

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO



**DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A
FLORES E FRUTOS DE MURICI
(*Byrsonima crassifolia*, L. Kunth)**

ANDRÉA OHANNA SANTOS CARVALHO

**Belo Horizonte
2017**

ANDRÉA OHANNA SANTOS CARVALHO

DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A FLORES E FRUTOS DE MURICI
(*Byrsonima crassifolia*, L. Kunth)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Carlos Augusto Rosa

Belo Horizonte
2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar forças diante às dificuldades.

Ao Carlos Rosa, pela confiança, pela oportunidade de trabalho e por todos os ensinamentos.

À Fátima Gomes, por ter aceitado o convite para compor a banca examinadora.

À Raquel Cadete, por ter aceitado o convite para compor a banca examinadora e por sempre ser tão prestativa e atenciosa.

Ao Instituto Federal do Tocantins por ter me concedido a licença para que eu pudesse concluir o curso.

À Rose Cardoso por ter me ajudado muitíssimo nas coletas e isolamento das leveduras.

Ao Danilo da Matta por ter me ajudado com as análises estatísticas.

À todos os meus colegas do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos pelo companheirismo e ensinamentos. Em especial, agradeço à Ana Raquel Santos, por toda a ajuda na execução deste trabalho. Agradeço imensamente à Thelma Tirone, Mariana Anzai, Katharina Barros e Elisa Guerra pela amizade e por me ajudarem sempre!

A todos os meus familiares, em especial à minha mãe e à minha avó, Isadora e Maria do Socorro. A vocês meu eterno agradecimento, por todo amor, compreensão, paciência, incentivo e por sempre me darem o apoio de que precisei, acreditando fielmente em meus sonhos.

Enfim, agradeço à todos que de diferentes formas contribuíram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE TABELAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT	VIII
1.INTRODUÇÃO	10
1.1 Leveduras: Características gerais	10
1.2 Leveduras associadas a plantas	11
1.2.1 Leveduras associadas a flores	11
1.2.2 Leveduras associadas a insetos que visitam plantas	14
1.2.3 Leveduras associadas a frutos	16
1.3 O gênero <i>Moniliella</i>	18
1.3 <i>Byrsonima crassifolia</i> (murici): distribuição, biologia e leveduras associadas	20
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27
3.1 Geral	27
3.2 Específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Área de Coleta – Município de Araguatins, Tocantins	28
4.2 Coleta de amostras	30
4.3 Isolamento das leveduras	31
4.4 Manutenção das leveduras	32
4.5 Identificação de leveduras	32
4.5.1 Extração de DNA	33
4.5.2 PCR <i>fingerprinting</i> com iniciador GTG5.....	34
4.5.3 Amplificação utilizando iniciadores ITS1 e NL4	35
4.5.4 Amplificação utilizando iniciadores NL1 e NL4	35
4.5.5 Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento	36
4.5.6 Análise computacional das sequências	37
4.6 Análises de diversidade	38
5. RESULTADOS	40
5.1 Coleta, isolamento e identificação das leveduras	40
5.2 Espécies novas	48

5.1 Análises de diversidade	49
6. DISCUSSÃO	53
6.1 Isolamento, identificação e diversidade das leveduras	53
6.1.1 Leveduras de flores e insetos associados	53
6.1.2 Leveduras de frutos	58
6.1.3 Emprego de meios seletivos no isolamento de leveduras	63
6.2. Espécies Novas	64
7. CONCLUSÕES	83
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore de <i>B. crassifolia</i> , L. Kunth	21
Figura 2. Inflorescência de <i>B. crassifolia</i> (A); Botões florais, com setas indicando os elaióforos (B)	22
Figura 3. Frutos de <i>B. crassifolia</i> em diferentes estágios de maturação (A); Fruto maduro (B)	23
Figura 4. Mapa mostrando a localização do município de Araguatins, estado do Tocantins	28
Figura 5. Locais de coleta de flores, frutos e insetos associados ao murici no município de Araguatins, Tocantins. A (Área total); B (Área de Coleta 1); C (Área de Coleta 2); D (Área de Coleta 3)	29
Figura 6. Coleta de flores e frutos de murici	30
Figura 7. Sobreposição de espécies de leveduras entre flores, frutos e insetos associados ao murici	48
Figura 8. Curvas de acumulação de espécies de leveduras encontradas em flores, frutos e insetos associados a <i>B. crassifolia</i>	51
Figura 9. Árvore consenso da espécie <i>Candida</i> sp. nov. 1	65
Figura 10. Árvore consenso das espécies <i>Hannaella</i> sp. nov. 1 e <i>Hannaella</i> sp. nov. 2	66
Figura 11. Árvore consenso das espécies <i>Moniliella</i> sp. nov. 1 e <i>Moniliella</i> sp. nov. 2	68
Figura 12. Árvore consenso das espécies <i>Papiliotrema</i> sp. nov. 1 e <i>Papiliotrema</i> sp. nov. 2.	69
Figura 13. Árvore consenso da espécie <i>Phragmotaeonium</i> sp. nov. 1	70
Figura 14. Árvore consenso das espécies <i>Priceomyces</i> sp. nov. 1 e <i>Priceomyces</i> sp. nov. 2 .	71
Figura 15. Árvore consenso das espécies <i>Candida</i> sp. nov. 1 e <i>Starmerella</i> sp. nov. 1 e <i>Starmerella</i> sp. nov. 2	73
Figura 16. Árvore consenso da espécie <i>Symmetrospora</i> sp. nov. 1	74
Figura 17. Árvore consenso da espécie <i>Sympodiomyces</i> sp. nov. 1	75
Figura 18. Árvore consenso da espécie <i>Tridiomyces</i> sp. nov. 1	76
Figura 19. Árvore consenso da espécie das espécies <i>Wickerhamiella</i> sp. nov. 1 e <i>Wickerhamiella</i> sp. nov. 2	77
Figura 20. Árvore consenso da espécie <i>Yamadazyma</i> sp. nov. 1	78
Figura 21. Árvore consenso da espécie <i>Zygosacchomyces</i> sp. nov. 1	79
Figura 22. Aspecto morfológico das possíveis espécies novas isoladas neste trabalho	80
Figura 23. Aspecto morfológico das possíveis espécies novas isoladas neste trabalho	81

Figura 24. Aspecto morfológico das possíveis espécies novas isoladas neste trabalho 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição de ácidos graxos do óleo desesterificado de amostras de <i>B. crassifolia</i>	23
Tabela 2. Identificação dos insetos associados a flores de <i>B.crassifolia</i>	31
Tabela 3. Leveduras isoladas de flores, frutos e insetos associados ao murici (<i>B.crassifolia</i>) no Município de Araguatins, estado do Tocantins	41
Tabela 4. Leveduras isoladas de insetos associados a flores de murici (<i>B.crassifolia</i>)	45
Tabela 5. Lista das possíveis espécies novas isoladas no presente trabalho e as espécies filogeneticamente mais próximas dessas novas espécies	48
Tabela 6. Diversidade de Shannon-Wiener (H') e Equitabilidade (E) da comunidade DE leveduras isoladas nas amostras de flores, frutos e insetos associados ao murici, no município de Araguatins, estado do Tocantins	49
Tabela 7. Quociente de similaridade de Sorensen (SO_{ij}) para leveduras isoladas nas amostras de flores, frutos e insetos associados ao murici	52

RESUMO

As plantas possuem diferentes micro-habitats favoráveis ao desenvolvimento de leveduras, tais como flores, frutos, seiva e tecidos em decomposição. Contudo, a maioria das leveduras que coloniza esses microambientes depende de insetos para a sua dispersão. Assim, as flores e os frutos visitados por insetos geralmente contém densas populações de leveduras, o que os tornam, juntamente com os insetos associados, ótimos substratos para o isolamento de novas espécies destes microrganismos. Dentro deste contexto, pouco se sabe sobre a diversidade de leveduras associadas a flores, frutos e insetos que visitam o murici (*Byrsonima crassifolia*) em ecossistema de Cerrado. As flores desta espécie não produzem néctar, e esta planta oferece óleo e pólen com recursos florais para atração de polinizadores. O presente trabalho teve como objetivo analisar a diversidade de leveduras associadas a flores, frutos e insetos visitantes do muricizeiro. Neste sentido, foram isoladas leveduras a partir de amostras de flores, frutos e insetos associados ao murici coletados no município de Araguatins, estado do Tocantins. As leveduras foram identificadas por meio de caracterização morfológica, por PCR *fingerprinting* e também pelo sequenciamento dos domínios D1/D2 e dos espaçadores transcritos internos (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do RNA ribossomal. Para estimar a diversidade de leveduras associadas a estes substratos foram realizadas análises de diversidade α e β . O esforço amostral foi avaliado utilizando-se curvas de acumulação de espécies. A partir das amostras coletadas foram isoladas 500 leveduras identificadas como pertencentes a 94 espécies, sendo que 20 podem ser consideradas novas para a ciência. Os resultados mostraram que as comunidades de leveduras presentes nas flores, frutos e insetos associados a *B. crassifolia* são compostas em sua maioria por espécies comumente recuperadas a partir de amostras de plantas. Dentre as amostras de flores, as espécies de leveduras mais frequentes foram *Aureobasidium pullulans*, *Papiliotrema flavescens*, *Candida apicola* e *Meyerozyma guilliermondii*. A espécie mais frequente nas amostras de insetos foi *Moniliella fonsecae*, seguida de *A. pullulans*. Nas amostras de frutos as espécies mais frequentes foram *Pichia occidentalis*, *Zygoscharomyces bailii*, *Sterigmatomyces halophilus*, *P. kluyveri*, *P. kudriavzevii* e *C. tropicalis*. As análises de diversidade mostraram que a comunidade de leveduras encontrada nas amostras de insetos foi a mais diversa. As curvas de acumulação das espécies de leveduras não atingiram a estabilidade, indicando que um maior esforço amostral poderia cobrir a riqueza de espécies esperada nos substratos estudados.

Palavras-chave: diversidade. leveduras. flores. frutos. insetos polinizadores. murici. *Byrsonima crassifolia*.

ABSTRACT

Plants have many different microhabitats favorable to the growth of yeasts, such as flowers, fruits, sap and decomposing tissues. However, most yeasts that colonize these microenvironments depends on insects toward dispersal. Thus, flowers and fruits visited by insects usually contains heavy yeast population, which makes them, including insects, excellent substrates for the isolation of new species of these microorganisms. In this context, little is known about the pattern of yeast diversity associated with flowers, fruits and insects that visit the murici (*Byrsonima crassifolia*) in cerrado ecosystem. The flowers of this species does not produce nectar, and this plant offers oil and pollen as floral resources to attract pollinators. The present study aims to evaluate the diversity of yeasts associated with flowers, fruits and insects visitors muricizeiro. In this case, strains yeasts are going isolated from flowers samples, fruits, and associated with murici collected in the city of Araguatins, state of Tocantins. The yeasts were identified by morphological characterization, PCR *fingerprinting* and sequencing domains D1/D2 of the large subunit ribosomal RNA gene, as well as sequencing the internal transcribed regions (ITS1-5.8S-ITS2) of the ribosomal RNA gene. To diversity analysis, is going to performed α and β diversity analysis. The sampling effort is going to assessed using accumulation curves. From the collected samples were isolated 500 yeasts belonging to 94 species, of which 20 could be considered as new species. The results showed that the community of yeasts present in the flowers, fruits and insects associated to *B. crassifolia* is composed mostly of species commonly recovered from plant samples. Among the flower samples, the most frequent yeasts species were *Aureobasidium pullulans*, *Papiliotrema flavescens*, *Candida apicola* and *Meyerozyma guilliermondii*. The most frequent species in the insect samples was *Moniliella fONSECAE*, followed by *A. pullulans*. In the fruit samples, the most frequent species were *Pichia occidentalis*, *Zygoscharomyces bailii*, *Sterigmatomyces halophilus*, *P. kluyveri*, *P. kudriavzevii* and *C. tropicalis*. The diversity analyzes showed that the yeast community found in the insect samples was the most diverse. The accumulation curves of the yeast species did not reach stability, indicating that a larger sampling effort could cover the species richness expected in the studied substrates.

Key words: diversity. yeasts. flowers. fruits. pollinating insects. murici. *Byrsonima crassifolia*.

1.INTRODUÇÃO

1.1 Leveduras: características gerais

As leveduras constituem um grupo de microrganismos pertencentes ao Domínio *Eukarya*, Reino Fungi, sendo classificadas em dois filos: Ascomycota e Basidiomycota (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Leveduras estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em diversos ambientes como o solo, ambientes aquáticos e em superfícies de plantas e animais. As leveduras desempenham funções ecológicas significativas, atuando na decomposição de matéria orgânica, favorecendo o crescimento radicular e o desempenho da planta, melhorando interações planta-micorrizas, estabelecendo relações mutualísticas entre plantas e invertebrados e atuando também na colonização primária de substratos ricos nutricionalmente (STARMER; LACHANCE, 2011; HITTINGER et al., 2015; MASINOVÁ et al., 2017).

Em geral, as leveduras são caracterizadas por se reproduzirem assexuadamente por brotamento ou fissão, o que resulta em um crescimento vegetativo predominantemente unicelular. Durante a reprodução sexuada, estes fungos produzem células especializadas não encerradas em corpos de frutificação denominadas ascósporos ou basidiósporos. Algumas leveduras produzem brotos que não se separam da célula parental, formando um pseudomicélio, outras crescem tanto na forma filamentosa quanto na forma unicelular. Leveduras também são caracterizadas pela ausência de motilidade, presença de núcleo individualizado por membrana nuclear e parede celular rígida. Embora caracteres morfológicos sejam utilizados na identificação e descrição de espécies, a possibilidade de haver uma variedade de formas diferentes, dependendo do meio de cultivo de leveduras da mesma espécie, faz com que a morfologia não possa ser considerada como critério decisivo para identificação destes fungos (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Leveduras não possuem pigmentos fotossintetizantes, sendo heterotróficas, e necessitam de quantidades significativas de carbono orgânico e minerais para o crescimento (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Estes microrganismos podem crescer tanto na presença como na ausência de oxigênio e podem produzir energia por meio da respiração celular e da fermentação (MAUTONE, 2008; LACHANCE; STARMER, 2011). A temperatura ótima de crescimento das leveduras está entre 25 e 30°C e pH na faixa de 4 a 7 (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Historicamente, as leveduras têm sido associadas a processos fermentativos, pois a humanidade há milênios vem utilizando estes microrganismos na produção de diversos tipos de

alimentos, como no crescimento de massas de panificação e produção de bebidas alcoólicas fermentadas (vinho e cerveja) ou destiladas (rum, vodca, uísque, etc) (KURTZMAN, 2014). Mais recentemente, as leveduras vêm sendo largamente utilizadas na produção de compostos químicos, biocombustíveis, na indústria alimentícia e têxtil, produção de fármacos, entre outras aplicações (HITTINGER et al., 2015; KURTZMAN et al., 2015; RILEY et al., 2016).

1.2 Leveduras associadas a plantas

A habilidade das leveduras em assimilar um grande número de compostos orgânicos favorece a colonização por estes microrganismos de inúmeros substratos (MOLLER, LERM, BOTHA, 2016; RILEY et al., 2016). Nesse sentido, as plantas mostram-se excelentes habitats para uma grande quantidade de leveduras, pois por meio da fotossíntese, há a produção de açúcares simples, polissacarídeos e outros compostos de carbono, incluindo algumas vitaminas, que são utilizados por estes microrganismos para o crescimento. Além disso, as plantas fornecem diversos substratos com diferente composição nutricional e disponibilidade de água (ANDREWS; HARRIS, 2000; MOLLER, LERM, BOTHA, 2016). Dessa forma, as plantas propiciam uma sucessão efêmera de micro-habitats para o crescimento e nutrição de leveduras, o que tem sido observado em vários ambientes (LACHANCE et al., 2001). Estes micro-habitats incluem tecidos em decomposição, filoplano, exsudatos, flores, néctar e frutos (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; POZO; HERRERA; BAZAGA, 2011; DAYO-OWOYEMI et al., 2014; LOPES et al., 2015; POZO et al., 2015; SANTOS et al., 2015; MOLLER, LERM, BOTHA, 2016; WANG et al., 2017).

1.2.1 Leveduras associadas a flores

A maioria das plantas que floresce produz néctar na base da corola, mais especificamente na região do nectário floral, sendo que o néctar é a recompensa mais comumente fornecida pelas plantas a seus polinizadores (HERRERA; POZO; MEDRANO, 2013). O elevado teor de açúcares (sacarose, glicose e frutose) comum em néctares florais também serve como uma fonte com alta disponibilidade nutricional para sustentar o desenvolvimento microbiano. Além disso, essas altas concentrações de açúcares podem tornar o néctar um habitat seletivo em favor de leveduras fermentadoras e osmotolerantes, principalmente do filo Ascomycota (NICOLSON; THORNBURG, 2007; CANTO, A.; HERRERA, 2012; HERRERA, 2014). Contudo, leveduras de perfil nutricional generalista têm sido frequentemente isoladas de vários habitats, incluindo outros órgãos florais (WEHNER et

al., 2017). Deste modo, as flores tornam-se um habitat ideal para o desenvolvimento de uma rica comunidade de leveduras (LACHANCE et al., 2001; BRYSCH-HERZBERG, 2004; HERRERA et al., 2009, 2010; POZO; HERRERA; BAZAGA, 2011; POZO et al., 2015; ÁLVAREZ-PÉREZ et al., 2016).

A diversidade de leveduras presente nas flores parece também estar diretamente relacionada à frequência de visitação por insetos (BRYSCH-HERZBERG, 2004). Os insetos visitantes introduzem as leveduras por meio de suas peças bucais e as consomem juntamente com o néctar, e assim, acabam por disseminá-las de flor em flor. As flores não visitadas por insetos podem apresentar baixa densidade de células leveduriformes (LACHANCE et al., 2001; BRYSCH-HERZBERG, 2004; RUIVO, 2005; CANTO et al., 2008; HERRERA; POZO, 2010).

As leveduras comumente utilizam flores como habitat (LACHANCE et al., 2001; HERRERA et al., 2009; HERRERA, 2014). De modo geral, a microbiota mais comumente encontrada em flores é constituída por um grupo bem definido, formado pelos clados *Naganishia*, *Papiliotrema*, *Rhodosporidiobolus*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* dentre os basidiomicetos, e *Aureobasidium*, *Hanseniaspora*, *Kodamaea*, *Metschnikowia*, *Starmerella* e *Wickerhamiella* dentre os ascomicetos (LACHANCE et al., 1998b; 1998c; ROSA et al., 2007a; POZO; HERRERA; BAZAGA, 2011; CADEZ et al., 2014; DE VEGA et al., 2014; WEHNER et al., 2017). Estudos realizados a partir de flores de espécies pertencentes às famílias Convolvulaceae, Heliconiaceae, Malvaceae, Bromeliaceae, Ranunculaceae e Fabaceae mostraram que estas flores são uma rica fonte de novas espécies de leveduras. A maioria das espécies de leveduras isoladas a partir destas plantas pertence aos clados *Metschnikowia*, *Kodamaea*, *Starmerella*, *Wickerhamiella*, (LACHANCE et al., 2001; BARBOSA et al., 2012; SANTOS et al., 2015) e *Moniliella* (THANH; HIEN; THOM, 2013).

Trabalhos sobre leveduras associadas a flores no Brasil mostraram a ocorrência de várias espécies novas desses microrganismos, como *Metschnikowia cerradonensis*, isolada a partir de flores de *Ipomoea* spp. e besouros nitidulídeos associados coletados no estado do Tocantins (ROSA et al., 2007a); *Hanseniaspora nectarophila* e *Wickerhamiella kiyanii*, isoladas a partir de flores de *Syphocampylus* sp. coletadas no estado de São Paulo (CADEZ et al., 2014; DAYO-OWOYEMI et al., 2014); *Metschnikowia matae* isolada a partir de flores de ipomeia e ipê, e de besouros nitidulídeos associados a estes substratos, coletados em áreas de Mata Atlântica de Minas Gerais e Rio de Janeiro (SANTOS et al., 2015); e *Papiliotrema miconiae* isolada de flores de *Miconia* sp. coletadas no Rio de Janeiro (PAGANI et al., 2016). Esses trabalhos mostram que as flores são um habitat rico para a descoberta de novas espécies de leveduras.

Além de pólen e néctar, um grupo relativamente restrito de plantas oferece óleos florais como recompensa aos seus polinizadores. O primeiro autor a descrever a produção de óleo floral foi VOGEL (1969) que denominou o fenômeno como “síndrome floral”, que se constitui pela presença de estruturas especializadas denominadas elaióforos. Os elaióforos (gr. *elaion*= óleo, azeite; Gr. *phoros*= que porta) são estruturas glandulares que secretam ou acumulam óleos (PEREIRA; FREITAS, 2002; RIBEIRO; RÊGO; MACHADO, 2008). A presença de óleos florais foi observada em um grupo restrito de plantas que estão distribuídas em oito ordens, oito famílias (Iridaceae, Krameriasceae, Malpighiaceae, Orchidaceae, Scrophulaceae, Curcubitaceae, Melastomataceae, Solanaceae, Myrcinaceae), 79 gêneros e 2402 espécies espalhadas por todo o mundo (BUCHMANN, 1987). Nas famílias Scrophulariaceae, Solanaceae, Primulaceae e Iridaceae, os óleos são armazenados em tricomas localizados nas pétalas, na base das anteras ou em partes do ovário e são denominados de elaióforos tricomáticos. Nas famílias Malpighiaceae, Orchidaceae e Krameriaceae, as estruturas produtoras de óleos se localizam em glândulas epidérmicas denominados de elaióforos epiteliais (GIESE, 2005). As plantas pertencentes a estas famílias oferecem óleo como recompensa para atrair polinizadores em substituição ou em complementação ao néctar (BUCHMANN, 1987). Há estimativas que os óleos florais fornecem duas a quatro vezes mais energia por unidade de massa do que os carboidratos do néctar (BUCHMANN, 1987; RAMALHO; SILVA, 2002). Além da presença de óleo em glândulas externas, frequentemente os grãos de pólen produzidos por plantas dessas famílias são viscosos e recobertos por óleo, o que facilita a aderência do pólen ao corpo dos insetos fazendo com que atuem como agentes polinizadores (PEREIRA; FREITAS, 2002).

