomycota	
CLUnB-5	<i>Candida azyma</i> (JN004198)	100%	99%	Ascomycota	
CLUnB-8	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (AF444749)	100%	99%	Basidiomycota	
	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FJ515219)	100%	97%		
CLUnB-9	<i>Aureobasidium leucospermi</i> (JN712555)	99%	98%	Ascomycota	
	<i>Aureobasidium</i> sp. (JQ916062)	100%	98%		<i>Campomanesia</i>
CLUnB-10	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (AF444749)	95%	98%	Basidiomycota	<i>xanthocarpa</i>
	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FJ515219)	99%	97%		

Tabela 2 - continuação

CLUnB-11	<i>Aureobasidium leucospermi</i> (JN712555)	99%	95%	Ascomycota	
	<i>Aureobasidium</i> sp. (JQ916062)	98%	96%		
CLUnB-13	<i>Hanseniaspora</i> sp. (DQ377647)	99%	99%	Ascomycota	
CLUnB-15	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (AF444749)	100%	99%	Basidiomycota	
CLUnB-16	<i>Rhodotorula</i> sp. (AF387134)	98%	93%	Basidiomycota	
CLUnB-17	Sem identificação/Sequência ruim	-	-	-	<i>Brosimum</i>
CLUnB-19	<i>Cryptococcus laurentii</i> (EF068207)	100%	98%	Basidiomycota	<i>guadichaudii</i>
	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FJ515219)	96%	96%		
CLUnB-20	<i>Aureobasidium leucospermi</i> (JN712555)	96%	97%	Ascomycota	
	<i>Aureobasidium</i> sp. (JQ916062)	95%	97%		
CLUnB-38	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (AF444749)	98%	89%	Basidiomycota	
CLUnB-39	<i>Cryptococcus laurentii</i> (EF068207)	100%	98%	Basidiomycota	
	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FJ515219)	94%	87%		<i>Eugenia</i>
CLUnB-40	<i>Aureobasidium leucospermi</i> (JN712555)	94%	86%	Ascomycota	<i>lutescens</i>
	<i>Aureobasidium</i> sp. (JQ916062)	94%	86%		
CLUnB-41	Sem identificação/Sequência ruim	-	-	-	

A análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança (Figura 2) mostrou-se concisa, apresentando valores de *bootstrap* significativos, dividindo os isolados em clados e delimitando os gêneros, além de informar as relações filogenéticas entre os isolados. Além disso, o método foi eficiente na separação dos isolados em dois

grandes grupos: *Basidiomycota* R.T. Moore, com os gêneros *Rhodotorula* F.C. Harrison (nove isolados) e *Cryptococcus* Vuillemin (2 isolados); e *Ascomycota* Cavalier-Smith com os gêneros *Aureobasidium* Viala & G. Boyer (seis isolados), *Candida* Berkhout (um isolado) e *Hanseniaspora* Zikes (um isolado).