Em relação à diversidade de leveduras associadas a flores produtoras de óleo, há uma grande carência de trabalhos que abordaram essa temática. Nesse sentido, pode-se citar apenas o trabalho de Rosa e colaboradores (2009) que descreveram a espécie *Moniliella fonsecae* isolada a partir de flores de murici (*Byrsonima orbignyana* - Malpighiaceae). Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de trabalhos que forneçam dados acerca do perfil das comunidades de leveduras que habitam flores produtoras de óleo para verificar a riqueza de espécies e a possibilidade de ocorrência de espécies restritas a este micro-habitat.

De forma geral, as flores têm uma vida útil curta e as recompensas florais podem evaporar devido a altas temperaturas, serem diluídas pela chuva, consumidas rapidamente pelos animais ou deteriorar pela morte da flor (BRYSCH-HERZBERG, 2004; CANTO et al., 2008). Dessa forma, as flores constituem um micro-habitat específico e efêmero, onde as comunidades de leveduras presentes funcionam como metacomunidades (grupo de comunidades locais que

trocam espécies) com intensa dinâmica de colonização-extinção (LIEVENS et al, 2014). Assim, quando descobertas, muitas destas leveduras podem representar espécies ainda não descritas, e às vezes pertencer a novos gêneros ou novas famílias (SUH; NGUYEN; BLACKWELL, 2006).

1.2.2 Leveduras associadas a insetos que visitam plantas

Leveduras são organismos imóveis e necessitam de vetores para sua dispersão. Estes fungos são dispersos de flor em flor principalmente por insetos que usualmente carregam células de leveduras em seus corpos e/ou no trato digestivo. Estes insetos são atraídos por recompensas florais, e quando visitam as flores, inoculam estes microrganismos, embora também ocorra a dispersão pela água e mais raramente pelo vento (LACHANCE et al., 2001; BRYSCH-HERZBERG, 2004; BELISLE; PEAY; FUKAMI, 2012; POZO; HERRERA; BAZAGA, 2011; LIEVENS et al., 2014). O mutualismo planta-levedura-inseto tem sido restrito a um pequeno grupo de insetos específicos, principalmente besouros, abelhas, vespas, formigas, drosófilas, borboletas e neurópteros (NGUYEN; SUH; BLACKWELL, 2007; STARMER; LACHANCE, 2011; STAMPS et al., 2012).

Os insetos disseminam leveduras no ambiente e em contrapartida também podem se beneficiar desta interação (MORAIS; PAGNOCCA; ROSA, 2006). Muitos insetos necessitam de leveduras em sua dieta durante o seu ciclo de vida normal de larva a adulto, e neste caso as leveduras são uma fonte de esteróis, proteínas e vitaminas (STARMER; LACHANCE, 2011). Desse modo, leveduras são frequentemente isoladas do intestino ou da superfície de insetos que se alimentam de uma grande variedade de substratos, incluindo frutos, flores, néctar, madeira e até mesmo corpos de frutificação de fungos basidiomicetos (LACHANCE et al., 2001; STAMPS et al., 2012; URBINA; SCHUSTER; BLACKWELL, 2013).

Em consequência de preferências por nichos específicos, os vetores promovem uma distribuição desigual das leveduras e criam barreiras para a troca genética entre espécies de diferentes substratos, o que gera uma alta especificidade entre algumas comunidades de leveduras e seus micro-habitats (LACHANCE; BOWLES; STARMER, 2003; GANTER, 2006; STARMER; LACHANCE, 2011). Em alguns casos, essa especificidade se mostrou tão intensa que acredita-se que algumas espécies de leveduras e insetos possam ter coevoluído (LACHANCE; BOWLES; STARMER, 2003). Exemplo disso são as leveduras isoladas no sistema flor-besouro (principalmente em flores de ipomeia, hibiscos e de cactáceas), que geralmente ocorrem em locais específicos, de modo que a distribuição das leveduras está diretamente associada à distribuição tanto da planta hospedeira quanto desse vetor

(LACHANCE, BOWLES, 2002; GANTER, 2006, LACHANCE et al., 2016). Nesse sentido, estudos conduzidos nas regiões Neotropical, Neártica e Australiana mostraram que leveduras de flores efêmeras e seus insetos, principalmente besouros da família Nitidulidae, sobretudo os dos gêneros *Conotelus* e *Aethina*, abrigam uma comunidade de leveduras bastante específica, com predomínio de espécies dos clados *Aureobasidium*, *Kodamaea*, *Kurtzmaniella*, *Metschnikowia*, *Starmerella* e *Wickerhamiella* (LACHANCE et al., 2000; 2001; 2008; LACHANCE; BOWLES, 2002; LACHANCE; BOWLES; STARMER, 2003; ROSA et al, 2007a; FREITAS et al., 2013; CLINE et al., 2014; LACHANCE; FEDOR, 2014; LACHANCE et al., 2016).

Outros trabalhos mostraram a especificidade da comunidade de leveduras associadas a insetos. Urbina, Schuster e Blackwell (2013) estudaram a interação entre leveduras e besouros passalídeos (Passalidae, Coleoptera) associados a madeira em decomposição na Guatemala. Os autores isolaram 771 leveduras do intestino desses insetos, sendo que *Scheffersomyces shehatae* e *Sc. stipitis* foram os taxa mais abundantes. Os autores também isolaram espécies dos clados *Trichosporon*, *Lodderomyces*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, *Sugiyamaella*, *Phaffomyces* e *Spencermartinsiella*. Além deste estudo, Ren e colaboradores (2015) descreveram duas leveduras do clado *C. albicans/Lodderomyces* (*C. baotianmanensis* e *C. pseudoviswanathii*) isoladas do intestino de besouros coletados na China.

Leveduras também estão frequentemente associadas a diversas espécies de abelhas (PIMENTEL et al., 2005; GANTER, 2006; DANIEL et al., 2013). No sistema abelha-flor-levedura predominam espécies dos clados *Metschnikowia* e *Starmerella*, e estas incluem leveduras isoladas de pólen, néctar, mel e resíduos depositados nas colmeias de várias espécies de abelhas sociais e também em celas de abelhas solitárias (LACHANCE et al., 2001; ROSA et al., 2003; DANIEL et al., 2013; HERRERA; POZO; MEDRANO, 2013).

Os principais dípteros encontrados em associação com leveduras são moscas do gênero *Drosophila*, e a partir destas foram isoladas leveduras pertencentes principalmente aos clados *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saturnispora* e *Wickerhamiella* (LACHANCE et al. 1998b; 1998c; LACHANCE et al., 2001; GIMÉNEZ-JURADO, 2003; LACHANCE; BOWLES; STARMER, 2003; DE VEGA et al, 2012; HAMBY et al., 2012; CHANDLER; EISEN; KOPP, 2012). Vários estudos em ecossistemas brasileiros mostraram que a diversidade de leveduras associadas à drosófilas é constituída basicamente de espécies dos clados *Aureobasidium*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Starmerella*, *Pichia*, *Meyerozyma*, *Kurtzmaniella*, *Saturnispora*, *Kodamaea*, *Clavispora*, *Geotrichum* e *Debaryomyces* (MORAIS

et al., 1995a, 1995b; MORAIS; ROSA, 2000; MORAIS; LACHANCE; ROSA, 2005; ROSA et al, 2006; 2007a; PIMENTA et al., 2009; JAMES et al., 2011).

A diversidade de leveduras associadas a insetos que se alimentam de partes de plantas, sobretudo flores produtoras de néctar, tem sido extensivamente investigada nas últimas décadas. Entretanto, não há estudos sobre a diversidade de leveduras associadas a insetos coletores de óleo floral. A relação entre flores produtoras de óleos e insetos caracteriza-se no sentido de que os lipídeos são conhecidos por manter um papel importante na biologia reprodutiva de muitas abelhas das tribos Centridini, Exomalopsini, Tetrapediini e Tapinotaspidini. Os óleos florais são utilizados para a alimentação das larvas, impermeabilização dos ninhos e, possivelmente, na alimentação dos adultos (VINSON et al, 1997; SIGRIST; SAZIMA, 2004; COSTA et al., 2006). Nas abelhas do gênero *Centris*, o óleo é coletado especialmente pelas fêmeas, que o carregam para os ninhos, misturando-o com pólen e depositando seus ovos nesta mistura. As larvas que nascem possuem uma dieta rica em lipídios para se desenvolver. Deste modo, os lipídios também estão relacionados à evolução da relação entre plantas e polinizadores, ou seja, as abelhas se beneficiam pela dieta de alto valor nutricional e as plantas são fielmente polinizadas por elas (GIESE, 2005). Contudo, não existem estudos sobre a ocorrência de leveduras associadas a este substrato.

1.2.3 Leveduras associadas a frutos

Os frutos também são importantes micro-habitats para uma grande quantidade de espécies de leveduras devido à alta concentração de açúcares simples, baixo pH e visitas constantes de insetos (STARMER; LACHANCE, 2011). Para se transformar em fruto, uma flor sofre alterações bioquímicas e fisiológicas que acabam influenciando a comunidade de leveduras presentes. Por esse motivo, nem sempre as populações encontradas nas flores serão as mesmas encontradas nos frutos (RUIVO, 2005). A colonização de habitats efêmeros depende de fatores como a disponibilidade de nutrientes assimiláveis, incluindo açúcares simples, e a habilidade de usar outros nutrientes após a exaustão desses açúcares. As espécies que primeiramente colonizam os frutos maduros ou em início de deterioração são caracterizadas pelo rápido crescimento e baixo perfil de assimilação, são geralmente leveduras apiculadas e fermentadoras como espécies do gênero *Hanseniaspora* (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Contudo, o processo de amadurecimento do fruto pode alterar as populações de leveduras, pois a exaustão de nutrientes e a intolerância ao etanol podem limitar a variedade de espécies, as quais podem ser substituídas por outras mais generalistas (MORAIS et al., 1995a;

ABRANCHES; STARMER; HAGLER; 2001). Nessa perspectiva, a produção de enzimas proteolíticas e pectinolíticas desempenha um papel muito importante no estabelecimento e manutenção da comunidade de leveduras durante a colonização dos frutos, pois a produção dessas enzimas causa a degradação do tecido da fruta e concomitantemente provoca a liberação dos açúcares das células, que, por sua vez, podem ser assimilados pela levedura (BLANCO; SIEIRO; VILLA, 1999; MAMBUSCAY et al., 2013).

Estudos conduzidos nas últimas décadas vem descrevendo muitos gêneros relacionados ao padrão de diversidade de leveduras associadas a frutos. Nesse sentido, pode-se citar a comunidade de leveduras isoladas em frutas cítricas em decomposição (laranjas, limões, tangerinas e toranjas) produzidas na Argentina, na qual as espécies mais comuns foram *P. kluyveri*, *P. membranifaciens*, *M. guilliermondii*, *C. stellata* (clado *Starmerella*) e *Hanseniaspora* sp. (SPENCER et al., 1992); a descrição de três espécies do gênero *Metschnikowia* (*Met. shanxiensis*, *Met. sinensis* e *Met. zizyphicola*), isoladas na superfície de frutos de jujuba (*Zizyphus jujuba*) originários da China (XUE et al., 2006); a descrição de *Hanseniaspora thailandica*, isolada a partir de goiaba apodrecida (*Psidium guajava*) na Tailândia (JINDAMORAKOT et al, 2009); as descrições de *C. citri* e *Kuraishia borneonana*, isoladas a partir de frutas apodrecidas coletadas em Borneo (SIPICZKI, 2011; 2012a); o isolamento de leveduras a partir de figos (*Ficus carica*) e avaliação do seu potencial como agentes de biocontrole de doenças em frutas no período de pós-colheita, com ocorrência das espécies *A. pullulans*, *C. carpophila* (clado *Meyerozyma*), *Hanseniaspora* spp., *M. caribbica*, *Met. Pulcherrima* e *Torulasporea delbrueckii* (RUIZ-MOYANO et al., 2016). Além destes trabalhos, *Met. persici*, uma levedura produtora de protease, foi descrita a partir de isolados da superfície de pêssegos (*Prunus persica*) coletados na China (WANG et al., 2017).

Muitos trabalhos conduzidos no Brasil também foram bastante significativos, como a comunidade de leveduras isolada de goiaba (*Psidium guajava*) na qual as espécies predominantes foram *P. kluyveri*, *P. membranifaciens*, *Hanseniaspora* spp. e *Issatchenkia* (*Pichia*) spp. Além disso, outras leveduras isoladas mostram ser micocinogênicas como *C. diddensia* e (clado *Yamadazyma*), *C. stellata*, *Hanseniaspora* sp., *Kloeckera lindneri*, *P. terricola*, *P. kluyveri*, *P. membranifaciens*, *Saturnispora diversa* e *T. delbrueckii* (ABRANCHES et al., 2000); o isolamento de leveduras epífitas de abacaxi, representadas por *M. guilliermondii*, *Rh. glutinis*, *N. albida* e *Cystobasidium minutum* (REYES; ROHRBACH; PAULL, 2004); a descrição de *C. sergipensis* (clado *Wickerhamiella*) isolada a partir de polpas congeladas de frutas de umbú (*Spondias tuberosa*) e mangaba (*Hancornia speciosa*) (TRINDADE et al., 2004); a ocorrência de leveduras em frutos de espécies vegetais nativas da

Mata Atlântica (*Leandra reversa*, *Gomidesia schaueriana*, *Chiococca alba*, *Euterpe edulis*, *Paulinia* sp. e *Smilax* sp.) em São Paulo, nas quais predominaram os gêneros *Metschnikowia* e *Hanseniaspora*, seguidos pelos clados *Kodamaea*, *Hannaella*, *Bullera*, *Solicoccozyma*, *Rhodosporidiobolus*, *Heterocephalacria* e *Naganishia* (RUIVO, 2005); e a descrição de *C. azymoides* (clado *Wickerhamiella*) a partir de isolados encontrados em associação a larvas de moscas (*Nastrepha mucronota*) e frutas tropicais (*Peritassa campestris* e *Eugenia uniflora*) no Tocantins e Sergipe (ROSA et al., 2006). Além destas espécies, *Wickerhamiella fructicola* foi descrita a partir de isolados obtidos de frutos de *Hedychium coronarium* no estado de São Paulo (DAYO-OWOYEMI et al., 2014).

Mais recentemente, outros trabalhos mostram o isolamento de leveduras a partir de frutos tropicais (mamão, *Carica papaya*; cajú, *Anacardium occidentale*; sapoti, *Manilkara zapota*; manga, *Mangifera indica*; murici, *Byrsonima crassifolia* e acerola, *Malpighia glabra*) e a avaliação da atividade inibitória desses microrganismos contra *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*. Das leveduras isoladas, 29 foram positivas para o fenótipo *killer* (micocinogênicas) e identificadas como *Kodamaea ohmeri*, *Wickerhamomyces anomalus*, *P. kluyveri*, *C. aaseri* (clado *Yamadazyma*) e *M. guilliermondii* (LIMA et al., 2012). Portanto, plantas e insetos associados são excelentes substratos para isolamento de leveduras, incluindo novas espécies.

1.2.4 O gênero *Moniliella*

O gênero *Moniliella* foi criado por Stolk e Dakin em 1966, a partir de leveduras isoladas de sucos de fruta e xaropes. Inicialmente, foi criado para abrigar *Moniliella acetoabutens* e *Moniliella tomentosa*. Rosa e colaboradores (2009), a partir da análise de sequências da região dos domínios D1/D2 do gene do RNA ribossomal, mostraram que o gênero *Trichosporonoides* e o gênero *Moniliella* formavam um único clado monofilético. Assim, os autores transferiram as espécies do gênero *Trichosporonoides* para o gênero *Moniliella*. Atualmente o gênero *Moniliella* possui doze espécies descritas: *Mon. acetoabutans*, *Mon. byzovii*, *Mon. carnis*, *Mon. dehoogii*, *Mon. fonsecae*, *Mon. megachiliensis*, *Mon. mellis*, *Mon. nigrescens*, *Mon. oedocephalis*, *Mon. pollinis*, *Mon. spathulata* e *Mon. suaveolens* (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; THANH; HIEN; THOM, 2013).

As espécies de *Moniliella* assimilam nitrato e a maioria é capaz de fermentar glicose, exceto *Mon. fonsecae*. Algumas espécies também são capazes de fermentar galactose, sacarose e rafinose, o que é incomum entre as leveduras basidiomicéticas. Morfologicamente as colônias

se apresentam cremosas, cerebriformes ou aveludadas, com coloração creme, acinzentada ou olivácea. A reprodução assexuada é caracterizada por brotamento multilateral, formação de hifas verdadeiras e artroconídios. Pseudo-hifas e clamidósporos podem estar presentes. A reprodução sexuada é ausente (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). As espécies deste gênero são reconhecidas pela osmotolerância e lipofilia, estas propriedades tornam essas leveduras promissoras para processos biotecnológicos. Nesse sentido, algumas espécies de *Moniliella* tem sido utilizadas para a produção comercial de eritritol, um adoçante de baixo teor calórico (PERKO; DECOCK, 2007; SAWADA et al., 2009; KOBAYASHI et al., 2015).

O status ecológico do gênero *Moniliella* não é bem compreendido. A maioria das espécies do gênero é encontrada em ambientes industriais, colonizando produtos alimentícios de origem animal não processados, gorduras, óleos e ácidos (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Os nichos naturais são geralmente ambientes osmóticos, como mel e flores (ROSA et al., 2009; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; THANH; HIEN; THOM, 2013).

Moniliella acetoabutens é uma espécie frequentemente associada à deterioração de alimentos com baixo pH, sendo também isolada de produtos contendo ácido acético (NAKAYAMA et al., 2016). O habitat natural dessa espécie é desconhecido, sendo isolada somente a partir de produtos manufaturados como sucos de frutas, picles e molhos para salada. *Moniliella oedocephalis* tem como habitat as larvas e as células de cria de abelhas (*Apis mellifera*). *Moniliella suaveolens* é comumente isolada de substratos gordurosos, como queijo, manteiga, margarina e produtos de panificação. *Moniliella mellis* é uma espécie osmofílica obtida a partir de mel. *Moniliella spathulata* só foi encontrada em associação à leite de búfala coletado na Índia (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Moniliella nigrescens foi obtida somente a partir de alimentos industrializados deteriorados como geleia de melão e marmelada. *Moniliella pollinis* não possui habitat natural bem definido porque a espécie é representada por apenas duas linhagens (*Mon. pollinis* e *Mon. madida*), isoladas a partir de pólen e margarina, respectivamente. No entanto, *Mon. madida* pode ser considerada osmofílica e lipofílica. A espécie *Mon. megachiliensis* é comumente encontrada em associação com intestino e fezes de larvas de abelhas cortadeiras de alfafa (*Megachile rotundata*) (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Moniliella fonsecae foi descrita por Rosa e colaboradores (2009) a partir de flores de *Angelonia pilosella* em Cuba, *Byrsonima orbigniana* (murici) no Brasil e uma flor não identificada na Tailândia. Em 2012, Thanh e colaboradores descreveram *Mon. carnis* e *Mon. dehoogii*, duas espécies provenientes de produtos cárneos processados. *Moniliella byzovii* foi

descrita por Thanh, Hien e Thom (2013) a partir de flores de *Ipomoea pes-caprae* e *Calotropis gigantea* coletadas no Vietnã. Neste trabalho foi utilizado um meio contendo 50% de glicose e 0,5% de extrato de levedura. Além de *Mon. byzovii* foram isoladas *Mon. megachiliensis*, *Mon. dehoogii* e *Mon. mellis*.

Com o objetivo de esclarecer as relações filogenéticas de *Malassezia* e *Moniliella*, Wang e colaboradores (2014) realizaram análises filogenéticas baseadas nos seis genes utilizados para abordar a filogenia no Reino Fungi [subunidade menor (18S) do gene do RNA ribossomal (rDNA), subunidade maior (26S) do rDNA (domínios D1/D2), região dos espaçadores transcritos internos (ITS 1 e 2, incluindo 5.8S rDNA), as duas subunidades da RNA polimerase II (RPB1 e RPB2) e o fator de alongamento de tradução EF1- α]. Os autores mostraram que *Malassezia* e *Moniliella* são dois clados irmãos às classes Ustilaginomycetes e Exobasidiomycetes, profundamente enraizados dentro de Ustilaginomycotina. Assim, foram propostas duas novas classes, Malasseziomycetes e Moniliellomycetes para estes grupos, com apoio adicional de caracteres fenotípicos.

Embora o posicionamento filogenético de *Moniliella* tenha sido resolvido, as espécies apresentam um alto grau de divergência genética entre as sequências dos domínios D1/D2 do gene do RNA ribossomal, com cerca de 50 a 100 substituições nucleotídicas entre as espécies filogeneticamente mais próximas (ROSA et al., 2009; THANH et al., 2012; THANH; HIEN; THOM, 2013). Apenas 12 espécies estão descritas até o momento, com algumas apresentando diferenças marcantes tanto em morfologia quanto nas características genéticas e bioquímicas (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; THANH; HIEN; THOM, 2013). Isto sugere que o gênero *Moniliella* possa na verdade representar vários gêneros ou até mesmo famílias diferentes, sendo necessária a descoberta de novas espécies afim de preencher estas lacunas.

1.3 *Byrsonima crassifolia* (murici): distribuição, biologia e leveduras associadas

Byrsonima é um dos gêneros de família Malpighiaceae de maior destaque entre os taxa brasileiros. Este gênero é composto por cerca de 150 espécies, sendo que 100 delas estão amplamente distribuídas no país. As espécies são distinguidas pela cor das flores, frutos e local de ocorrência de cada planta (AGUIAR; DAVID; DAVID, 2005). Assim, são conhecidos o murici amarelo, o murici branco, o murici vermelho, o murici-de-flor-branca, o murici-da-chapada, o murici-do-brejo, entre outros (GOMES, 2005). O muricizeiro é nativo do Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil e pode ocorrer em diferentes ambientes como restingas, florestas e cerrados nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais,

Goiás, Bahia, Paraíba, Tocantins e Distrito Federal (GOMES, 2007; CAVALCANTE, 2010; CARVALHO; NASCIMENTO, 2013).

Byrsonima crassifolia possui porte arbustivo ou de uma pequena árvore, podendo chegar até 6 metros de altura; o caule é tortuoso, revestido por uma casca espessa, mole, com presença de lenticelas (Figura 1) (STEHMANN, 2012). As folhas são opostas, simples, coriáceas, de lâmina largo-elíptica, com ápice agudo ou obtuso e base arredondada. As inflorescências são do tipo racemos terminais alongados com muitas flores de cor amarela, medindo entre 7 e 11cm de comprimento (PEREIRA; FREITAS, 2002; LORENZI, 2009). As flores medem cerca de 14 mm x 7 mm de comprimento, são hermafroditas, zigomorfas, pentâmeras, diurnas, sem odor perceptível e não produzem néctar (Figura 2). O cálice é amarelado e gamossépalo, cada uma de suas sépalas possui um par de glândulas epiteliais elípticas que produzem e armazenam óleo (elaióforos) (VINSON et al, 1997; PEREIRA; FREITAS, 2002).



Figura 1- Árvore de *B. crassifolia*, L. Kunth.

Uma vez que nas flores de *B. crassifolia* não há produção de néctar, esta espécie oferece óleo e pólen como recursos florais para atração de polinizadores (VINSON et al, 1997; PEREIRA; FREITAS, 2002). Apesar disso, o muricizeiro atrai às suas inflorescências grande diversidade de insetos, sendo que o óleo floral é coletado principalmente por abelhas fêmeas das tribos Centridini (*Centris* e *Epicharis*), Exomalopsini (*Exomalopsis*), Tetrapediini (*Tetrapedia*) Tapinotaspidini (*Paratetrapedia*) e Meliponini (*Trigona*), e é utilizado para a alimentação das larvas, impermeabilização dos ninhos e, possivelmente, na alimentação dos adultos (VINSON et al, 1997; COSTA et al., 2006; REGO et al., 2006). Além da presença de óleo em glândulas externas, os grãos de pólen são viscosos e recobertos por óleo, assim, enquanto os óleos secretados nos elaióforos atraem visitantes florais em busca de alimento, os óleos presentes nos grãos de pólen facilitam a aderência do pólen ao corpo dos insetos fazendo com que atuem como agentes polinizadores da espécie (PEREIRA; FREITAS, 2002).



Figura 2 - Inflorescência de *B. crassifolia* (A); botões florais, com setas indicando os elaióforos (B).

Em relação à composição química do óleo floral produzido por *B. crassifolia*, pode-se citar apenas o trabalho de Vinson e colaboradores (1997) que encontraram mono e diglicerídeos, ácidos graxos livres, uma pequena quantidade de triglicerídeos e traços de carboidratos no óleo floral. A composição dos glicerídeos é predominantemente de ésteres de ácidos graxos de C-18 a C-22 (Tabela 1). Além disso, estes autores analisaram o óleo retirado das patas de abelhas do gênero *Centris* (*C. adana* e *C. flavofasciata*) e do líquido retirado do ninho destas abelhas, encontrando o mesmo padrão de compostos químicos.

Tabela 1 – Composição de ácidos graxos do óleo desesterificado de amostras de *B.crassifolia*.

Composto		Porcentagem total
Mirístico	C14:0	6
Palmítico	C16:0	19
Estearico	C18:0	16
Oleico	C18:1	30
Linoleico	C18:2	8
Eicosapentaenoico	C20:2	10-20
Desconhecido	C22:?	5

Fonte: Vinson e colaboradores (1997).

O fruto do murici é uma drupa globosa, glabra, com mesocarpo carnoso e polpa suculenta, com diâmetro de 1,5 a 2 cm e sementes de até 0,5 cm de diâmetro, sendo uma a três por fruto (Figura 3) (RATTER; DARGIE, 1992).

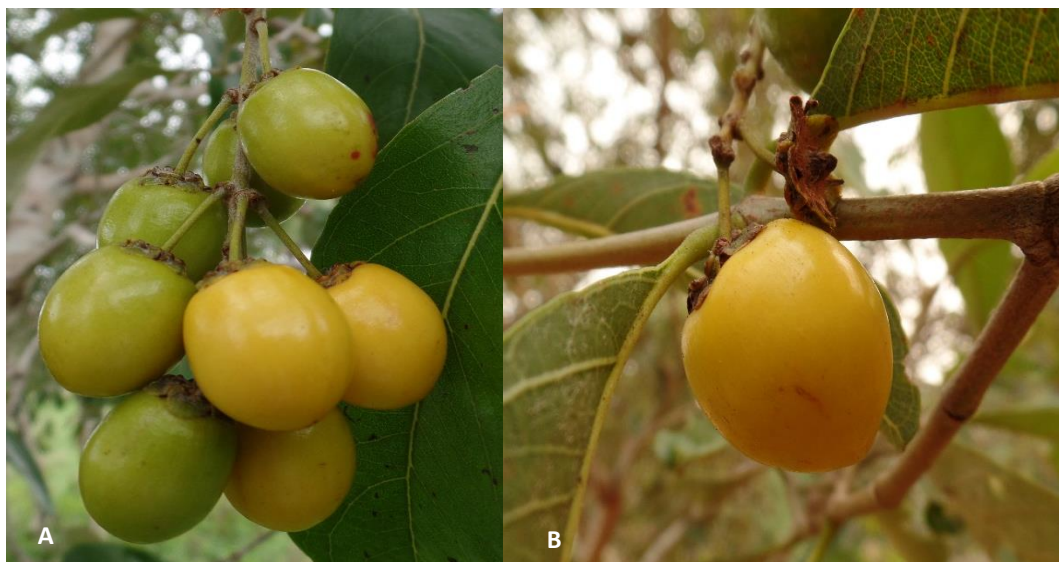


Figura 3 - Frutos de *B. crassifolia* em diferentes estágios de maturação (A); fruto maduro (B).

O fruto é rico em carboidratos, lipídeos, fibras e vitamina C (SIGUEMOTO, 2013). O murici é explorado de forma extrativista e consumido principalmente *in natura*, apresenta-se amarelado, com sabor agri-doce e um forte odor característico, semelhante a queijo rançoso (REZENDE; FRAGA, 2003). Sua comercialização ocorre em feiras livres e mercados locais, sendo muito apreciado pelas comunidades rurais. É utilizado também para aromatizar bebidas regionais, no fabrico de doces, sucos, licores, geleias, pudins, pavês e sorvetes (ALMEIDA, 1998; CAVALCANTE, 2010; CARVALHO; NASCIMENTO, 2013).

Na medicina popular, as partes de *B. crassifolia* são comumente usadas no tratamento de febre, tosse, tuberculose, inflamações, infecções fúngicas e bacterianas, bem como no tratamento de distúrbios gastrointestinais como diarreia (AGRA et al., 2008). Estudos experimentais vêm confirmando a atividade anti-inflamatória de extratos das cascas e sementes (MALDINI et al., 2009; RAMIREZ; COTERA; GUTIERREZ, 2013); a atividade antioxidante de extratos das cascas e folhas (SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2008), a atividade antimicrobiana de extratos das raízes, cascas e caule (CACERES et al., 1990, 1991; MARTINEZ-VASQUEZ et al., 1999; RIVERO-CRUZ et al., 2009); a atividade antiprotozoária de extratos alcoólicos das cascas e folhas (BERGER et al., 1998; AMARAL et al., 2006; PERAZA-SÁNCHEZ et al., 2007); a atividade depressora do sistema nervoso central de extratos aquosos das cascas e folhas (MORALES et al., 2001); o efeito antidepressivo de extratos metanólicos de partes aéreas (HERRERA-RUIZ et al., 2011) e o efeito benéfico para o tratamento de diabetes (diminuição dos níveis de glicose e lipídios no sangue e aumento do teor de insulina) utilizando-se extrato das sementes (GUTIERREZ; FLORES, 2014). Entretanto, ainda não há trabalhos que analisem se o óleo floral de *B. crassifolia* possui propriedades medicinais.

Flores, insetos visitantes de flores e frutos são importantes micro-habitats para uma grande quantidade de espécies de leveduras (STARMER; LACHANCE, 2011). Embora muitos estudos acerca da diversidade de leveduras associadas a estes micro-habitats tenham sido desenvolvidos nas últimas décadas, pouco se sabe sobre o padrão de diversidade de leveduras associadas a *B. crassifolia*. Nesse sentido, pode-se citar apenas o estudo conduzido por Sperandio, Martins do Vale e Moreira (2015) que investigaram a ocorrência de leveduras em plantas nativas do Cerrado coletadas em Brasília e o uso destes microrganismos como agentes de biocontrole de *Penicillium digitatum*. Neste estudo, a partir dos frutos da cagaita (*Eugenia dysenterica*) foram isoladas nove leveduras pertencentes às espécies *A. pullulans* e *Pseudozyma hubeiensis*. A partir dos frutos e folhas do murici (*B. crassifolia*) foram isoladas 19 leveduras pertencentes às espécies *A. pullulans*, *Ps. hubeiensis*, *Pa. nemorosus*, *Rh. mucilaginoso*, *W. sydowiorum*, *M. argovae* e *M. guilliermondii*. Dentre os 28 isolados, três leveduras identificadas como *A. pullulans* mostraram ser promissoras como agentes de biocontrole de *Pe. digitatum* nos ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Com relação à diversidade de leveduras associadas a flores e insetos visitantes de *B. crassifolia*, não há estudos consistentes que permitam conhecer o perfil das comunidades que habitam esses substratos. Nesse sentido, há dados relacionados somente a outra espécie de murici (*Byrsonima orbignyana*), da qual flores coletadas no estado do Tocantins atuaram como

substrato para isolamento e posterior descrição de *Mon. fonsecae* (ROSA et al, 2009). Dessa forma, estudos de diversidade utilizando-se *B. crassifolia* podem ajudar a esclarecer questões referentes à relação envolvendo leveduras, flores produtoras de óleo e insetos coletores. Assim, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de estudos sobre taxonomia e diversidade de leveduras abordando essa temática a fim de se conhecer a comunidade de leveduras associadas a estes micro-habitats.

2. JUSTIFICATIVA

As plantas propiciam diversos micro-habitats efêmeros para o crescimento e nutrição de leveduras. Entre estes habitats destacam-se as flores, pois estas produzem o néctar, substrato que atua como uma fonte com alta disponibilidade nutricional para sustentar o desenvolvimento microbiano. Contudo, um grupo relativamente restrito de plantas, da qual o murici (*B. crassifolia*) faz parte, oferece óleos florais como recompensa para atrair polinizadores em substituição ao néctar. A diversidade de leveduras associadas a flores produtoras de óleo é escassamente investigada, e assim faz-se necessário o desenvolvimento de trabalhos relacionados a essa temática. Além disso, como as flores têm uma vida útil curta, consistem em um microhabitat específico e efêmero, onde as comunidades de leveduras presentes possuem uma intensa dinâmica de colonização-extinção, e quando descobertas, muitas destas leveduras podem representar espécies ainda não descritas.

A diversidade de leveduras presente nas flores parece também estar diretamente relacionada à frequência de visitação por insetos, pois ao visitar as flores em busca de recompensa alimentar, os insetos acabam por disseminar as leveduras de flor em flor. Assim, a diversidade de leveduras associadas a insetos que se alimentam de flores produtoras de néctar tem sido extensivamente investigada nas últimas décadas. Entretanto, não há estudos sobre a diversidade de leveduras associadas a insetos coletores de óleo floral.

Os frutos também são importantes micro-habitats para uma grande quantidade de espécies de leveduras, contudo, ainda pouco se sabe sobre o padrão de diversidade de leveduras associadas aos frutos de *B. crassifolia*. Com relação a diversidade de leveduras associadas a flores e insetos que visitam esta planta, não há estudos consistentes que permitam conhecer o perfil das comunidades que habitam esses substratos. Sendo assim, a realização de estudos sobre diversidade de leveduras associadas ao murici pode revelar o perfil da comunidade de leveduras associadas a esta planta, principalmente com a descrição de novas espécies. Além disso, estudos de diversidade utilizando *B. crassifolia* podem ajudar a esclarecer questões referentes à relação envolvendo leveduras, flores produtoras de óleo e insetos, pois a presença de leveduras associadas a flores e insetos visitantes têm sido frequentemente relacionada às propriedades do néctar como fonte nutricional. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo determinar a diversidade de leveduras associadas a flores e frutos de *B. crassifolia*, além daquelas associadas com os insetos vetores que visitam as flores desta planta.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar a diversidade de leveduras de flores, frutos e insetos associados ao muricizeiro (*Byrsonima crassifolia*, L. Kunth) no município de Araguatins, estado do Tocantins.

3.2 Específicos

- Isolar leveduras de flores, frutos e insetos associados ao muricizeiro (*Byrsonima crassifolia*, L. Kunth) no município de Araguatins;
- Isolar leveduras osmotolerantes como as do gênero *Moniliella*;
- Identificar as espécies de leveduras por meio de testes moleculares;
- Identificar representantes de possíveis novas espécies de leveduras;
- Estimar a diversidade das comunidades de leveduras associadas ao murici na região estudada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de Coleta – Município de Araguatins, Tocantins

O município de Araguatins está localizado no extremo norte do estado do Tocantins, a 621 km da capital Palmas, mais precisamente na microrregião do Bico do Papagaio (Figura 4). Foi fundado em 1868, passando à categoria de município em 1913. Entretanto, somente no ano de 1943 passou a ser chamado de Araguatins, denominação que se originou da junção dos nomes dos dois grandes rios que fazem confluência na região, o Araguaia e o Tocantins. Com a criação do estado do Tocantins em 1989, o município passou a integrá-lo, pois pertencia anteriormente ao estado de Goiás (ARAGUATINS, 2015).

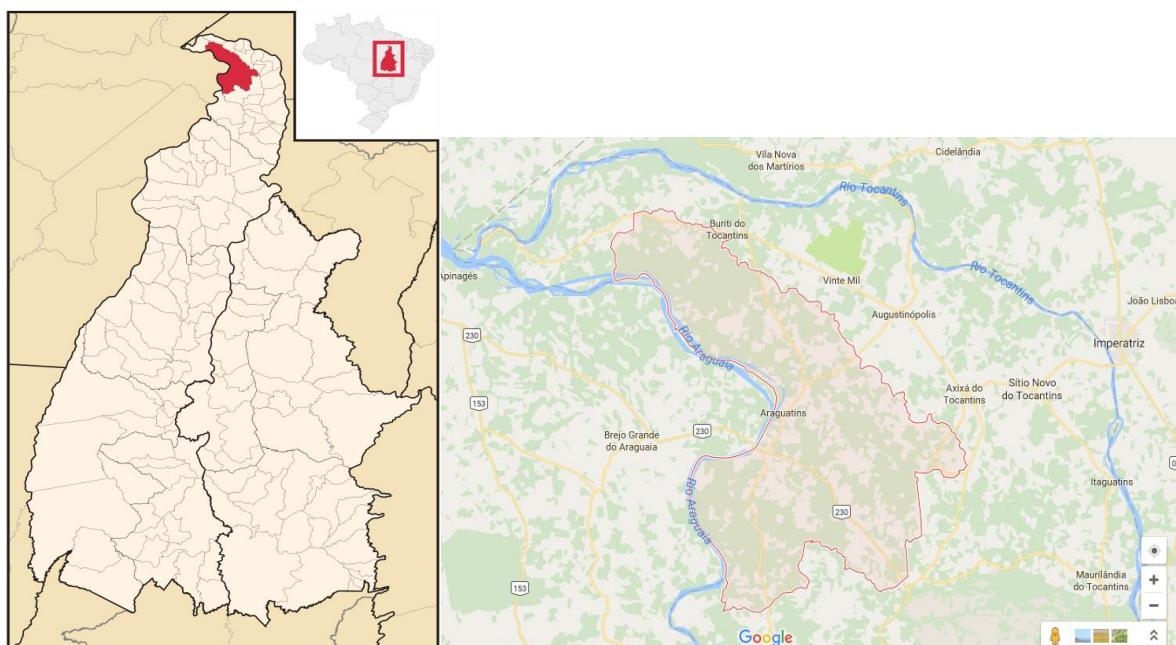


Figura 4 - Mapa mostrando a localização do município de Araguatins, estado do Tocantins. Fonte: Câmara Municipal de Araguatins (2017); Google Maps (2017).

De acordo com dados do IBGE (2014), Araguatins possui uma extensão territorial de 2.625,286 km² e aproximadamente 34.000 habitantes. O município está situado em uma zona de transição entre a Floresta Amazônica e o Cerrado, está a 103 metros de altitude, nas coordenadas de 5° 39' 22" S e 48° 7' 8" W, sendo margeado pelo rio Araguaia e cortado pelo rio Taquari e outros riachos perenes. O clima é quente e úmido, com temperatura média de 28,5°C e precipitação média anual que varia de 1.400 a 1.500 mm (SEPLAN, 2008).

As coletas das flores e insetos foram realizadas nos meses de julho, agosto e setembro de 2015 e as coletas de frutos ocorreram em dezembro de 2015 e janeiro de 2016 (Figura 5).



Figura 5 - Locais de coleta de flores, frutos e insetos associados ao murici no município de Araguatins, Tocantins. A (Área total); B (Área de Coleta 1); C (Área de Coleta 2); D (Área de Coleta 3). Fonte: Google Maps (2017).

4.2 Coleta de amostras

Foram coletadas 150 amostras de flores individuais pertencentes a 50 diferentes árvores; 150 amostras de frutos maduros saudáveis pertencentes a 50 diferentes árvores e 31 insetos associados a flores de murici (*Byrsonima crassifolia*, L. Kunth). Como documento taxonômico, ramos contendo flores foram coletados, identificados e depositados no Herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi (MG) sob o número MG224148. As amostras de flores e frutos foram coletadas com auxílio de pinças desinfetadas em solução de álcool 70% (Figura 6). Em seguida, essas amostras foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados devidamente identificados e transportadas em caixas de isopor contendo gelo. O processamento das amostras ocorreu em laboratório no período máximo de 24 horas após a coleta.



Figura 6 - Coleta de flores e frutos de murici

Os insetos foram capturados de acordo com a disponibilidade no momento das coletas. Não foi possível realizar a coleta em todas as árvores pois algumas não apresentavam insetos visitando suas inflorescências. Além disso, não foi viável coletar ao mesmo tempo as flores e os insetos que as visitaram. Dessa forma, não foi possível comparar as leveduras presentes em flores visitadas e em insetos visitantes, nem relacionar os índices de diversidade referentes às comunidades de leveduras de flores, frutos e insetos pois os números amostrais foram distintos. Os insetos coletados foram conservados em álcool 70% para posterior identificação por Lucas Neves Perillo, doutorando do Programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre - UFMG (Tabela 2).

Tabela 2 - Identificação dos Insetos associados a flores de *B. crassifolia*

INSETOS		
Nº de insetos	Família/tribo	Espécie
20	Apidae - Meliponini	<i>Melipona</i> spp.
1	Halictidae - Augochlorini	<i>Augochlora</i> sp.
3	Vespidae - Epiponini	<i>Parachartergus smithii</i> (Saussure, 1854) <i>Parachartergus fraternus</i> (Gribodo, 1892)
7	Formicidae - Pseudomyrmecini	<i>Pseudomyrmex tenuis</i> (Fabricius, 1804)

4.3 Isolamento das leveduras

O isolamento das leveduras de flores e frutos foi conduzido no Laboratório de Biologia Geral do Instituto Federal do Tocantins (IFTO), *Campus Araguatins*. Para isso, foram utilizados três meios de cultura distintos: YM (1% glicose; 0,3% extrato de levedura; 0,3% extrato de malte; 0,5% peptona e 0,01% cloranfenicol), 50% de glicose (50% glicose; 0,5% extrato de levedura; 0,01% cloranfenicol) e Eritritol+10% NaCl (0,67% YNB; 0,5% Eritritol; 10% NaCl; 0,02% cloranfenicol). A utilização de três meios de culturas teve como objetivo fornecer uma amostragem mais representativa da diversidade de leveduras associadas à planta estudada. Nesse sentido, meios nutricionalmente ricos como YM favorecem a recuperação de uma ampla gama de leveduras; contudo, as diferentes taxas de crescimento da biota original podem levar a uma representação distorcida da composição da comunidade e mascarar o crescimento de leveduras que crescem mais lentamente (LACHANCE, 2011). Assim, com o objetivo de isolar espécies osmotolerantes ou assimiladoras de eritritol que pudessem apresentar um crescimento mais lento, tais como leveduras do gênero *Moniliella*, foram empregados dois meios seletivos, um com 50% de glicose e outro com Eritritol acrescido de 10% de NaCl.