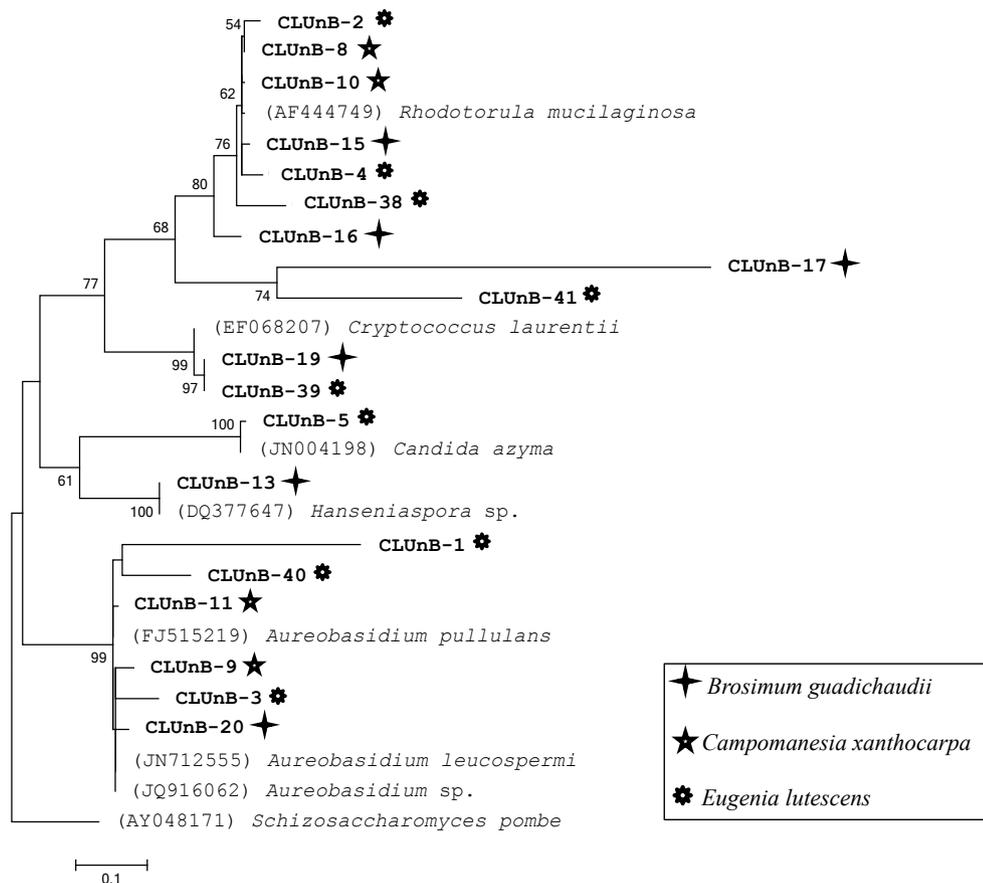


Figura 2 - Árvore filogenética representativa das relações dos isolados de frutos do Cerrado obtida por análises de Máxima Verossimilhança a partir de sequências do gene 26S (domínio D1/D2) usando o programa MEGA 6 para 1000 replicações de bootstrap. A levedura *Schizosaccharomyces pombe* (AY048171) foi utilizada como grupo externo.

Leveduras basidiomicéticas geralmente são encontradas no filoplano por possuírem um perfil assimilativo mais amplo com relação às fontes de carbono quando comparadas com as leveduras ascomicéticas. As leveduras basidiomicéticas são predominantes em ambientes como solo e folha, onde os nutrientes disponíveis são mais complexos (Kurtzman & Fell, 1998).

Muitas leveduras basidiomicéticas desenvolveram mecanismos que permitiram a colonização do filoplano, tais como: produção de estruturas de resistência, como clamidósporos, de cápsula mucóide e pigmentos carotenóides que são úteis na proteção contra a radiação UV (Kurtzman & Fell, 1998). Como exemplo, leveduras do gênero *Rhodotorula* produzem pigmentos carotenóides para se protegerem dos níveis de radiação que são mais altos na superfície de tecidos da parte aérea da planta do que no solo (Fonseca & Inácio, 2006).

Os gêneros de leveduras encontrados neste trabalho são frequentemente associados a frutos (Tournas et al., 2006; Trindade et al., 2002; Abranches et al., 2000). No entanto, trata-se do primeiro relato desses gêneros de leveduras em associação com as espécies de plantas em estudo.

Com base na Figura 2, é possível verificar que os isolados UnB-5 e UnB-13 estão relacionados filogeneticamente a *Candida azyma* (Van der Walt, Johannsen & Yarrow) S.A. Mey. & Yarrow e *Hanseniaspora* sp., respectivamente, com valores de cobertura e de identidade acima de 90% (Tabela 2). *C. azyma* e *Hanseniaspora* sp. foram encontradas somente em *Eugenia lutescens* e *Brosimum guadichaudii*, respectivamente.

Candida e *Hanseniaspora* são gêneros pertencentes ao Filo *Ascomycota*, onde a maioria das espécies pode ser identificada apenas com o sequenciamento do domínio D1/D2 (Kurtzman & Robnett, 1998).

Espécies do gênero *Candida*, isoladas de frutos tropicais, são eficientes produtoras de enzimas pectinolíticas (Silva et al., 2005; Trindade et al., 2002) e de enzimas proteolíticas (Trindade et al., 2002; Abranches et al., 1997).

Swangkeaw et al. (2011) demonstraram que uma β -glucosidase produzida por isolados de *Hanseniaspora* sp. é eficiente na produção de vinho comercial, principalmente na liberação de aromas desejáveis. Espécies de *Hanseniaspora* tem sido encontradas principalmente em frutos devido as suas habilida-

des fisiológicas serem limitadas, tendo como fonte de carbono preferencial a glicose e a celobiose, o que acaba limitando o seu nicho (Starmer & Lachance, 2011).