Cada amostra (flor e fruto, isoladamente) foi colocada em tubo plástico tipo Falcon contendo 20 mL do meio específico. Amostras de flores e frutos da mesma planta foram transferidas para os três diferentes meios utilizados e os tubos foram incubados a 25°C por até 10 dias (THANH; HIEN; THOM, 2013). Após este período, os frascos foram homogeneizados e diluições seriadas das amostras foram realizadas adicionando-se 100 µL do meio inicial a 900 µL de água destilada esterilizada. Foram realizadas diluições até 10⁻⁵. Cem microlitros das diluições 10⁻¹, 10⁻³ e 10⁻⁵ foram semeados em placas contendo meio YMA e distribuídos

uniformemente nas placas com auxílio de alça de *Drigalsky* e incubadas por até 10 dias a 25°C (SPERANDIO, 2012). Os diferentes morfotipos foram isolados por meio do estriamento em meio YMA, e as placas foram incubadas por até 5 dias a 25°C. Esse procedimento foi repetido até que fossem obtidas colônias puras.

Para o isolamento de leveduras a partir dos insetos, os 31 exemplares capturados foram colocados para caminhar em placas contendo meio YMA (1% glicose; 0,3% extrato de levedura; 0,3% extrato de malte, 0,5% peptona bacteriológica; 2% ágar e 0,01% de cloranfenicol) por 15 minutos (LACHANCE et al., 2001). Uma vez que não foram coletados 150 insetos da mesma espécie (três por árvore) não houve condições de isolar leveduras a partir dos diferentes meios de cultura. Os diferentes morfotipos que cresceram nas placas foram isolados por meio do estriamento em meio YMA, e as placas foram incubadas por até 5 dias a 25°C. Esse procedimento foi repetido até a obtenção de culturas puras.

4.4 Manutenção das leveduras

Para cada amostra e meio de cultura utilizado, um representante de cada morfotipo foi purificado em meio YMA e preservado para posterior identificação. Para preservação, uma alçada de cada colônia purificada foi inoculada em tubos contendo caldo GYMP (2% glicose; 0,5% extrato de levedura; 1% extrato de malte e 0,2% Na₂PO₄ 0,2%) e incubada a 25°C. Após 24 horas, uma alíquota de 0,8 mL de cada cultura foi transferida para um criotubo plástico de 2,0 mL previamente esterilizado juntamente com 0,2 mL de glicerol esterilizado para preservação das amostras em freezer a -80°C. As leveduras preservadas foram depositadas na Coleção de Microrganismos e Células da UFMG.

4.5 Identificação das leveduras

As leveduras obtidas foram caracterizadas fenotipicamente conforme características morfológicas. Dessa forma, as colônias foram descritas de acordo com a características da morfologia colonial como cor, brilho, forma, borda, superfície, elevação e consistência. Foram observados também caracteres morfológicos celulares: forma e tamanho da célula, presença de pseudomicélio, tipo de reprodução assexuada (brotamento e/ou fissão) e, no caso de brotamento, tipo de brotamento (multipolar, bipolar, unipolar), presença de ascósporos, basidiósporos e de balistosporos (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Este procedimento foi realizado com o objetivo de agrupar as leveduras de acordo com o perfil

morfológico e este agrupamento foi confirmado por biologia molecular por meio de PCR *fingerprinting*.

4.5.1 Extração de DNA

Para extração de DNA foram utilizados três protocolos diferentes. Os isolados com textura cremosa ou butirosa foram cultivados em meio YMA durante 24 a 48 horas a 25°C. Após crescimento satisfatório, uma alçada de cada colônia foi adicionada a 100 µL de tampão de lise (Tris-HCl - Trishidroximetilaminometano 0,05 M; EDTA – ácido etilenodiamino tetraacético 0,005 M; NaCl 0,1 M e SDS – sódio dodecil sulfato 1%). A suspensão formada foi agitada em *vortex* por 1 minuto e incubada em banho-maria a 65°C por um tempo mínimo de 30 minutos. Após este período, foram adicionados 100 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) a cada tubo. As amostras foram homogeneizadas por inversão e então centrifugadas a 13148 xg por 15 minutos. Setenta microlitros do sobrenadante de cada tubo foram transferidos para novos microtubos aos quais foram adicionados 70 µL de isopropanol em temperatura ambiente. As amostras permaneceram em temperatura ambiente por 15 minutos para a precipitação do DNA. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 13148 xg por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado por inversão.

Os isolados com textura mucoide foram cultivados em meio YMA durante 24 a 48 horas a 25°C. Após crescimento satisfatório, uma alçada de cada colônia foi adicionada a 100 µL de tampão de lise. A suspensão formada foi agitada em *vortex* por 1 minuto e incubada em banho-maria a 65°C por um tempo mínimo de 30 minutos. Após este período, foram adicionados 100 µL de fenol:clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) a cada tubo. Os tubos foram vedados com parafilme e as amostras foram homogeneizadas por inversão e então centrifugadas a 13148 xg por 15 minutos. Setenta microlitros do sobrenadante de cada tubo foram transferidos para novos microtubos e então foram adicionados 70 µL de isopropanol em temperatura ambiente. As amostras permaneceram em temperatura ambiente por 15 minutos para a precipitação do DNA. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 13148 xg por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado por inversão.

Os isolados com textura membranosa, ceribriforme, aveludada ou com morfologia semelhante a fungos filamentosos foram submetidos a crescimento em meio YMA por até 5 dias a 25°C. Após crescimento satisfatório, o micélio ou pseudomicélio foi transferido para tubos de 1,5 mL aos quais foram adicionados 400 µL de tampão de lise seguida de incubação a – 20°C por aproximadamente 10 minutos. O conteúdo do tubo foi triturado com auxílio de

esferas de aço (*beads*) por até 5 minutos. Após homogeneização, cada tubo foi colocado por 30 minutos a 65°C em banho seco. Após este período, foram adicionados 570 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) a cada tubo. As amostras foram homogeneizadas por inversão e então centrifugadas a 13148 xg por 15 minutos. Cem microlitros do sobrenadante de cada tubo foram transferidos para novos microtubos aos quais então foram adicionados 100 µL de isopropanol. As amostras permaneceram em temperatura ambiente por 15 minutos para a precipitação do DNA. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 13148 xg por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado por inversão.

Para os três protocolos a lavagem do DNA ocorreu da mesma maneira. Após o descarte do sobrenadante foram acrescentados 200 µL de etanol 70% gelado em cada microtubo, e estes foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 13148 xg por 10 minutos. O sobrenadante de cada tubo foi descartado por inversão e os tubos foram colocados para secar *overnight* à temperatura ambiente. Cada *pellet* foi ressuspensionado em 50 µL de tampão TE (Tris-EDTA 0,1 M, pH 8) e incubado em estufa a 37°C por aproximadamente uma hora. A seguir, o DNA obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) e diluído para atingir a concentração aproximada de 200 ng/µL e estocado a -20°C.

4.5.2 PCR *fingerprinting* com o iniciador (GTG)₅

Os isolados foram agrupados molecularmente de acordo com os perfis de bandamento obtidos após amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com o iniciador (GTG)₅ conforme descrito por Lieckfeldt e colaboradores (1993). Este procedimento foi realizado com o objetivo de confirmar o agrupamento fisiológico das leveduras ascomicéticas e basidiomicéticas. Assim, cada ensaio foi realizado em 25 µL de uma mistura contendo: 1 µL de DNA; 1,5 µL do iniciador (GTG)₅ 10 pmol/µL (Invitrogen), 4 µL de tampão de PCR 10X (Sinapse), 1,5 µL de MgCl₂ 25mM (Sinapse) 1,0 µL de dNTP 10 mM, 0,3 µL de Taq DNA polimerase 5U/ µL (Sinapse) e o volume final completado com água deionizada esterilizada. As amplificações foram realizadas sob as condições de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 33 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 2 minutos e extensão a 74°C por 5 minutos.

Os produtos de amplificação (amplicons) obtidos nos ensaios foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) 1,5% em tampão TBE 0,5X (Tris-base 0,045 M; Ácido bórico 0,045 M; EDTA 0,001 M, pH 8,0) e eluídos durante aproximadamente 2 horas a 80V. Os géis foram corados com o uso de GelRed (Biotium, EUA), visualizados sob

luz ultravioleta e fotografados em um sistema de foto-documentação de gel (Viber Lourmat, França). Leveduras que apresentaram perfis de bandas idênticos foram consideradas como pertencentes a uma mesma espécie.

4.5.3 Amplificação utilizando-se os iniciadores ITS1 e NL4

Dentre os isolados que apresentaram perfis moleculares idênticos, um isolado de cada grupo foi selecionado para o sequenciamento da região dos domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do RNA ribossomal. Os isolados que apresentaram mais de três substituições na sequência gênica dos domínios D1/D2 e que representaram possíveis espécies novas, ou para os quais o sequenciamento dos domínios D1/D2 não foi suficiente para a identificação da espécie foram submetidos ao sequenciamento da região dos espaçadores transcritos internos (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do RNA ribossomal. Assim, a PCR foi realizada utilizando-se os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e NL4 (5'-CGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (WHITE et al., 1990; O'DONNELL, 1993) a fim de se amplificar toda a região de interesse em uma única reação.

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo: 2,0 µL de DNA; 1,0 µL de cada iniciador ITS1 e NL4 10 pmol/µL (Invitrogen); 5,0 µL de tampão de PCR 10X (Sinapse); 2,0 µL de MgCl₂ 25mM (Sinapse); 2,0 µL de dNTP 10 mM; 0,2 µL de Taq DNA polimerase 5U/µL (Sinapse) e o volume final completado com água deionizada esterilizada. As amplificações foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguida por extensão final a 72°C por 10 minutos. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) 1%, em tampão TBE 0,5X, eluídos durante aproximadamente 30 minutos a 120V. Os géis foram corados com GelRed (Biotium, USA), visualizados sob a luz ultravioleta e fotografados em um sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

4.5.4 Amplificação utilizando-se os iniciadores NL1 e NL4

Quando não ocorreu amplificação utilizando-se os iniciadores ITS1 e NL4, a reação foi realizada utilizando-se os iniciadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 afim de se realizar o sequenciamento da região dos domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do RNA ribossomal (O'DONNELL, 1993). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo: 2,0 µL de DNA; 1,0 µL de cada iniciador NL1 e NL4 10

pmol/ μL (Invitrogen); 5,0 μL de tampão de PCR 10X (Sinapse); 2,0 μL de MgCl_2 25mM (Sinapse); 2,0 μL de dNTP 10 mM; 0,2 μL de Taq DNA polimerase 5U/ μL (Sinapse) e o volume final completado com água deionizada esterilizada. As amplificações foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 54°C por 25 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos, seguida por extensão final a 72°C por 10 minutos. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) 1%, em tampão TBE 0,5X, eluídos durante aproximadamente 30 minutos a 120V. Os géis foram corados com GelRed (Biotium, USA), visualizados sob a luz ultravioleta e fotografados em um sistema de fotodocumentação de gel (Vilber Lourmat, França).

4.5.5 Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento

Os amplicons gerados foram purificados por adição de 11,5 μL de EDTA 125 mM e 135 μL de etanol absoluto e deixados à temperatura ambiente por 15 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 13148 xg por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado por inversão. Em seguida, foram adicionados 120 μL de etanol 70% gelado, os tubos foram novamente centrifugados a 13148 xg por 10 minutos e o etanol descartado por inversão. Os tubos foram deixados *overnight* à temperatura ambiente para evaporação do etanol. Foram então adicionados 10 μL de água deionizada esterilizada em todos os tubos e os mesmos foram incubados por 30 minutos a 37°C. O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies). As amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho de sequenciamento automatizado ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou de Belo Horizonte, Minas Gerais.

A reação de sequenciamento foi realizada em microplacas de 96 poços (Applied Biosystems) preparadas para um volume final de 10 μL , nas quais foram colocados: 1 μL do iniciador a (5 pmol/ μL), 1 μL de tampão (presente no kit de sequenciamento), 1 μL de Big Dye, 1 μL de DNA (entre 5 e 20 ng/ μL) e o restante de água deionizada esterilizada para completar o volume. O programa de ciclagem utilizado consistiu de uma desnaturação inicial a 9 °C por 1 minuto e 36 ciclos de: desnaturação a 96 °C por 15 segundos, seguido por 15 segundos de anelamento a 50 °C e 4 minutos de extensão a 60 °C .

Os produtos do sequenciamento foram submetidos ao processo de precipitação com o acréscimo de 1 μL de EDTA a 125 mM, 1 μL de acetato de sódio a 3M e 50 μL de etanol

absoluto (Merck) em cada poço. A placa foi centrifugada em vortex brevemente e então incubada por 15 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 1073 xg a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado por inversão e em cada poço foram acrescentados 100 µL de álcool 70%. A placa foi centrifugada por 15 minutos e após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado por inversão. A placa foi armazenada a 4°C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3130.

4.5.6 Análise computacional das sequências

As sequências de DNA foram submetidas à análise de qualidade utilizando-se o *Phred quality scores*, disponível no site da UNB (<http://www.biomol.unb.br/phph/>). Bases contíguas, com valor de *phred* maior que 20, foram selecionadas e comparadas com as sequências depositadas no GenBank utilizando-se o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool-versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) desenvolvido pelo National Center For Biothecnology. As leveduras cujas sequências dos domínios D1/D2 (26S) diferiram em até três pares de base foram consideradas como pertencentes à mesma espécie (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

As sequências das 20 possíveis novas espécies foram submetidas a análise filogenética. Uma vez obtidas as sequências sugeridas como grupo externo para cada gênero, o alinhamento foi realizado utilizando o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004), sendo que as inconsistências que ocorreram foram corrigidas manualmente. Os modelos de evolução foram calculados separadamente para cada gênero a partir do MrModeltest versão 2.3 (NYLANDER, 2004). Os modelos de evolução indicados foram baseados no critério de máxima verossimilhança (hLRT) e o critério de Informação de Akaike (AIC). Modelos similares foram obtidos pelo critério de informação Bayesiana.

As análises Bayesianas para cada gênero foram realizadas no Mr. Bayes versão 3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK 2003). A partir dos modelos de evolução nucleotídica, foram corridas 2.000.000 gerações nas análises de cada gênero, com quatro cadeias de Markov (duas quentes e duas frias), sendo retida uma árvore a cada 100 gerações. A convergência das corridas foi avaliada pela métrica SSE – *Average Standard Deviation of Split Frequencies* (Stdev < 0,01; o que confere 99% de confiabilidade para as topologias apresentadas). Do total de árvores

geradas, 25% das árvores iniciais foram descartadas utilizando a função *sump* (*burnin*). A estacionariedade das cadeias foi verificada a partir da métrica PSRF – *Potential Scale Reduction Factor* (PSRF \approx 1,000). Todas as corridas de todos os gêneros apresentaram convergência e alcançaram a estacionariedade. Todas as árvores finais foram editadas no FigTree versão 1.4.0 (RAMBAUT, 2012).

4.6 Análises de diversidade

Para análise das comunidades de leveduras associadas a flores, frutos e insetos da região estudada foi realizada a análise das diversidades α e β . A riqueza de espécies estimada consiste na designação das espécies de leveduras encontradas nas plantas coletadas de um determinado ambiente. Contudo, a distribuição destas espécies não é proporcional: algumas são raras, algumas são comuns, mas não numerosas, e outras são muito abundantes. A diversidade α de espécies de uma comunidade depende da riqueza e equitabilidade (distribuição numérica entre as espécies constituintes ou abundância relativa) e se a comunidade apresenta indivíduos mais regularmente distribuídos entre as espécies constituintes esta será mais diversa (GUREVITCH et al., 2009). No presente trabalho, a diversidade α foi estimada por meio do índice de diversidade de Shannon-Wiener. Este é um dos índices de diversidade mais amplamente empregados em ecologia de comunidades e busca medir o grau de incerteza em prever corretamente a qual espécie pertence o próximo indivíduo coletado aleatoriamente em uma amostragem sucessiva (LUDWIG; REYNOLDS, 1988; GORENSTEIN, 2002).

A diversidade β , ou diversidade diferencial, é uma medida de como a variedade (e em alguns casos as abundâncias) de espécies diferem entre comunidades ou amostras ao longo de gradientes. Quanto menos espécies as diferentes comunidades compartilham, mais alta é a diversidade β (WHITTAKER, 1972). Dessa forma, o número resultante indica se há alguma sobreposição nas espécies encontradas em cada grupo, e mensura o quão semelhante ou dissemelhante é a composição de espécies de duas comunidades (BASELGA, 2010). No presente trabalho foi comparada a composição de espécies de leveduras entre os diferentes meios utilizados e entre os substratos (insetos visitantes, flores e frutos) coletados ao longo da área de estudo. Essas análises foram realizadas com objetivo de inferir se há similaridade entre as comunidades de leveduras associadas ao murici. Para isso foi empregado o coeficiente de similaridade de Sørensen (MAGURRAN, 1988).

O esforço amostral foi avaliado utilizando-se curvas de acumulação de espécies construídas no programa Origin Pro 8 (STEVENSON, 2010; GOTELLI; CHAO; LEVIN,

2013). Todas as análises estatísticas de diversidade foram realizadas de acordo com o pacote R “vegan” (OKSANEN et al., 2012).

5. RESULTADOS

5.1 Coleta, isolamento e identificação das leveduras

No presente trabalho foi coletado um total de 331 amostras sendo 150 amostras de flores, 31 insetos visitantes de flores e 150 amostras de frutos de murici (*B. crassifolia*). A partir destas amostras foram isoladas 500 leveduras pertencentes a 93 espécies, sendo 73 espécies já descritas e 20 possíveis novas espécies. Do total de leveduras isoladas, 63,2% possuem afinidade ascomicética e 36,8% afinidade basidiomicética (Tabela 3).

Dentre as amostras de flores foram isoladas 222 leveduras pertencentes a 56 espécies. Deste total, 62,1% possuem afinidade ascomicética e 37,9% afinidade basidiomicética. O fungo leveduriforme *A. pullulans* foi a espécie mais frequente nos três meios de isolamento, sendo isolada em 65 das 150 amostras de flores coletadas (43,3% do total de amostras). A segunda espécie mais frequente em flores foi *Pa. flavescens*, sendo isolada em 20 das 150 amostras (13,3%). *C. apicola* foi isolada em 12 amostras (8%), sendo a terceira espécie mais frequente neste substrato.

As espécies que foram isoladas somente em amostras de flores foram: *Anthracocystis gayana*, *Anthracocystis* sp. nov. 1 (espécie nova próxima filogeneticamente a *Ant. chrysopogonis*), *C. apicola*, *C. cellae*, *C. gorgasii*, *C. michaelii*, *C. sorbosivorans*, *Candida* sp. nov. 2 (próxima a *C. bombi*), *C. vrieseae*, *Ha. pagnoccae*, *Hannaella* sp. nov. 1 (próxima a *H. zae*), *Met. koreensis*, *Moe. antarcticus*, *Mo aphidis*, *Mon. acetoabutens*, *Moniliella* sp. nov. 2 (próxima a *M. megachiliensis*), *Pa. siamense*, *Priceomyces* sp. nov. 1 (próxima a *Pr. fermenticarens*), *Priceomyces* sp. nov. 2 (próxima a *Pr. melissophilus*), *Rhod. nylandii*, *Rhod. ruineniae*, *Rh. toruloides*, *Sp. japonicus*, *Starmerella* sp. nov. 1 (próxima a *St. caucasica*), *Starmerella* sp. nov. 2 (próxima a *St. bombicola*), *Sym. paphiopedili*, *Sympodiomyopsis* sp. nov. 1 (próxima a *Sym. paphiopedili*), *Tr. insectorum*, *Wickerhamiella* sp. nov. 2 (próxima a *W. domercqiae*), *Wi. rabaulensis* e *Yamadazyma* sp. nov. 1 (próxima a *Y. mexicana*).

Tabela 3 - Leveduras isoladas de flores, frutos e insetos associados ao murici (*B.crassifolia*) no município de Araguatins, estado do Tocantins

ESPÉCIE	FILO	FLORES			FRUTOS			INSETOS		TOTAL
		YM	GL	ER	YM	GL	ER	YMA		
<i>Anthracocystis chrysopogonis</i>	B*							4	4	
<i>Anthracocystis</i> sp. (similar a <i>Ant. chrysopogonis</i>)	B	1							1	
<i>Anthracocystis gayana</i>	B	1	1						2	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	A*	19	19	27	2	1		10	78	
<i>Candida aaseri</i> (clado <i>Yamadazyma</i>)	A					1			1	
<i>Candida apicola</i> (clado <i>Starmerella</i>)	A	2	9	1					12	
<i>Candida azyma</i> (clado <i>Wickerhamiella</i>)	A		1					1	2	
<i>Candida carpophila</i> (clado <i>Meyerozyma</i>)	A	2	1	3	3	1	4	1	15	
<i>Candida cellae</i> (clado <i>Starmerella</i>)	A		5						5	
<i>Candida etchellsii</i> (clado <i>Starmerella</i>)	A		2			1	1	1	5	
<i>Candida ethanolica</i> (clado <i>Pichia</i>)	A				1				1	
<i>Candida glabrata</i> (clado <i>Nakaseomyces</i>)	A				2				2	
<i>Candida gorgasii</i> (clado <i>Yamadazyma</i>)	A			1					1	
<i>Candida michaelii</i> (clado <i>Yamadazyma</i>)	A	1							1	
<i>Candida orthopsilosis</i> (clado <i>C. albicans/Lodderomyces</i>)	A	1						1	2	
<i>Candida parapsilosis</i> (clado <i>C. albicans/Lodderomyces</i>)	A			1		1	2		4	
<i>Candida sorbosivorans</i> (clado <i>Starmerella</i>)	A		1						1	
<i>Candida sorboxylosa</i>	A				2				2	
<i>Candida</i> sp. nov. 1 (próxima a <i>C. asparagi</i>)	A				2				2	
<i>Candida</i> sp. nov. 2 (próxima a <i>C. bombi</i>)	A		2						2	
<i>Candida</i> sp. (similar a <i>C. sorboxylosa</i>)	A				1				1	
<i>Candida tropicalis</i> (clado <i>C. albicans/ Lodderomyces</i>)	A				5		6	3	14	
<i>Candida vrieseae</i> (clado <i>Yamadazyma</i>)	A			1					1	
<i>Dirkmeia churashimaensis</i>	A	1					1		2	

Tabela 3 (Continuação):

ESPÉCIE	FILO	FLORES			FRUTOS			INSETOS	TOTAL
		YM	GL	ER	YM	GL	ER	YMA	
<i>Hannaella pagnoccae</i>	A	1							1
<i>Hannaella</i> sp. nov. 1 (próxima a <i>Ha. zaeae</i>)	A	1							1
<i>Hannaella</i> sp. nov. 2 (próxima a <i>Ha. luteola</i>)	A							1	1
<i>Hanseniasspora</i> spp.	A				11		2		13
<i>Hyphopichia burtoni</i>	A	1	1	5			1	1	9
<i>Kockovaella thailandica</i>	B					1		1	2
<i>Kodamaea ohmeri</i>	A							2	2
<i>Lachancea thermotolerans</i>	A					2			2
<i>Martiniozyma asiatica</i>	A				2	1			3
<i>Metschnikowia koreensis</i>	A	2							2
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	A	9	2	1			2	1	15
<i>Meyerozyma</i> spp. (próxima a <i>M. guilliermondii</i>)	A	2				3			5
<i>Millerozyma farinosa</i>	A						1		1
<i>Moesziomyces antarcticus</i>	B	1							1
<i>Moesziomyces aphidis</i>	B	2							2
<i>Moesziomyces</i> sp. (próxima a <i>Moe. aphidis</i>)	B				1		2		3
<i>Moniliella acetoabutens</i>	B	1	2						3
<i>Moniliella fonsecae</i>	B	5	6		1			14	26
<i>Moniliella</i> sp. (similar a <i>Mon. fonsecae</i>)	B	2							2
<i>Moniliella</i> sp. nov.1 (próxima a <i>Mon. dehoogii</i>)	B					1			1
<i>Moniliella</i> sp. nov. 2 (próxima a <i>Mon. megachiliensis</i>)	B	1							1
<i>Moniliella spathulata</i>	B				1	8			9
<i>Papiliotrema flavescens</i>	B	9	3	8	1	1	2	1	25
<i>Papiliotrema laurentii</i>	B	2		4	1	2		4	13
<i>Papiliotrema siamense</i>	B	1							1

Tabela 3 (Continuação):

ESPÉCIE	FILO	FLORES			FRUTOS			INSETOS	TOTAL
		YM	GL	ER	YM	GL	ER	YMA	
<i>Papiliotrema</i> sp. nov.1 (próxima <i>Pa. mangalensis</i>)	B					1			1
<i>Papiliotrema</i> sp. nov.2 (próxima a <i>Pa. siamense</i>)	B	1						1	2
<i>Phragmotaenium deroxii</i>	B					3			3
<i>Phragmotaenium oryzicola</i>	B					2			2
<i>Phragmotaenium</i> sp. nov.1 (próxima a <i>Ph. oryzicola</i>)	B					3			3
<i>Pichia cecembensis</i>	A				1		1		2
<i>Pichia kluyveri</i>	A		1		13				14
<i>Pichia kudriavzevii</i>	A				6		5		11
<i>Pichia manshurica</i>	A				1		4	1	6
<i>Pichia occidentalis</i>	A	1			18		8		27
<i>Priceomyces</i> sp. nov.1 (próxima a <i>Pr. fermenticarens</i>)	A		1						1
<i>Priceomyces</i> sp. nov.2 (próxima a <i>Pr. melissophilus</i>)	A			1					1
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	B	6		1				7	14
<i>Pseudozyma tsukubaensis</i>	B	1						8	9
<i>Rhodosporidiobolus nylandii</i>	B	1							1
<i>Rhodosporidiobolus ruineniae</i>	B	1		1					2
<i>Rhodotorula paludigena</i>	B			2	1		1		4
<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	B			1				1	2
<i>Rhodotorula toruloides</i>	B	1		1					2
<i>Rhynchogastrema complexa</i>	B	1		4				1	6
<i>Saprochaete suaveolens</i>	A				1				1
<i>Schwanniomyces vanrijiae</i>	A							1	1
<i>Sporobolomyces japonicus</i>	B	1							1
<i>Starmerella meliponinorum</i>	A	1	4	1				1	7
<i>Starmerella</i> sp.nov.1 (próxima a <i>St. caucasica</i>)	A	1							1

Tabela 3 (Conclusão):

ESPÉCIE	FILO	FLORES			FRUTOS			INSETOS		TOTAL
		YM	GL	ER	YM	GL	ER	YMA		
<i>Starmerella</i> sp.nov.2 (próxima a <i>St. bombicola</i>)	A	1								1
<i>Sterigmatomyces halophilus</i>	B			1	2	4	10			17
<i>Symmetrospora</i> sp. nov.1 (próxima a <i>Sy. marina</i>)	B					1				1
<i>Sympodiomyces paphiopedili</i>	B	1								1
<i>Sympodiomyces</i> sp. nov.1 (próxima a <i>Sym. paphiopedili</i>)	B			3						3
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	A				1	2				3
<i>Torulaspora pretoriensis</i>	A					5				5
<i>Trichosporon asahii</i>	B	3			1	1		3		8
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	B				1					1
<i>Trichosporon insectorum</i>	B	1								1
<i>Triodiomyces</i> sp. nov.1 (próxima a <i>Tri. triodiae</i>)	B				1					1
<i>Wickerhamiella</i> sp. nov.1 (próxima a <i>W. slavikovae</i>)	A				1					1
<i>Wickerhamiella</i> sp. nov. 2 (próxima a <i>W. domercqiae</i>)	A	1								1
<i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>	A	1								1
<i>Yamadazyma</i> sp. nov. 1 (próxima a <i>Y. mexicana</i>)	A	1								1
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	A					21	1			22
<i>Zygosaccharomyces</i> sp. nov.1 (próxima a <i>Z. bailii</i>)	A						1			1
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	A					1				1
TOTAL		93	61	68	84	68	55	71		500

*Filos: A (Ascomycota) e B (Basidiomycota).

Meios de Isolamento: YM (1% glicose; 0,3% extrato de levedura; 0,3% extrato de malte; 0,5% peptona e 0,01% cloranfenicol), GL (50% glicose; 0,5% extrato de levedura; 0,01% cloranfenicol), ER (0,67% YNB; 0,5% Eritritol; 10% NaCl; 0,02% cloranfenicol) e YMA (2% ágar, 1% glicose; 0,3% extrato de levedura; 0,3% extrato de malte; 0,5% peptona e 0,01% cloranfenicol).

A partir dos insetos pertencentes às famílias Apidae, Formicidae, Halictidae e Vespidae, foram isoladas 71 leveduras identificadas em 23 espécies (Tabela 4). Deste total, 63,3% possuem afinidade basidiomicética e 36,7% possuem afinidade ascomicética. A espécie mais frequente nesse substrato foi *Mon. fonsecae* que foi isolada em 14 das 41 amostras (34,1%). A segunda espécie mais frequente foi *A. pullulans* que ocorreu em 10 amostras (24,4%). As espécies *Ant. chrysopogonis*, *Di. catenulata*, *K. ohmeri*, *Sch. vanrijiae* e *Hannaella* sp. nov. 2 foram isoladas somente a partir dos insetos. Das 71 leveduras isoladas a partir de insetos, 47 foram isoladas a partir de abelhas do gênero *Melipona*, 16 foram isoladas a partir de formigas da espécie *Pseudomyrmex tenuis*, 5 foram isoladas a partir de vespas do gênero *Parachartergus* e 3 foram isoladas a partir de abelhas do gênero *Augochlora*.

Tabela 4 - Leveduras isoladas de insetos associados a flores de murici (*B. crassifolia*).

ESPÉCIE	FILO	INSETO (Nº DE LEVEDURAS ISOLADAS)
<i>Anthracocystis chrysopogonis</i>	B	<i>Melipona</i> spp. (2) e <i>Pseudomyrmex tenuis</i> (2)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	A	<i>Augochlora</i> sp. (1), <i>Melipona</i> spp. (4), <i>Parachartergus</i> spp. (2) e <i>Pseudomyrmex tenuis</i> (3)
<i>Candida azyma</i> (clado <i>Wickerhamiella</i>)	A	<i>Melipona</i> sp. (1)
<i>Candida carpophila</i> (clado <i>Meyerozyma</i>)	A	<i>Melipona</i> sp. (1)
<i>Candida etchellsii</i> (clado <i>Starmerella</i>)	A	<i>Augochlora</i> sp. (1)
<i>Candida orthopsilosis</i> (clado <i>C. albicans</i> / <i>Lodderomyces</i>)	A	<i>Pseudomyrmex tenuis</i> (1)
<i>Candida tropicalis</i> (clado <i>C. albicans</i> / <i>Lodderomyces</i>)	A	<i>Melipona</i> spp. (3)
<i>Diutina catenulata</i>	A	<i>Melipona</i> sp. (1)
<i>Hannaella</i> sp. nov. 2	B	<i>Pseudomyrmex tenuis</i> (1)
<i>Hyphopichia burtoni</i>	A	<i>Melipona</i> sp. (1)
<i>Kockovaella thailandica</i>	B	<i>Pseudomyrmex tenuis</i> (1)
<i>Kodamaea ohmeri</i>	A	<i>Melipona</i> spp. (2)
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	A	<i>Melipona</i> sp. (1)
<i>Moniliella fonsecae</i>	B	<i>Augochlora</i> sp. (1), <i>Melipona</i> spp. (10), <i>Parachartergus</i> sp. (1) e <i>Pseudomyrmex tenuis</i> (2)
<i>Papiliotrema flavescens</i>	B	<i>Melipona</i> sp. (1)
<i>Papiliotrema laurentii</i>	B	<i>Melipona</i> spp. (3) e <i>Pseudomyrmex tenuis</i> (1)
<i>Papiliotrema</i> sp. nov. 2	B	<i>Pseudomyrmex tenuis</i> (1)
<i>Pichia manshurica</i>	A	<i>Parachartergus</i> sp. (1)
	B	<i>Melipona</i> spp. (5) e <i>Pseudomyrmex tenuis</i> (2)
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>		
<i>Pseudozyma tsukubaensis</i>	B	<i>Melipona</i> spp. (8)
<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	B	<i>Melipona</i> sp. (1)
<i>Rhynchogastrema complexa</i>	B	<i>Melipona</i> sp. (1)
<i>Schwanniomyces vanrijiae</i>	A	<i>Melipona</i> sp. (1)
<i>Starmerella meliponinorum</i>	A	<i>Melipona</i> sp. (1)
<i>Trichosporon asahii</i>	B	<i>Parachartergus</i> sp. (1) e <i>Pseudomyrmex tenuis</i> (2)

*Filos: A (Ascomycota) e B (Basidiomycota).

Das amostras de frutos, foram isoladas 207 leveduras pertencentes a 48 espécies. Deste total, 73,4% possuem afinidade ascomicética e 26,5% possuem afinidade basidiomicética. A espécie mais frequente nesse substrato foi *P. occidentalis*, isolada em 26 das 150 amostras (17,3%). A segunda espécie mais frequente foi *Z. bailii*, isolada em 22 amostras (14,6%). Destacaram-se também pela frequência as espécies *Ste. halophilus* (10,6%), *P. kluyveri* (8%), *P. kudriavzevii* (7,3%) e *C. tropicalis* (7,3%).

As espécies que ocorreram apenas nos frutos foram: *C. aaseri*, *C. ethanolica*, *C. glabrata*, *C. sorboxylosa*, *Candida* sp. nov. 1, *Candida* sp. (similar a *C. sorboxylosa*), *Hanseniaspora* spp., *L. thermotolerans*, *Mart. asiatica*, *Mi. farinosa*, *Moesziomyces* sp., *Moniliella* sp. nov. 1, *Mon. spathulata*, *Papiliotrema* sp. nov. 1, *Ph. deroxii*, *Ph. oryzicola*, *Phragmotenium* sp. nov. 1, *Phragmotenium* sp. nov. 2, *P. cecembensis*, *P. kudriavzevii*, *Sa. suaveolens*, *Symmetrospora* sp. nov. 1, *T. delbrueckii*, *T. pretoriensis*, *Tr. coremiiforme*, *Triodiomyces* sp. nov. 1, *Wickerhamiella* sp. nov. 1, *Z. bailii*, *Zygosaccharomyces* sp. nov. 1 e *Z. bisporus*.

Nove espécies foram comuns aos três substratos (341 amostras de flores, frutos e insetos) foram: *A. pullulans* (22,8%), *Mon. fonsecae* (7,6%), *Pa. flavescens* (7,34%), *C. carpophila* (4,4%), *M. guilliermondii* (4,4%), *Pa. laurentii* (3,8%), *Hy. burtoni* (2,6%), *Tr. asahii* (2,3%) e *C. etchellsii* (1,4%) (Figura 8).

As espécies compartilhadas somente entre flores e insetos visitantes foram *C. azyma*, *C. orthopsilosis*, *Moniliella* sp. (similar a *Mon. fonsecae*), *Papiliotrema* sp. nov. 2, *Ps. hubeiensis*, *Ps. tsukubaensis*, *Rh. taiwanensis*, *Rhyn. complexa* e *St. meliponinorum*. As espécies compartilhadas entre flores e frutos foram *C. parapsilosis*, *Dirk. churashimaensis*, *Meyerozyma* spp. (próxima a *M. guilliermondii*), *P. kluyveri*, *P. occidentalis*, *Rh. paludigena* e *Ste. halophilus*. Por fim, as espécies compartilhadas somente entre frutos e insetos visitantes de flores foram *C. tropicalis*, *Ko. thailandica* e *P. manshurica*.

Com o objetivo de isolar espécies osmotolerantes ou assimiladoras de eritritol que pudessem apresentar um crescimento mais lento, tais como leveduras do gênero *Moniliella*, foram empregados dois meios seletivos, um com 50% de glicose e outro com eritritol acrescido de 10% de NaCl. Nas amostras de flores e frutos, quinze espécies foram isoladas somente no meio com 50% de glicose: *C. aaseri*, *C. cellae*; *C. sorbosivorans*; *Candida* sp. nov. 2; *L. thermotolerans*, *Moniliella* sp. nov. 1, *Papiliotrema* sp. nov. 1, *Ph. deroxii*, *Ph. oryzicola*, *Phragmotenium* sp. nov. 1, *Priceomyces* sp. nov. 1, *Symmetrospora* sp. nov. 1, *T.*

pretoriensis e *Z. bisporus*. Sete espécies foram isoladas somente do meio com eritritol + 10% NaCl: *C. gorgasii*, *C. vrieseae*, *Hy. burtoni*, *Mi. farinosa*, *Priceomyces* sp. nov. 2, *Sympodiomyopsis* sp. nov. 1 e *Zygosaccharomyces* sp. nov. 1. Além disso, três espécies foram isoladas em ambos os meios seletivos: *C. etchellsii*, *C. parapsilosis* e *Z. bailii*. Dessa forma, 77 isolados pertencentes a 21 espécies cresceram somente nos meios seletivos.

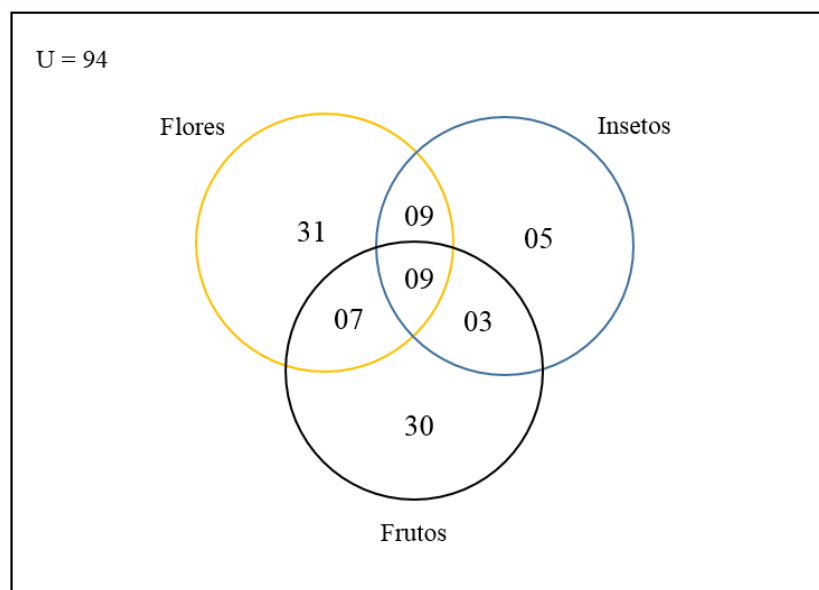


Figura 7 - Sobreposição de espécies de leveduras entre flores, frutos e insetos associados ao murici. Valores representam riqueza de espécies nos substratos. Os números nas interseções correspondem às leveduras que co-ocorreram entre os substratos estudados. U representa o número total de espécies encontradas durante a amostragem na região de estudo.

5.2 Espécies novas de leveduras

As sequências dos domínios D1/D2 (26S) de algumas espécies de leveduras isoladas neste trabalho apresentaram mais de três pares de base de diferença em relação às sequências de leveduras já descritas e depositadas no GenBank, sendo representantes de possíveis novas espécies (Figuras 22-24). No presente trabalho foram isoladas vinte possíveis espécies novas (Tabela 5).

Tabela 5 - Lista das possíveis espécies novas isoladas no presente trabalho e a respectiva espécie filogeneticamente mais próxima.

ESPÉCIE	ESPÉCIE MAIS PRÓXIMA	ACESSO GENBANK D1/D2	IDENTIDADE	GAPS
<i>Candida</i> sp. nov. 1	<i>Candida asparagi</i>	KY106306	527/537(98%)	1/537(0%)
<i>Candida</i> sp. nov. 2	<i>Candida bombi</i>	KY106365	513/545(94%)	14/545(2%)
<i>Hannaella</i> sp. nov. 1	<i>Hannaella zeae</i>	KY107793	569/589(97%)	0/589(0%)
<i>Hannaella</i> sp. nov. 2	<i>Hannaella luteola</i>	AJ555466	572/578(99%)	0/578(0%)
<i>Moniliella</i> sp. nov. 1	<i>Moniliella dehoogii</i>	JQ814874	499/529(94%)	12/529(2%)
<i>Moniliella</i> sp. nov. 2	<i>Moniliella megachiliensis</i>	EF137916	539/551(98%)	1/551(0%)
<i>Papiliotrema</i> sp. nov. 1	<i>Papiliotrema mangalensis</i>	KY107130	533/548(97%)	0/548(0%)
<i>Papiliotrema</i> sp. nov. 2	<i>Papiliotrema siamense</i>	AB909023	546/551(99%)	0/551(0%)
<i>Phragmotaenium</i> sp. nov. 1	<i>Phragmotaenium oryzicola</i>	AB052824	545/562(97%)	0/562(0%)
<i>Priceomyces</i> sp. nov. 1	<i>Priceomyces fermenticarens</i>	KY102085	507/516(98%)	4/516(0%)
<i>Priceomyces</i> sp. nov. 2	<i>Priceomyces melissophilus</i>	KY108946	547/552(99%)	0/552(0%)
<i>Starmerella</i> sp. nov. 1	<i>Starmerella caucasica</i>	KY109783	391/411(95%)	0/411(0%)
<i>Starmerella</i> sp. nov. 2	<i>Starmerella bombicola</i>	NG_042648	512/531(96%)	1/531(0%)
<i>Symmetrospora</i> sp. nov. 1	<i>Symmetrospora marina</i>	AF189944	586/597(98%)	4/597(0%)
<i>Sympodiomyces</i> sp. nov. 1	<i>Sympodiomyces paphiopedili</i>	KY109813	518/525(99%)	0/525(0%)
<i>Triodiomyces</i> sp. nov. 1	<i>Triodiomyces triodiae</i>	AY740126	468/478(98%)	0/478(0%)
<i>Wickerhamiella</i> sp. nov. 1	<i>Wickerhamiella slavikovae</i>	FJ463264	507/519(98%)	0/519(0%)
<i>Wickerhamiella</i> sp. nov. 2	<i>Wickerhamiella</i> cf. <i>domercqiae</i>	AF313368	538/543(99%)	2/543(0%)
<i>Yamadazyma</i> sp. nov. 1	<i>Yamadazyma mexicana</i>	KY110154	504/513(98%)	0/513(0%)
<i>Zygosaccharomyces</i> sp. nov. 1	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	KY110241	535/578(93%)	17/578(2%)

5.3 Análises de diversidade

A diversidade α foi calculada por meio do índice de Shannon-Wiener (H'). A análise dos dados mostrou que os valores calculados para diversidade de leveduras associadas às amostras de frutos não apresentaram diferença estatisticamente significativa. No entanto, entre as leveduras associadas às amostras de flores, a comunidade isolada utilizando-se o meio de cultura YM apresentou um índice de diversidade mais elevado que os índices calculados para as leveduras isoladas utilizando-se o meio com 50% de glicose (GL) e o meio com eritritol + 10% de NaCl (ER). Em relação aos valores calculados para a diversidade de leveduras associadas às amostras de flores e frutos, independente do meio de cultura, a análise dos dados mostrou que não houve diferença estatística significativa entre as leveduras associadas aos dois tipos de amostras. Apesar disso, a diversidade da comunidade de leveduras associadas a frutos foi ligeiramente superior do que aquela encontrada em flores (Tabela 6).