Os isolados CLUnB-19 e CLUnB-39 mostraram 98% de identidade com *Cryptococcus laurentii* (EF068207)(Kuff.) C.E. Skinner, formando um clado bem suportado na análise filogenética (Figura 2), e foram detectados em *B. guadichaudii* e *E. lutescens*. Ao contrário dos gêneros *Aureobasidium* e *Rhodotorula* que foram relatados nas três hospedeiras analisadas, sendo os gêneros dominantes com o maior número de isolados.

Rhodotorula e *Cryptococcus* são gêneros de leveduras pertencentes ao Filo *Basidiomycota*, e formam um grupo polifilético. Espécies desses gêneros, como *R. glutinis* (Fresen.) F.C. Harrison e *Cr. laurentii* tem se mostrado eficazes como agentes de biocontrole de patógenos de pós-colheita em diversos frutos (Lima et al., 1998). *Cr. laurentii* foi eficiente no biocontrole do mofo azul da maçã, causado por *Penicillium expansum* Link, quando em combinação com a levedura *Metschnikowia pulcherrima* Pitt & M.W. Mill. (Janisiewicz et al., 2008); e contra o mofo azul (*P. italicum* Wehmer) em laranjas (Zhang et al., 2005).

Aureobasidium é um gênero do filo *Ascomycota*, composto por fungos leveduriformes, geralmente de coloração escura, comumente denominada de leveduras negras. *Aureobasidium pullulans* (De Bary) G. Arnaud ex Cif., Ribaldi & Corte possui grande aplicação biotecnológica, como na produção de enzimas hidrolíticas, e alta plasticidade genética, podendo alterar suas propriedades morfológicas e fisiológicas dependendo das condições em que é cultivada (Zalar et al., 2008). Esse gênero possui espécies intimamente relacionadas tornando difícil a separação utilizando apenas um marcador molecular, o que se observa ao analisar o ramo do gênero *Aureobasidium* em que não se chega a uma conclusão correta a nível de espécie.

Zalar et al. (2008) utilizaram diferentes regiões como o gene 28S do rDNA, o gene para β -tubulina e fator de alongação (EF 1 α) para separar as espécies de *A. pullulans* e definir as suas variedades.

Os isolados relatados neste trabalho se configuram como primeiro relato nas espécies nativas do Cerrado analisadas, com base em informações presentes no banco de dados Fungus-Host Distributions DataBase, da Systematic Mycology & Microbiology Laboratory (USDA).

Dessa forma, o levantamento da biodiversidade para conhecer as espécies presentes em determinado habitat torna-se imprescindível para aumentar o conhecimento referente ao grupo em questão e impulsionar a bioprospecção de possíveis aplicações biotecnológicas dos isolados recuperados.

CONCLUSÃO

Eugenia lutescens (Perinha do Cerrado), *Campomanesia xanthocarpa* (Gabioba) e *Brosimum guadichaudii* (Mama-cadela) nativas do Cerrado são habitats propícios para o desenvolvimento de leveduras, onde são encontradas espécies dos gêneros: *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Hanseniaspora* e *Aureobasidium*.

Visto que a diversidade de leveduras em frutos no Cerrado ainda é pouco explorada, e sendo as leveduras importantes fontes de substâncias bioativas de interesse biotecnológico, o presente trabalho é essencial para o conhecimento e catalogação da diversidade de leveduras presentes no Bioma Cerrado.