Tabela 6 - Diversidade de Shannon-Wiener (H') e Equitabilidade (E) da comunidade DE leveduras isoladas nas amostras de flores, frutos e insetos associados ao murici, no município de Araguatins, estado do Tocantins.

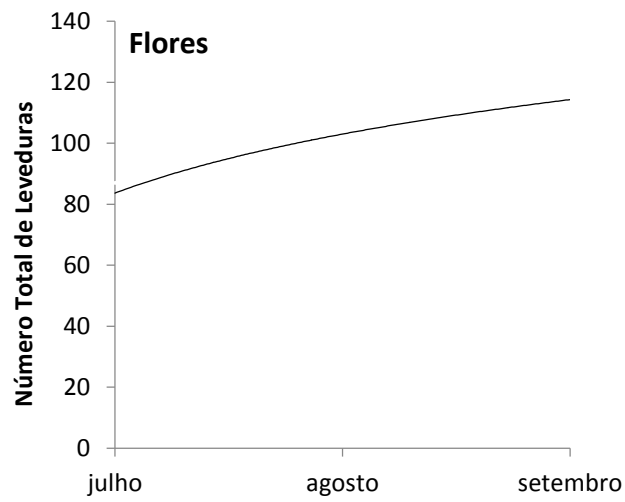
Habitat	Índices	Meio de Isolamento				
		YM	GL	ER	YMA	Total ¹
Flores	H'	1,3653 ^a	1,0448 ^b	0,9847 ^b	-	3,3949
	E	0,8466	0,8323	0,7569	-	
Frutos	H'	1,1893 ^a	1,1281 ^a	1,1492 ^a	-	3,4666
	E	0,8218	0,8173	0,8987	-	
Insetos	H'	-	-	-	1,1981	1,1981
	E	-	-	-	0,8369	

Valores seguidos pela mesma letra minúscula na horizontal não diferem estatisticamente entre si através da sobreposição do intervalo de confiança de 95%. Meios de isolamento: YM (Caldo YM), GL (50% de glicose), ER (Eritritol + 10% NaCl) e YMA (Ágar YM). (1): Índice de diversidade independente do meio de cultura utilizado para o isolamento das leveduras.

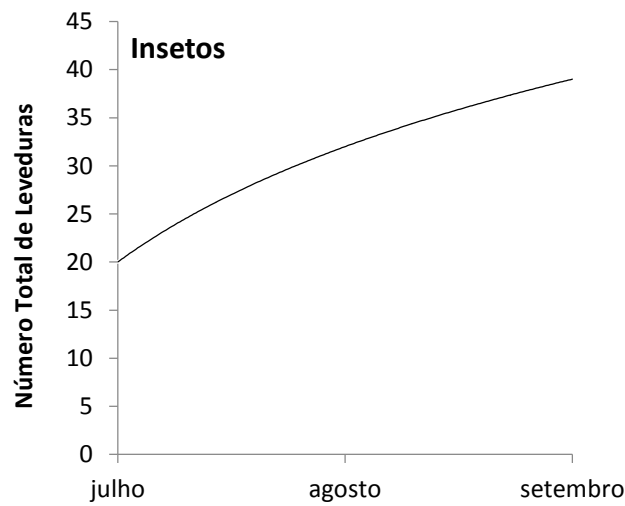
Para verificar se o esforço amostral foi suficiente para representar a real riqueza da comunidade de leveduras associadas a *B. crassifolia* na região estudada foram construídas curvas de acumulação (GOTELLI; CHAO; LEVIN, 2013) (Figura 8). No presente trabalho, as curvas de acumulação das espécies de leveduras não atingiram a estabilidade (i. e. assíntota),

indicando que um maior esforço amostral poderia cobrir a riqueza de espécies esperada. No entanto, a curva de acumulação para amostras de flores mostrou maior tendência a estabilidade em comparação às demais.

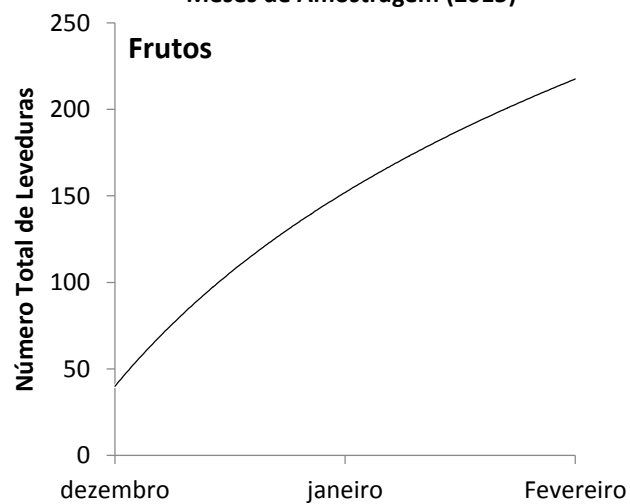
A diversidade β foi calculada por meio do coeficiente de similaridade de Sørensen, sendo que os resultados foram expressos em porcentagem de similaridade entre as comunidades de leveduras presentes nas amostras. A análise dos dados mostrou que a maior similaridade foi entre a composição da comunidade de leveduras de frutos utilizando-se os meios Caldo YM e Eritritol + 10% de NaCl (30,6%) (Tabela 7). O segundo maior percentual de similaridade (29,1%) ocorreu entre as leveduras presentes nas amostras de flores e insetos utilizando-se os meios caldo YM e YMA. As menores taxas de similaridade ocorreram entre as leveduras de flores e frutos, pois ao se comparar as leveduras isoladas em meio com 50% de glicose a similaridade foi de 8,1%, enquanto utilizando-se os meios caldo YM e 50% de glicose, a similaridade foi de 9,7%. Ao comparar a composição de leveduras entre os três substratos estudados independentemente do meio de cultura utilizado para isolamento, a maior taxa de similaridade foi entre as leveduras de flores e insetos (27,1%).



Meses de Amostragem (2015)



Meses de Amostragem (2015)



Meses de Amostragem (2015/2016)

Figura 8 - Curvas de acumulação de espécies de leveduras encontradas em flores, frutos e insetos associados a *B. crassifolia*

Tabela 7 - Quociente de similaridade de Sorensen (SOij) para leveduras isoladas das amostras de flores, frutos e insetos associados ao murici.

		Habitat/Meio de Isolamento							
		Flores			Frutos			Insetos	
		YM	GL	ER	YM	GL	ER	TOTAL¹	YMA
Flores	YM	-	20,84	24,49	11,32	9,74	14,31	-	29,14
	GL	-	-	23,31	12,83	8,12	16,13	-	27,12
	ER	-	-	-	22,91	12,82	24,14	-	27,81
	TOTAL¹	-	-	-	-	-	-	25,3	27,1
Frutos	YM	-	-	-	-	20,93	30,61	-	15,61
	GL	-	-	-	-	-	15,82	-	15,91
	ER	-	-	-	-	-	-	-	18,42
	TOTAL¹	-	-	-	-	-	-	-	18,03
Insetos	YMA	-	-	-	-	-	-	-	-

Meios de Isolamento: YM (Caldo YM), GL (50% de glicose), ER (Eritritol + 10% NaCl) e YMA (Ágar YM).
 (1): Porcentagem de similaridade independente do meio de cultura utilizado para o isolamento das leveduras.

6. DISCUSSÃO

6.1 Isolamento, identificação e diversidade das leveduras

6.1.1 Leveduras de flores e insetos associados

As flores visitadas por polinizadores geralmente contêm densas populações de leveduras, o que as torna juntamente com insetos associados excelentes substratos para o isolamento de leveduras (HERRERA; BAZAGA, 2011; LIEVENS et al., 2014). Contudo, ao analisar a diversidade desses habitats é importante distinguir leveduras que realmente residem nesses substratos daquelas que são transitórias ou fortuitamente encontradas neles. Leveduras que crescem e persistem em um habitat são autóctones, enquanto aquelas que são "acidentais" podem ser consideradas alóctones. As espécies de levedura que são recuperadas repetidamente a partir do mesmo habitat e para as quais o número de isolados permite inferir que as mesmas se reproduzem nesse habitat podem ser consideradas autóctones (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). A predominância de leveduras ascomicéticas sobre basidiomicéticas encontradas em flores sugere que a flor favorece o crescimento de espécies fermentativas, osmofílicas ou osmotolerantes e copiotróficas, características mais comumente atribuídas a este grupo de leveduras. Os resultados encontrados no presente trabalho são similares àqueles encontrados por outros autores em estudos sobre a diversidade de leveduras em flores produtoras de néctar (LACHANCE et al., 2001; BRYSCH-HERZBERG, 2004; LACHANCE, 2006; POZO; HERRERA; BAZAGA, 2011; POZO; LACHANCE; HERRERA, 2012). Entretanto, as flores de *B. crassifolia* não produzem néctar como recompensa floral, o que sugere que o néctar pode ser considerado apenas um dos fatores que favorece a predominância de leveduras ascomicéticas nas flores. Portanto, outros fatores físicos, químicos e nutricionais estariam relacionados com a composição das comunidades de leveduras associadas à flores.

Pozo, Lachance e Herrera (2011) propuseram que espécies de leveduras associadas a recompensas florais e insetos visitantes podem ser diferenciadas de espécies generalistas do filoplano e do ar com base em seus padrões de utilização de fontes de carbono e nitrogênio. No referido trabalho, esta divisão foi atribuída à abundância de espécies de leveduras basidiomicéticas nas superfícies das plantas e à predominância de espécies ascomicéticas em insetos e no néctar. Contudo, no presente trabalho as leveduras basidiomicéticas tiveram uma maior frequência de ocorrência nos insetos. Como as flores de murici não produzem néctar, os insetos que visitam estes substratos podem estar coletando óleos e outros exsudatos liberados

pelas flores. Estes insetos podem visitar também outros substratos, como superfícies foliares, que apresentam maior ocorrência de leveduras basidiomicéticas. Além disso, parte dos insetos coletados são formigas, que têm uma associação maior com leveduras basidiomicéticas do que ascomicéticas (GANTER, 2006). O índice de Sorensen mostrou que as comunidades de leveduras associadas às flores de murici e aos insetos visitantes apresentaram uma similaridade de 27,1%. Isso sugere que os insetos amostrados visitam outros substratos e não apenas as flores de murici. Portanto, é possível que a maioria das leveduras isoladas dos insetos seja alóctone em relação as flores.

Ao considerar somente as leveduras de amostras de flores, a espécie *A. pullulans* foi a mais frequente nos três meios de isolamento, sendo isolada em 43,3% das amostras. Além disso, esta espécie foi isolada em todos os substratos e meios com exceção das amostras de frutos utilizando-se meio com eritritol +10% de NaCl. Este era um resultado já esperado uma vez que esta espécie é considerada ubíqua e generalista, sendo comumente encontrada em diversos habitats como flores, frutos, filoplano, matéria orgânica em decomposição, solo, águas e ar (POZO; HERRERA; BAZAGA, 2011; SPERANDIO; MARTINS DO VALE; MOREIRA, 2015; RUIZ-MOYANO et al., 2016; WEHNER et al., 2017). A segunda espécie mais frequente em flores foi *Pa. flavescens*, isolada em 13,3% das amostras de flores. Essa espécie ocorreu em todos os substratos e meios de isolamento utilizados. *Papiliotrema flavescens* é comumente isolada em várias partes do mundo e em diversos substratos como o ar, solo, água doce, intestino de insetos e grãos de trigo e milho (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). No Brasil, esta espécie já foi isolada na superfície de flores frutos e folhas (MAUTONE, 2008; VALE, 2009; SANTOS, 2015). *Candida apicola* ocorreu em 8% das amostras, sendo isolada somente nas amostras de flores. *Candida apicola* é uma espécie associada a abelhas, mas também já foi obtida a partir de mel, pólen, flores e bebidas fermentadas (ROSA et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005; ARRIZON et al., 2012). *Meyerozyma guilliermondii* ocorreu em 8% das amostras de flores, mas também foi isolada a partir de amostras de frutos e insetos. Esta espécie apresenta importância clínica, mas está amplamente distribuída na natureza, sendo comumente isolada a partir de insetos, flores, frutos e outros produtos alimentícios (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Muitas espécies tiveram poucos isolados e ocorreram somente em amostras de flores: *C. cellae* que ocorreu em cinco amostras, já foi isolada em pólen e néctar em ninhos de abelhas (*Centris tarsata*) na Mata Atlântica do Brasil (PIMENTEL et al., 2005). *Moniliella acetoabutens* que ocorreu em três amostras, é uma espécie frequentemente associada à

deterioração de alimentos com baixo pH como picles e molhos para salada (NAKAYAMA et al., 2016). Contudo, essa espécie nunca havia sido obtida a partir de amostras de ambientes naturais. Os resultados permitem sugerir que as flores de *B. crassifolia* podem ser um habitat para *Mon. acetoabutens*, já que outras espécies deste gênero também ocorreram. Nesse sentido, mais isolados da espécie devem ser coletados para confirmar tal afirmação. *Metschnikowia koreensis*, isolada em duas amostras, é uma espécie comumente associada a flores e também já foi isolada a partir de folhas de cana-de-açúcar coletadas na Tailândia (HONG et al., 2001; LIMTONG et al., 2014; SANTOS, 2015). *Moesziomyces aphidis*, que ocorreu em duas amostras, já foi isolada a partir de água do mar em Portugal, flores coletadas na Coreia, folhas de arroz e cana-de-açúcar coletadas na Tailândia e gramíneas coletadas nos EUA (GADANHO; ALMEIDA; SAMPAIO, 2003; ALLEN et al., 2004; HAN et al., 2015; NASANIT et al., 2015a; 2015b). *Rhodospordiobolus ruineniae*, que ocorreu em duas amostras, tem sido isolada de diversos substratos como filoplano, madeira em decomposição, solo, estrume e ar (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; LIMTONG et al., 2014). Esta espécie também já foi isolada a partir de flores de *Ipomoea* sp. e frutos (*Chiococca alba*, *Gomidesia schaueriana*, *Smilax* sp.) coletados no Brasil (RUIVO, 2005). *Rhodotorula toruloides*, isolada em duas amostras, está associada a ambientes marinhos e também já foi isolada a partir de abelhas (*Melipona quinquefasciata*) (GADANHO, M.; LIBKIND, D.; SAMPAIO, 2006; DANIEL et al., 2013). Embora estas espécies de leveduras tenham ocorrido em baixa frequência nas amostras, com exceção de *Mon. acetoabutens*, todas já foram isoladas de flores e/ou insetos associados. Isso mostra que é possível que essas espécies estivessem nas flores de modo transitório ou podem representar populações com menor frequência associadas às flores de murici. Embora a curva de acumulação de leveduras isoladas em amostras de flores tenha mostrado maior tendência à estabilidade, a mesma não atingiu o platô (Figura 9), o que indica a possibilidade de que a coleta de um número maior de amostras de flores poderia levar ao isolamento de mais espécies.

Outras espécies ocorreram em apenas uma amostra de flor. Entre estas estão: *C. gorgasii* e *C. michaelii*, leveduras relatadas como associadas ao trato digestivo de besouros coletados no Panamá (SUH; NGUYEN; BLACKWELL, 2005). *Candida sorbosivorans* já foi isolada de flores de *Ipomoea* sp., trato digestivo de abelhas e besouros Nitidulidae associados a flores de *Ipomoea* sp. no Brasil e de polpa congelada de diferentes frutas tropicais brasileiras (TRINDADE et al., 2002; SANTOS, 2015). Esta espécie já foi testada para a produção de eritritol, apresentando alta produção deste açúcar alcoólico (SARANA et al., 2015). *Candida vrieseae* já foi isolada a partir de bromélias coletadas no Brasil (LANDELL et al., 2010).

Hannaella pagnoccae já foi isolada de solo, flores e várias partes de plantas (LANDELL et al., 2014). *Moesziomyces antarcticus* foi isolada a partir de diversos habitats em locais muito diferentes, como o solo de um lago antártico, arroz polido do Japão, filoplano de gramíneas nos EUA, filoplano de milho e cana-de-açúcar na Tailândia, frutas tropicais do Brasil e flores da árvore de seda (*Albizia julibrissin*) de Taiwan (TRINDADE et al. 2002; ALLEN et al. 2004; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; NASANIT et al., 2015b; 2016). *Papiliotrema siamense* foi isolada de filoplano de arroz e cana-de-açúcar (SURUSSAWADE et al., 2014). *Rhodospordiobolus nylandii* foi isolada do filoplano de arroz e cana-de-açúcar coletado na Tailândia (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; LIMTONG et al., 2014). *Sporobolomyces japonicus* já foi isolada em um campo petrolífero no Japão e em amostras de água de lago no Brasil (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; BRANDÃO et al., 2017). *Sympodiomyopsis paphiopedili* já foi isolada em néctar de flores de *Paphiopedilum primurinum*, *Merremia aegyptia* e *Piscidia piscipula* (SUGIYAMA et al., 1991; CANTO; HERRERA, 2012). *Trichosporon insectorum* foi isolada do intestino de insetos e queijo artesanal (FUENTEFRÍA et al., 2008). *Wickerhamiella rabaulensis* foi isolada a partir de substratos muito distintos como excremento de caracol, fígado de rato e melancia (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Embora a maioria dessas espécies já tenha sido isoladas a partir de flores e/ou insetos associados, o fato de terem sido isoladas em apenas uma amostra sugere que estas espécies podem ser transitórias em flores de murici.

Embora as flores sejam um habitat ideal para o desenvolvimento de uma rica comunidade de leveduras, poucos trabalhos avaliaram a diversidade de leveduras em flores inteiras, pois a maioria dos estudos envolvendo a diversidade destes microrganismos em flores utilizaram apenas o néctar como substrato de isolamento (HERZBERG; FISCHER; TITZE, 2002; HERRERA et al., 2009; POZO; HERRERA; BAZAGA, 2011; CANTO; HERRERA, 2012; ÁLVAREZ PÉREZ; HERRERA, 2013; BELISLE et al., 2014, MITTELBACH et al., 2015; CANTO; HERRERA; RODRIGUEZ, 2017). Entre os trabalhos que avaliaram a frequência de leveduras em flores inteiras pode-se citar o estudo conduzido por Rosa e colaboradores (1995), que abordaram o perfil da comunidade de leveduras associada a plantas de áreas de restinga no sudeste do Brasil. Neste trabalho foram isoladas 401 leveduras pertencentes a 34 espécies, associadas à 50 amostras de *Ipomoea litoralis*, 41 amostras de *Ipomoea pes-caprae* e 15 amostras de *Cereus pernambucensis*. A espécie mais frequente entre as amostras de flores foi *Moe. antarcticus* (51,8%), seguida de *Pa. laurentii* (45,2%), *Rhodotorula glutinis* (45,2%) e *A. pullulans* (38,6%). Em 2011, Pozo, Lachance e Herrera avaliaram a comunidade de leveduras que habitam flores de duas espécies do sul da Espanha

(*Digitalis obscura* e *Atropa baetica*). Neste trabalho foi relatada uma riqueza de 152 leveduras pertencentes a 29 espécies isoladas a partir de 40 amostras de flores, sendo *A. pullulans* e *Metschnikowia gruessii* as espécies mais frequentes nestes substratos.

Embora seja problemático estabelecer comparações diretas entre os resultados obtidos no presente trabalho e aqueles obtidos pelos autores anteriormente citados em razão dos diferentes tamanhos amostrais, procedimentos de identificação e meios de cultivo utilizados, os resultados obtidos no presente trabalho (222 leveduras pertencentes a 56 espécies isoladas a partir 150 amostras de flores) mostram que as flores de *B. crassifolia* abrigam uma grande riqueza de espécies de leveduras. O número relativamente elevado de espécies em comparação aos números encontrados nos trabalhos citados pode estar relacionado à utilização de três meios de cultura distintos para o isolamento das leveduras (YM, 50% glicose e Eritritol + 10% NaCl) enquanto que nos trabalhos realizados por Rosa e colaboradores (1995) e Pozo, Lachance e Herrera (2011) foi utilizado somente o meio YM. A utilização do meio de enriquecimento aliado a meios seletivos possibilitou o isolamento de uma ampla gama de leveduras, inclusive espécies osmotolerantes que apresentam um crescimento mais lento e que dificilmente seriam isoladas em meio rico, isso pode ter levado a uma amostragem mais representativa da diversidade de leveduras associadas à flores de *B. crassifolia*.

Em relação aos trabalhos que avaliaram a frequência de leveduras associadas a insetos pode-se citar o trabalho realizado por Morais e colaboradores (1995), onde os autores avaliaram o perfil das comunidades de leveduras associadas a frutos amazônicos e drosófilas. Neste trabalho foram isoladas 389 leveduras pertencentes a 17 espécies obtidas a partir 177 amostras de drosófilas. No estudo realizado por Pozo, Lachance e Herrera (2011), que também estudaram a comunidade de leveduras associadas a insetos visitantes de *D. obscura* e *A. baetica*, foi relatada uma riqueza de 59 leveduras pertencentes a 10 espécies isoladas a partir de 33 amostras de abelhas (*Bombus pascuorum*, *B. pratorum*, *B. terrestres*, *Anthidium florentinum* e *Anthophora (Amegilla) quadrifasciata*). Ao comparar os resultados obtidos no presente trabalho (71 leveduras pertencentes a 23 espécies obtidas a partir 31 amostras de insetos) com aqueles obtidos nos estudos citados, é possível sugerir que os insetos associados a flores de *B. crassifolia* abrigam uma rica comunidade de leveduras, sendo que a coleta de mais amostras de insetos poderia evidenciar melhor a diversidade de leveduras neste substrato.

Dentre as amostras de insetos, a espécie de levedura mais frequente foi *Mon. fonsecae*, sendo isolada em 14 amostras, o que corresponde a 34,1% do total de amostras de insetos. Neste trabalho, esta espécie foi isolada a partir de abelhas (*Augochlora* sp. e *Melipona* spp.), vespas (*Parachartergus* spp.) e formigas (*Pseudomyrmex tenuis*). Além disso, *Mon. fonsecae* foi

isolada também a partir das amostras de flores (11 isolados). Estes resultados mostram que flores de murici e insetos associados podem ser considerados como um habitat natural para *Mon. fonsecae*, pois a espécie foi descrita a partir de isolados de flores de *Byrsonima orbignyana* e *Angelonia pilosella*, sendo que as duas espécies também produzem óleo floral (ROSA et al, 2009). A segunda espécie mais frequente foi *A. pullulans* que ocorreu em 24 indivíduos, correspondendo a 4% das amostras de insetos. Esta espécie é cosmopolita, sendo encontrada associada a diversos substratos e regiões.

Algumas espécies foram isoladas apenas a partir das amostras de insetos: *Ant. chrysopogonis* ocorreu em duas amostras de abelhas (*Melipona* spp.) e três amostras de formigas (*Pseudomyrmex tenuis*). Embora essa espécie tenha ocorrido em 9,7% das amostras de insetos, esta frequência sugere que outro substrato possa ser o habitat natural desta levedura. Até o momento, esta espécie havia sido isolada apenas a partir do filoplano de *Chrysopogon fulvus* coletada na Alemanha (STOLL; BEGEROW; OBERWINKLER, 2005). *Kodamaea ohmeri*, que ocorreu em duas amostras de abelhas meliponídeas, é uma espécie comumente isolada a partir de flores e insetos associados, além de alimentos. (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). *Diutina catenulata*, que ocorreu em apenas uma amostra de abelha meliponídea, é frequentemente obtida a partir de amostras clínicas humanas e alimentos como queijo (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011, GKATZIONIS et al., 2014). *Schwanniomyces vanrijiae* ocorreu em apenas uma amostra de abelha meliponídea. Essa espécie tem sido isolada de amostras de solo, exsudatos de árvores, drosófilas, formigas e excrementos de insetos (MORAIS et al., 1992; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; MAKSIMOVA et al., 2016).

6.1.2 Leveduras de frutos

Os frutos também são importantes habitats para uma grande variedade de espécies de leveduras (STARMER, LACHANCE, 2011). No total, 207 leveduras pertencentes a 48 espécies foram isoladas a partir das amostras de frutos, das quais 73,4% possuem afinidade ascomicética e 26,5% possuem afinidade basidiomicética. Este resultado já era esperado pois as espécies que primeiramente colonizam os frutos maduros são caracterizadas pelo rápido crescimento e baixo perfil de assimilação de compostos de carbono, geralmente leveduras fermentadoras e pertencentes principalmente ao filo Ascomycota (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Embora os valores calculados para a diversidade de leveduras associadas às amostras de flores e frutos não diferiram significativamente (H' 3,3949 e 3,4666 respectivamente), as menores taxas de similaridade de espécies ocorreram entre as leveduras desses dois substratos. Ao comparar as leveduras isoladas a partir de flores utilizando-se o meio YM e leveduras isoladas a partir de frutos utilizando-se meio com 50% de glicose, a similaridade foi de 9,7%. Comparando-se as leveduras isoladas a partir de flores e frutos utilizando-se o mesmo meio (50% de glicose) a similaridade foi de 8,1%. Assim, embora flores e frutos tenham se mostrado micro-habitas com grande riqueza de espécies de leveduras, essas comunidades compartilham poucas espécies (sete espécies). Isso é explicado pelas alterações fisiológicas e bioquímicas que a flor sofre ao se transformar em fruto, o que acaba influenciando a comunidade de leveduras presentes e faz com que nem sempre as populações encontradas nas flores sejam as mesmas que as encontradas nos frutos (RUIVO, 2005).

A espécie mais frequente nos frutos foi *P. occidentalis*, sendo isolada em 17,3% das amostras. Essa espécie é frequentemente associada a frutas e alimentos fermentados como o vinho (MORAIS et al., 1995a; HIERRO et al., 2006; BEZERRA-BUSSOLI et al., 2013). A segunda espécie mais frequente foi *Z. bailii*, sendo que esta espécie foi isolada somente a partir de amostras de frutos e ocorreu em 22 amostras (14,6% do total). *Zygosaccharomyces bailii* é uma espécie amplamente distribuída no mundo e está frequentemente associada à deterioração de alimentos e bebidas, particularmente produtos acidificados e que contenham altas concentrações de açúcares fermentáveis. As fontes das quais *Z. bailii* já foi isolada incluem o mel, suco de frutas, mosto de uva, vinho, licor, refrigerantes, vinagre, molho de salada e maionese (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; SUH et al., 2013; WU; CHEN; XU, 2013; RAMÍREZ-CASTRILLÓN; MENDES; VALENTE, 2017). *Sterigmatomyces halophilus* também teve uma alta frequência de isolamento, ocorrendo em 10,6% das amostras. A maioria das linhagens de *S. halophilus* já observadas foi isolada de ambientes marinhos, contudo a espécie não é endêmica deste ambiente, pois já foi isolada em uma amostra clínica no Brasil, em amostra de solo no Sri Lanka e em um prédio histórico na Polônia (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; ADAMIAK et al., 2016). A frequência de isolamento de *S. halophilus* no presente trabalho permite sugerir que frutos de murici podem representar um habitat natural para esta espécie. *Pichia kluyveri* foi isolada em 8% das amostras. Essa espécie é amplamente distribuída na natureza e é comumente isolada de frutas frescas e em decomposição (MORAIS et al., 1995a; ABRANCHES et al., 1997; 2000; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Esta espécie também está relacionada a processos fermentativos de alimentos e bebidas (OSORIO-CADAVID et al., 2008; N'GUESSAN et al., 2011; BEZERRA-BUSSOLI et al.,

2013). *Candida tropicalis* foi isolada em 7,3% das amostras. Essa espécie possui grande importância médica, pois é uma levedura frequentemente isolada em amostras clínicas (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). *Candida tropicalis* também já foi isolada de frutas, sucos de frutas, água de coco, madeira em decomposição e bebidas fermentadas (LAS HERAS-VAZQUEZ et al., 2003; MUGULA et al., 2003; CADETE et al., 2012; MACIEL et al., 2013; WANG et al., 2015; FERNÁNDEZ MAURA et al., 2016). *Pichia kudriavzevii* foi isolada somente em amostras de frutos e ocorreu em 7,3% das amostras. Esta levedura também apresenta importância médica, mas está amplamente distribuída na natureza, ocorrendo comumente em solo, frutas e fermentações espontâneas (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; DANDI; DANDI; CHAUDHARI, 2013; de PONZZES-GOMES et al., 2014; APONTE; BLAIOTTA, 2016; DEL MÓNACO; RODRÍGUEZ; LOPES, 2016; QIN et al., 2016). A alta ocorrência dessas espécies nas amostras indica que estas leveduras conseguem utilizar os frutos de murici como substrato para o crescimento.

Algumas espécies foram isoladas apenas a partir das amostras de frutos. Leveduras do gênero *Hanseniaspora* foram isoladas em 13 amostras (8,6% das amostras). Contudo, não foi possível identificar estas leveduras a nível de espécie utilizando-se apenas o sequenciamento das regiões ITS e dos domínios D1 / D2 dos genes do RNA ribossomal. Entre as espécies de *Hanseniaspora* as taxas de substituição de nucleotídeos nessas regiões são mais baixas que entre a maioria das espécies de leveduras. Assim, é necessária uma abordagem polifásica para a correta identificação de espécies desse gênero (CADEZ et al., 2014). Dessa forma, foram realizadas várias tentativas de sequenciamento dos genes que codificam a proteína actina e o fator alongação α , mas não houve sucesso por problemas na PCR e no sequenciamento. As espécies de *Hanseniaspora* são comumente associadas a frutos, flores, mostos de fermentação e drosófilas (ABRANCHES et al. 2000, TRINDADE et al. 2002; MORAIS et al. 1992, 1995a, KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). *Moniliella spathulata* que foi isolada em nove amostras, até o momento só havia sido relatada como associada à leite de búfala coletado na Índia (DE HOOG; GUÉHO, 1984). *Torulaspota pretoriensis*, isolada em cinco amostras, já foi obtida a partir de flores de *Tabebuia* sp., solo, fermentações espontâneas de cacau, água e sedimentos lacustres (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; SILVA-BEDOYA; RAMÍREZ-CASTRILLÓN; OSORIO-CADAVID, 2014; SANTOS, 2015). *Martiniozyma asiatica*, encontrada em três amostras, já foi anteriormente isolada de mirtilos (LUCION, 2015). *Torulaspota delbrueckii*, obtida em três amostras, está amplamente distribuída na natureza e já foi isolada do solo, fermentado de uvas, sumos de frutas e outras partes de plantas (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). *Candida glabrata* foi recuperada em duas

amostras. Esta espécie apresenta importância clínica, mas também já foi isolada de fermentações espontâneas, grãos de café e intestino de insetos neurópteros (NGUYEN; SUH; BLACKWELL, 2007; HELLSTRÖM et al., 2010; PEREIRA et al., 2014). *Candida sorboxylosa* foi obtida em duas amostras. Essa espécie já foi isolada de cacau fermentado, abacaxi, frutos de *Parahancornia amapa* e água marinha (MORAIS et al., 1995a; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). *Lachancea thermotolerans* que foi isolada em duas amostras, é frequentemente associada a alimentos fermentados, frutos, filoplano, drosófilas e outros insetos que se alimentam de plantas (SENSES-ERGUL et al. 2006; NGUYEN; SUH; BLACKWELL, 2007; APONTE; BLAIOTTA, 2016). *Phragmotaelium derxii* e *Ph. oryzicola*, ambas encontradas em duas amostras, foram obtidas anteriormente somente a partir de filoplano de arroz coletado na Tailândia (TAKASHIMA; NAKASE, 2001). Apenas *Mon. spathulata*, *Ph. derxii* e *Ph. oryzicola* parecem não ter uma associação direta a frutos, já que não há relatos de isolamento nestes substratos. Contudo, a obtenção de nove isolados de *Mon. spathulata* em amostras de frutos de *B. crassifolia* permite sugerir que os frutos de murici são um habitat natural para essa espécie, para confirmar isso há a necessidade da realização de mais coletas.

As espécies que ocorreram apenas em uma amostra de fruto no presente trabalho foram: *C. aaseri*, *C. ethanolica*, *Mi. farinosa*, *P. cecembensis*, *Sa. suaveolens*, *Tr. coremiiforme* e *Z. bisporus*. *Candida. aaseri* já foi isolada em azeitonas em conserva, manteiga e também em amostras clínicas de humanos e aves (GRÜNDER et al., 2005; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; LEVENTDURUR et al., 2016); *Candida. ethanolica* já foi isolada em vinagre, silagem de milho e fermentações espontâneas (LACERDA et al., 2005; VERDUGO VALDEZ et al., 2011; RAMOS et al., 2015; KANPIENGJAI et al., 2016; ŠTORNİK; SKOK; TRČEK, 2016; CARVALHO et al., 2016); *Millerozyma farinosa* é uma espécie amplamente distribuída no mundo, com isolados obtidos em diversos substratos como produtos agrícolas, alimentos, esterco de animais, petróleo e infecções humanas (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011); *Pichia cecembensis* já foi isolada em mamão apodrecido, uvas e mosto de uvas (BHADRA et al., 2007; DRUMONDE-NEVES et al., 2016; RAYMOND EDER et al., 2017); *Saprochaete suaveolens* parece ocorrer em diferentes regiões e é encontrada regularmente em substratos líquidos ricos em nutrientes, particularmente em águas residuais (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011); *Trichosporon coremiiforme* é frequentemente associada a amostras de solo e infecções em humanos, sendo também isolada em fermentações espontâneas de bebidas regionais (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; WANG; LIU, 2013); e *Z. bisporus* está associada a alimentos processados (KURTZMAN; FELL;

BOEKHOUT, 2011). Todas essas espécies já foram recuperadas de substratos bastante diversos e apenas *P. cecembensis* parece ter uma associação mais próxima a frutos maduros. Dessa forma, a baixa frequência de isolamento permite inferir que estas espécies são alóctones em relação aos frutos de murici. Contudo, uma vez que a curva de acumulação de frutos não estabilizou (Figura 8), seriam necessárias mais coletas de frutos para confirmar este resultado.

Em relação ao número de espécies isoladas a partir dos frutos de murici, resultados semelhantes foram observados no trabalho realizado por Moraes e colaboradores (1995), onde os autores estudaram a comunidade de leveduras associadas aos frutos amazônicos *Parahancornia amapa*, *Anacardium giganteum*, *Clusia grandiflora*, *Helycostis* sp. e *Platonia insignis*. Neste trabalho foram isoladas 653 leveduras pertencentes a 42 espécies obtidas a partir 166 amostras de frutos. A espécie mais frequente entre as amostras de frutos foi *Hanseniaspora uvarum*, sendo isolada em 77,1% das amostras e outras espécies do clado *Hanseniaspora* foram isoladas em 37,3% das amostras. Embora o número de espécies isoladas a partir de frutos amazônicos tenha sido semelhante ao número de espécies isoladas a partir dos frutos de murici, a composição da comunidade de leveduras se mostrou muito diferente, pois no presente trabalho a espécie mais frequente nos frutos foi *P. occidentalis*, seguida de *Z. bailii*. A diferença na composição das comunidades de leveduras apresentadas nos dois trabalhos pode ser explicada pelos diferentes estágios de maturação dos frutos. No trabalho de Moraes e colaboradores (1995), os frutos maduros foram coletados no solo após naturalmente terem se desprendido das árvores e possivelmente já se encontravam no início do processo de deterioração, enquanto que no presente trabalho os frutos maduros foram coletados ainda nas árvores. De acordo com Brito da Cunha, El-Tabey Shehata e Oliveira (1957), as leveduras apiculadas como aquelas do gênero *Hanseniaspora* pertencem aos primeiros colonizadores de frutos em decomposição porque podem crescer rapidamente, e essa vantagem ecológica lhes permite predominar sobre a microbiota da superfície da fruta. Isso também pode ser observado analisando os resultados de Abranches e colaboradores (2000). Neste trabalho frutos de goiaba (*Psidium guajava*) também foram coletados no solo após naturalmente terem caído da árvore e a partir destes foram isoladas 133 leveduras pertencentes a 29 espécies obtidas a partir 50 amostras, sendo que entre as amostras houve um predomínio de espécies do gênero *Hanseniaspora* (92%), seguido de *P. membranifaciens* (26%) e *P. kluyveri* (24%).

A comunidade de leveduras passa por processos de sucessão ecológica ao longo do processo de amadurecimento e deterioração dos frutos, havendo uma grande variação na diversidade de espécies nestes substratos ao longo do tempo (Moraes et al, 1995). Dessa forma, ao comparar os resultados obtidos no presente trabalho com estudos anteriores pode-se inferir

que embora a utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento tenha demonstrado que os frutos de murici abrigam uma grande riqueza de espécies de leveduras, mais coletas devem ser realizadas afim de cobrir os vários estágios de sucessão afim de avaliar a verdadeira extensão da diversidade nesse microhabitat.

As espécies comuns aos três substratos estudados, em sua maioria, são amplamente distribuídas pela natureza e/ou tem uma associação íntima com várias espécies de plantas e insetos que se alimentam de plantas (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Estas espécies incluem *A. pullulans*, *C. carpophila*, *C. etchellsii*, *Hy. burtoni*, *Pa. flavescens*, *Pa. laurentii*, *M. guilliermondii* e *Tr. asahii*. Além disso, *Mon. fonsecae* foi isolada em 14 amostras de insetos, 11 amostras de flores e 1 amostra de fruto. Estes resultados confirmam que o murici e os insetos que visitam esta planta, podem ser considerados como um habitat natural para *Mon. fonsecae* (ROSA et al, 2009).

6.1.3 Emprego de meios seletivos no isolamento de leveduras

Com o objetivo de isolar leveduras osmotolerantes que pudessem ter crescimento lento e que dificilmente seriam isoladas em meio rico (YM), a abordagem de isolamento utilizando meios seletivos foi válida. Nas amostras de flores e frutos cresceram 77 isolados apenas nos meios seletivos, sendo que deste total, oito isolados podem ser representantes de novas espécies de leveduras. Os meios seletivos com 50% de glicose e com eritritol + 10% de NaCl também foram empregados a fim de se obter o isolamento de espécies osmotolerantes e assimiladoras de eritritol, como aquelas do gênero *Moniliella*. O eritritol é um açúcar alcoólico de difícil assimilação para a maioria das leveduras, mas assimilado por espécies do gênero *Moniliella* (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Assim, a utilização do meio seletivo com eritritol na composição poderia levar ao isolamento de leveduras desse gênero (THANH; HIEN; THOM, 2013). Contudo, a utilização do meio com eritritol+10% de NaCl não permitiu o isolamento de leveduras do gênero *Moniliella*. Apesar disso, dentre as seis espécies do gênero *Moniliella* isoladas neste trabalho, apenas *Moniliella* sp. nov. 2 e *Moniliella* sp. (similar a *Mon. fonsecae*), ambas com apenas um isolado, não cresceram no meio de 50% de glicose. Assim, dos 42 isolados pertencentes ao gênero *Moniliella*, 17 (40,4%) foram obtidos a partir do meio com 50% de glicose o que confirma o perfil osmotolerante das leveduras desse gênero.

A necessidade do isolamento e descrição de novas espécies de *Moniliella* é justificada pelo fato do posicionamento filogenético desse clado não ser ainda bem definido. As espécies apresentam grande divergência nas sequências dos domínios D1/D2 e ITS, com cerca de 50 a

100 bases diferentes entre as espécies filogeneticamente mais próximas (ROSA et al., 2009). Apenas doze espécies foram descritas até o momento, com algumas apresentando diferenças marcantes tanto na morfologia quanto nas características genéticas e bioquímicas (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; THANH; HIEN; THOM, 2013). Isso sugere que o gênero *Moniliella* possa, na verdade, representar diferentes gêneros, sendo necessária a descoberta de novas espécies a fim de se preencher estas lacunas. A maioria das espécies de *Moniliella* é encontrada em ambientes industriais, colonizando produtos alimentícios não processados de origem animal, gorduras, óleos e ácidos. Os nichos naturais são geralmente ambientes osmóticos, como mel e flores (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Neste trabalho, dos 42 isolados pertencentes ao gênero *Moniliella*, 31 (73,8%) foram isolados de flores e insetos associados a flores. Isso pode estar relacionado ao fato de que as flores de *B. crassifolia* fornecem óleo como recompensa floral, favorecendo a permanência de espécies que tem preferência por habitats oleaginosos. Assim, o murici pode ser considerado um habitat natural de *Mon. fonsecae*, pois foi a espécie mais frequente entre as amostras de insetos, sendo isolada também a partir de flores e frutos. Além disso, *Mon. acetoabutens* que não havia sido obtida anteriormente a partir de amostras de ambientes naturais foi isolada em três amostras de flores de murici. Um isolado de *Moniliella* sp. nov. 2 também foi obtido a partir de flores. *Moniliella spathulata* (anteriormente isolada somente a partir de leite de búfala) e *Moniliella* sp. nov.1 foram isoladas apenas de frutos de murici. Esses dados sugerem que pode haver uma associação próxima entre leveduras do gênero *Moniliella* e espécies do gênero *Byrsonima* - Malpighiaceae.