REFERÊNCIAS

- Abranches, J., L. C. Mendonça-Hagler, A. N. Hagler, P. B. Morais & C. A. Rosa.** 1997. The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 328-336.
- Abranches, J., M. J. S. Vital, W. T. Starmer, L. C. Mendonça-Hagler & A. N. Hagler.** 2000. The yeast community and mycocin producers of guava fruit in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycologia*, 92: 16-22.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman.** 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- Borlaug, N. E.** 2002. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. *In*: R. Bailey (ed.). *Global warming and other eco-myths*. Roseville – EUA: Competitive Enterprise Institute, 448 p.
- Camatti-Shartori, V., R. T. Da Silva-Ribeiro, R. M. Valdebenitosanhueza, F. C. Pagnocca, S. Echeverrigaray & J. L. Azevedo.** 2005. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. *Journal of Basic Microbiology*, 45: 397- 402.
- Dianese, J. C.** 2000. Micodiversidade associada a plantas do Cerrado. *In*: T. B. Cavalcanti, B. M. T. Walter. *Tópicos atuais em Botânica*. Brasília: Embrapa.
- Dias, D. R. & R. F. Schwan.** 2010. Isolamento e identificação de leveduras. *In*: F. M. S. Moreira, E. J. Huising, D. E. Bignell (eds.). *Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade*. Lavras – MG: Editora UFLA, 368p.
- Fell, J. W., T. Boekhout, A. Fonseca, G. Scorzetti & A. Statzell-Tallman.** 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1351-1371.
- Fonseca, A. & J. Inacio.** 2006. Phylloplane yeasts. *In*: G. Peter, C. A. Rosa (eds.). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Berlin: Springer-Verlag.
- Gunde-Cimerman N., P. Zalar, G. S. de Hoog & A. Plemenitas.** 2000. Hypersaline water in salterns – natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 235–240.
- Hall, T.A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hawksworth, D. L.** 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105: 1422-1432.
- Janisiewicz, W. J., R. A. Saftner, W. S. Conway & K. S. Yoder.** 2008. Control of blue mold decay of apple during commercial controlled atmosphere storage with yeast antagonists and sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, 49: 374-378.
- Klink, C. A. & R. B. Machado.** 2005. A conservação do Cerrado Brasileiro. *Megadiversidade*, 1: 147-155.
- Kovach, W. L.** 2007. MVSP - A MultiVariate Statistical Package for Windows, ver. 3.1. Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, U.K.
- Kurtzman, C. P. & J. W. Fell.** 1998. *The Yeasts, a taxonomic study*. Elsevier, 4 ed.

- Kurtzman, C. P. & C. J. Robnett.** 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large sub-unit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 331-371.
- Lima, G., F. De Curtis, R. Castoria, V. De Cicco.** 1998. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. *Biocontrol Science and Technology*, Oxford, 8: 257-267.
- Masoud, W., L. Cesar, L. Jespersen & M. Jakobsen.** 2004. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast*, 21: 549-556.
- Medeiros, J. D.** 2011. Guia de campo: vegetação do Cerrado 500 espécies. 532p. Brasília: MMA/SBF.
- Morais, P. B., M. B. Martins, L. B. Klaczko, L. C. Mendonça-Hagler & A. N. Hagler.** 1995. Yeast succession in the amazon fruit *Parahancornia amapa* as a resource partitioning among *Drosophila* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 4251-4257.
- Sanger, F., S. Nicklen & R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74: 5463-5467.
- Sano, E. E., R. Rosa, J. L. S. Brito & L. Ferreira.** 2008. Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43: 153-156.
- Santos, E. A., R. B. Oliveira, L. C. Mendonça-Hagler, A. N. N. Hagler.** 1996. Yeasts associated with flowers and fruits from a semi-arid region or northeastern Brazil. *Revista de Microbiologia*, 27: 33-40.
- Silva, C.F., L. R. Batista, L. M. Abreu, E. S. Dias & R. F. Schwan.** 2008. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food Microbiology*, 25: 951-957.
- Silva, E. G., M. F. Borges, C. Medina, R. H. Piccoli & R. F. Schwan.** 2005. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*, 5: 859-865.
- Starmer, W. T. & M. A. Lachance.** 2011. Yeast Ecology. *In*: C. P. Kurtzman, J. W. Fell, T. Boekhout. *The Yeasts: A Taxonomic Study*, Volume 1. Elsevier.
- Swangkeaw, J., S. Vichitphan, C. E. Butzke & K. Vichitphan.** 2011. Characterization of β -glucosidases from *Hanseniaspora* sp. and *Pichia anomala* with potentially aroma-enhancing capabilities in juice and wine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27: 423-430.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filip-ski & S. Kumar.** 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Tournas, V. H., B. Heeres & L. Burgess.** 2006. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food microbiology*, 23: 684-688.
- Trindade, R. C., M. A. Resende, C. M. Silva & C. A. Rosa.** 2002. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. *Systematic and Applied Microbiology*, 25: 294-300.
- Zalar P., C. Gostincar, G. S. de Hoog, V. Ursic, M. Sudhadham & N. Gunde-Cimerman.** 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*, 61: 21-38.
- Zhang, H-Y., X-D. Zheng & Y-F. Xi.** 2005. Biological control of postharvest blue mold of oranges by *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner. *BioControl*, 50: 331-342.

Recebido em 22.IV.2014

Aceito em 15.VIII.2015