6.2 Espécies novas de leveduras

Candida sp. nov. 1

Candida sp. nov. 1 possui dois isolados obtidos de flores de murici. As sequências dos domínios D1/D2 do gene do RNA ribossomal desses isolados são idênticas à sequência dos domínios D1/D2 de *Candida* sp. (MB2 26S) (Figura 9), isolada a partir de saliva de colibri coletada na Costa Rica, que ainda não tem uma descrição formal, mas possui a sequência depositada no Genbank (acesso KF830183). A espécie descrita mais próxima filogeneticamente é *C. asparagi* (CBS 9770). No entanto, os isolados de murici possuem 10 substituições de nucleotídeos e um gap na sequência dos domínios D1/D2 (acesso GenBank KY106306) e 24

substituições e sete gaps na sequência da região ITS (acesso GenBank KY101945) em relação a esta espécie.

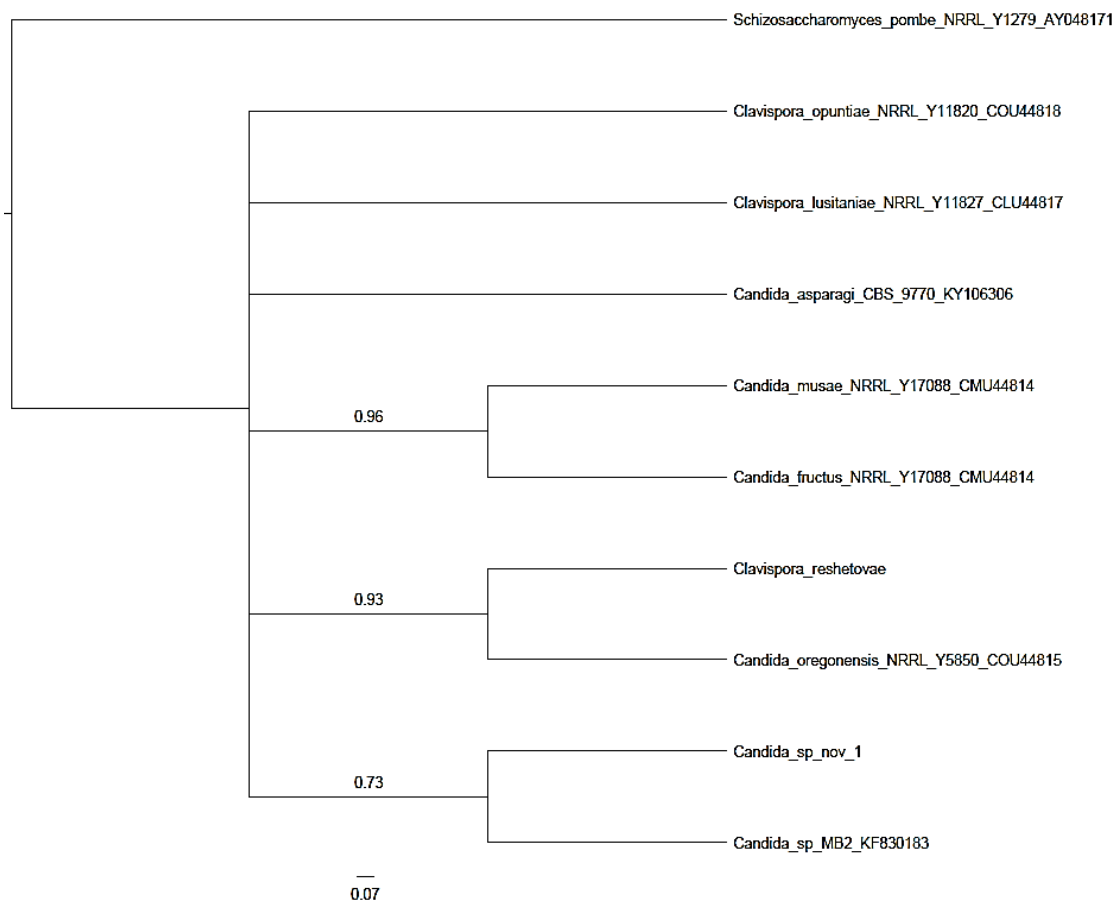


Figura 9 - Árvore consenso da espécie *Candida* sp. nov. 1 construída com análise de maioria Bayesiana utilizando sequências da região D1/D2 do gene do RNA ribossomal. Esta árvore é derivada de 15000 árvores retidas. O grupo externo corresponde a espécie *Schizosaccharomyces pombe*. Os números nos ramos representam a probabilidade posterior (PP). O limite do suporte bayesiano da PP é definido para valores $\geq 0,95$. A barra indica o número de passos mutacionais. As sequências de referência aparecem com o código de depósito do *GenBank database*.

***Candida* sp. nov. 2**

Candida sp. nov. 2 possui dois isolados obtidos a partir de flores. Essa espécie apresentou 32 substituições de nucleotídeos e 14 gaps na região dos domínios D1/D2 em relação à sequência de *C. bombi* (CBS 9017, acesso GenBank KY106365) (Figura 15) e 21 substituições e seis gaps na região ITS em relação à sequência de *C. apicola* (CBS 2868, acesso GenBank KY101940). Pelas diferenças observadas, estes dois isolados representam uma nova espécie de *Starmerella*, já que estas espécies de *Candida* pertencem a este clado.

Hannaella sp. nov. 1

Hannaella sp. nov. 1 possui um isolado obtido a partir de flor de murici. A sequência dos domínios D1/D2 é idêntica à espécie *Hannaella* sp. (DMKU-Y44) isolada a partir de uma amostra de solo coletada na Tailândia (acesso Genbank LC126006) que não tem ainda uma descrição formal publicada. A espécie mais próxima filogeneticamente é *Ha. zae* (CBS 10801, acesso GenBank KY107793) (Figura 10), possuindo 30 substituições na sequência dos domínios D1/D2. Em relação à sequência da região ITS a espécie mais próxima é *Ha. pagnoccae* (CBS 11142, acesso GenBank KY103507), possuindo 30 substituições e 10 gaps em relação a esta levedura.

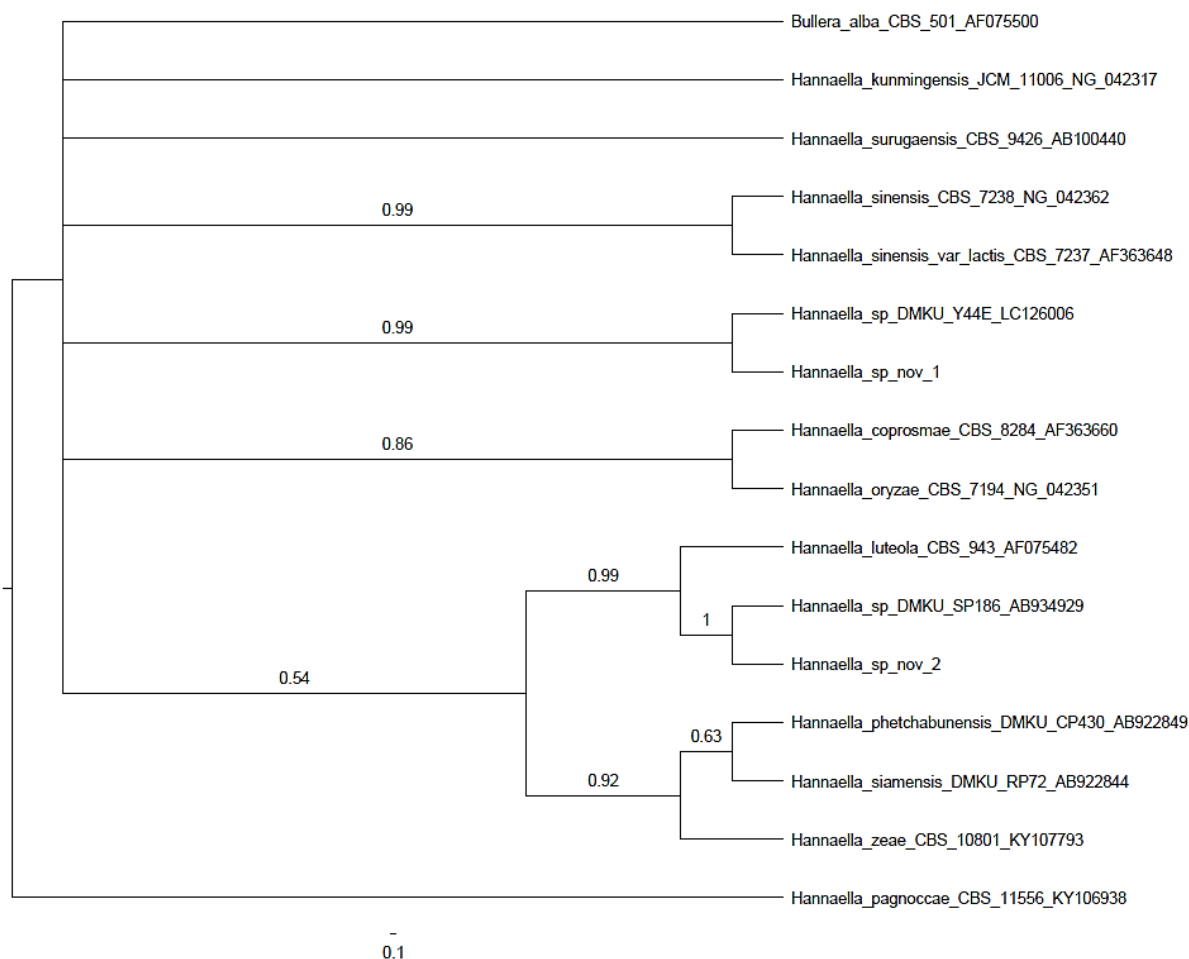


Figura 10 - Árvore consenso das espécies *Hannaella* sp. nov. 1 e *Hannaella* sp. nov. 2 construída com análise de maioria Bayesiana utilizando sequências da região D1/D2 do gene do RNA ribossomal. Esta árvore é derivada de 15000 árvores retidas. O grupo externo corresponde a espécie *Bullera alba*. Os números nos ramos representam a probabilidade posterior (PP). O limite do suporte bayesiano da PP é definido para valores $\geq 0,95$. A barra indica o número de passos mutacionais. As sequências de referência aparecem com o código de depósito do *GenBank database*.

***Hannaella* sp. nov. 2**

Hannaella sp. nov. 2 possui um isolado obtido a partir de formiga (*Pseudomyrmex tenuis*). Essa espécie possui sequência dos domínios D1/D2 idêntica a *Hannaella* sp. (DMKU-SP186) obtida a partir do filoplano de cana-de-açúcar coletada na Tailândia (acesso GenBank AB934929). A espécie mais próxima é *Ha. luteola* (Figura 10), possuindo seis substituições na sequência dos domínios D1/D2 (CBS 943, acesso GenBank AJ555466) e oito substituições na sequência da região ITS (CBS 10491, acesso GenBank KY107780).

***Moniliella* sp. nov.1**

Moniliella sp. nov.1 possui um isolado obtido de fruto de murici. A espécie mais próxima é *Mon. dehoogii* (KFP 211, acesso GenBank JQ814874) (Figura 11), possuindo 30 substituições e 12 gap na sequência dos domínios D1/D2 em relação a esta espécie.

***Moniliella* sp. nov. 2**

Moniliella sp. nov. 2 possui um isolado obtido a partir de flor. Essa espécie é próxima de *Mon. megachiliensis* (CBS190.92, acesso GenBank EF137916) (Figura 11) apresentando 12 substituições e um gap na sequência dos domínios D1/D2 em relação a esta espécie.

***Papiliotrema* sp. nov.1**

Papiliotrema sp. nov.1 possui um isolado obtido de fruto. A espécie mais próxima é *Pa. mangalensis* (CBS 10870, acesso GenBank KY107130) (Figura 12), possuindo 15 substituições de nucleotídeos na sequência dos domínios D1/D2 em relação a esta espécie. Em relação a região ITS, *Papiliotrema* sp. nov. 1 apresenta 13 substituições e cinco gaps quando comparada com a sequência de *Pa. mangalensis* (CBS 10870, acesso GenBank NR_144816).

***Papiliotrema* sp. nov. 2**

Papiliotrema sp. nov. 2 possui dois isolados obtidos a partir de flor de murici e formiga (*Pseudomyrmex tenuis*). A espécie mais próxima é *Pa. siamense* (DMKU-SP85, acesso GenBank AB909023) (Figura 12), possuindo cinco substituições na sequência dos domínios D1/D2 em relação a esta espécie. Em relação à região ITS, *Papiliotrema* sp. nov. 2 apresenta

sete substituições e dois gaps se comparada com a sequência de *Pa. siamense* (DMKU-SP85, acesso GenBank AB915387).

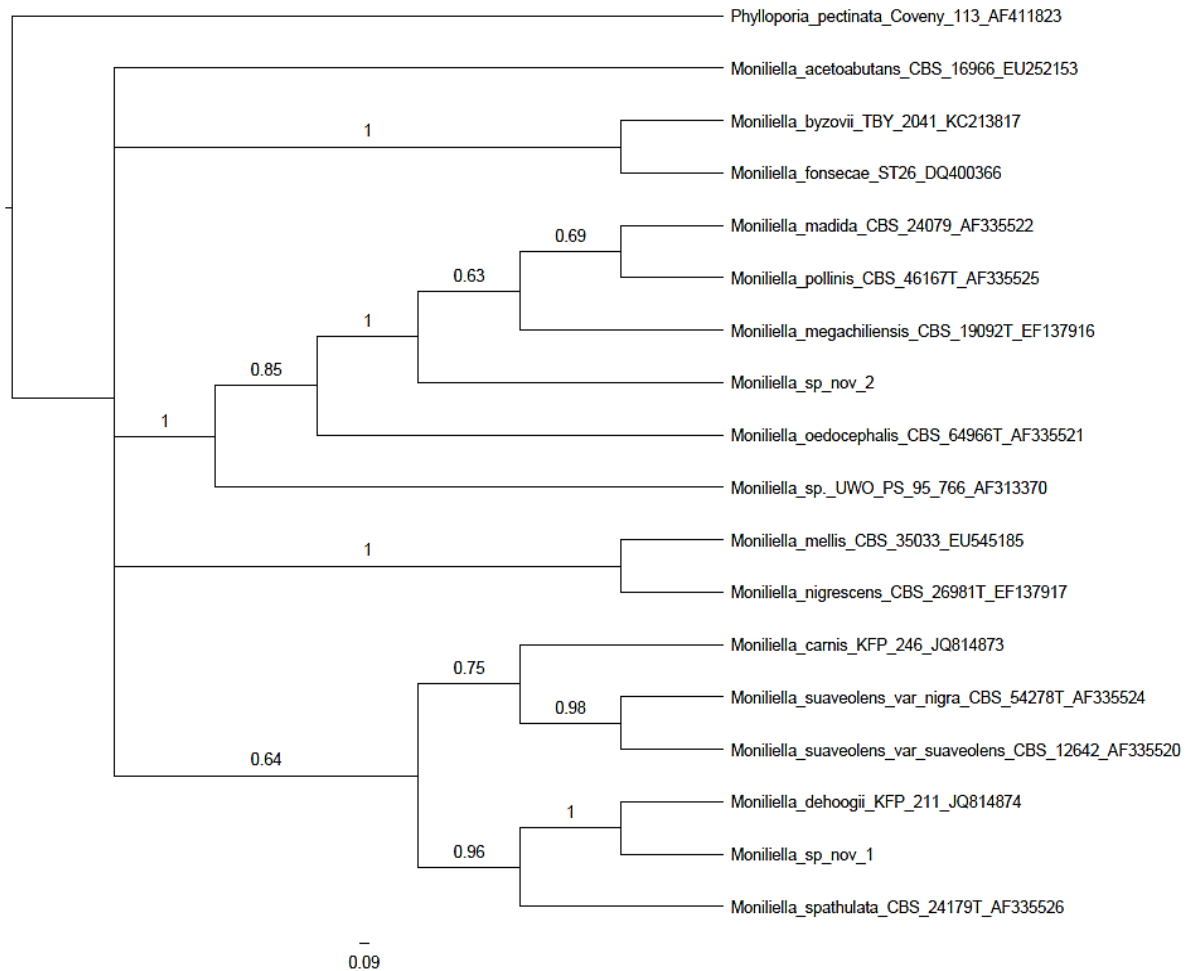


Figura 11 - Árvore consenso das espécies *Moniliella* sp. nov. 1 e *Moniliella* sp. nov. 2 construída com análise de maioria Bayesiana utilizando sequências da região D1/D2 do gene do RNA ribossomal. Esta árvore é derivada de 15000 árvores retidas. O grupo externo corresponde a espécie *Phylloporia pectinata*. Os números nos ramos representam a probabilidade posterior (PP). O limite do suporte bayesiano da PP é definido para valores $\geq 0,95$. A barra indica o número de passos mutacionais. Sequências de referência aparecem com o código de depósito do *GenBank database*.

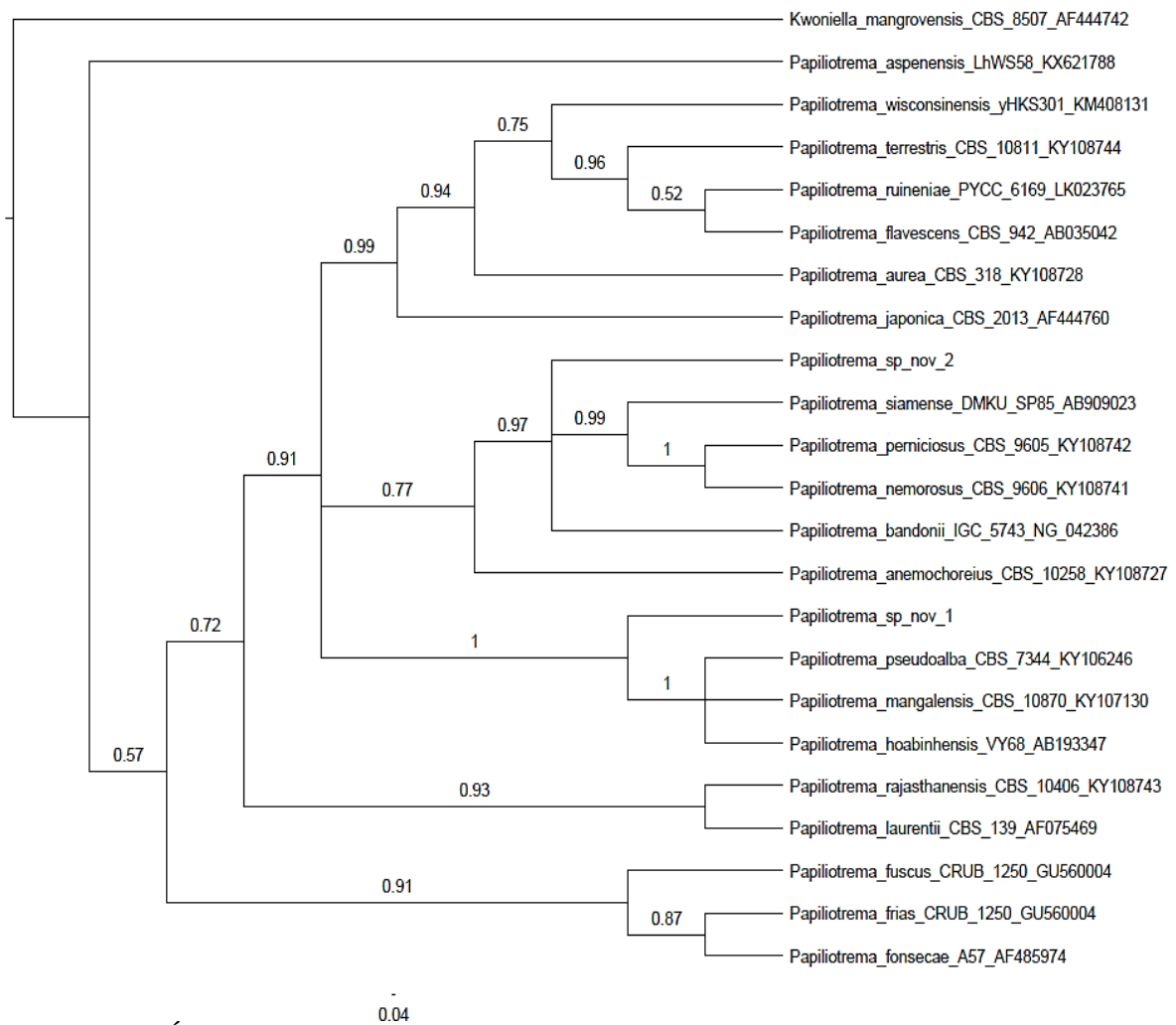


Figura 12 - Árvore consenso das espécies *Papiliotrema* sp. nov. 1 e *Papiliotrema* sp. nov. 2 construída com análise de maioria Bayesiana utilizando sequências da região D1/D2 do gene do RNA ribossomal. Esta árvore é derivada de 15000 árvores retidas. O grupo externo corresponde a espécie *Kwniella mangrovensis*. Os números nos ramos representam a probabilidade posterior (PP). O limite do suporte bayesiano da PP é definido para valores $\geq 0,95$. A barra indica o número de passos mutacionais. Sequências de referência aparecem com o código de depósito do *GenBank database*.

Phragmotaelium sp. nov. 1

Phragmotaelium sp. nov. 1 possui 3 isolados obtido a partir de frutos de murici. A espécie mais próxima é *Ph. oryzicola* (JCM 10218 acesso GenBank AB052824) (Figura 13), possuindo 17 substituições na sequência dos domínios D1/D2 em relação a esta espécie.

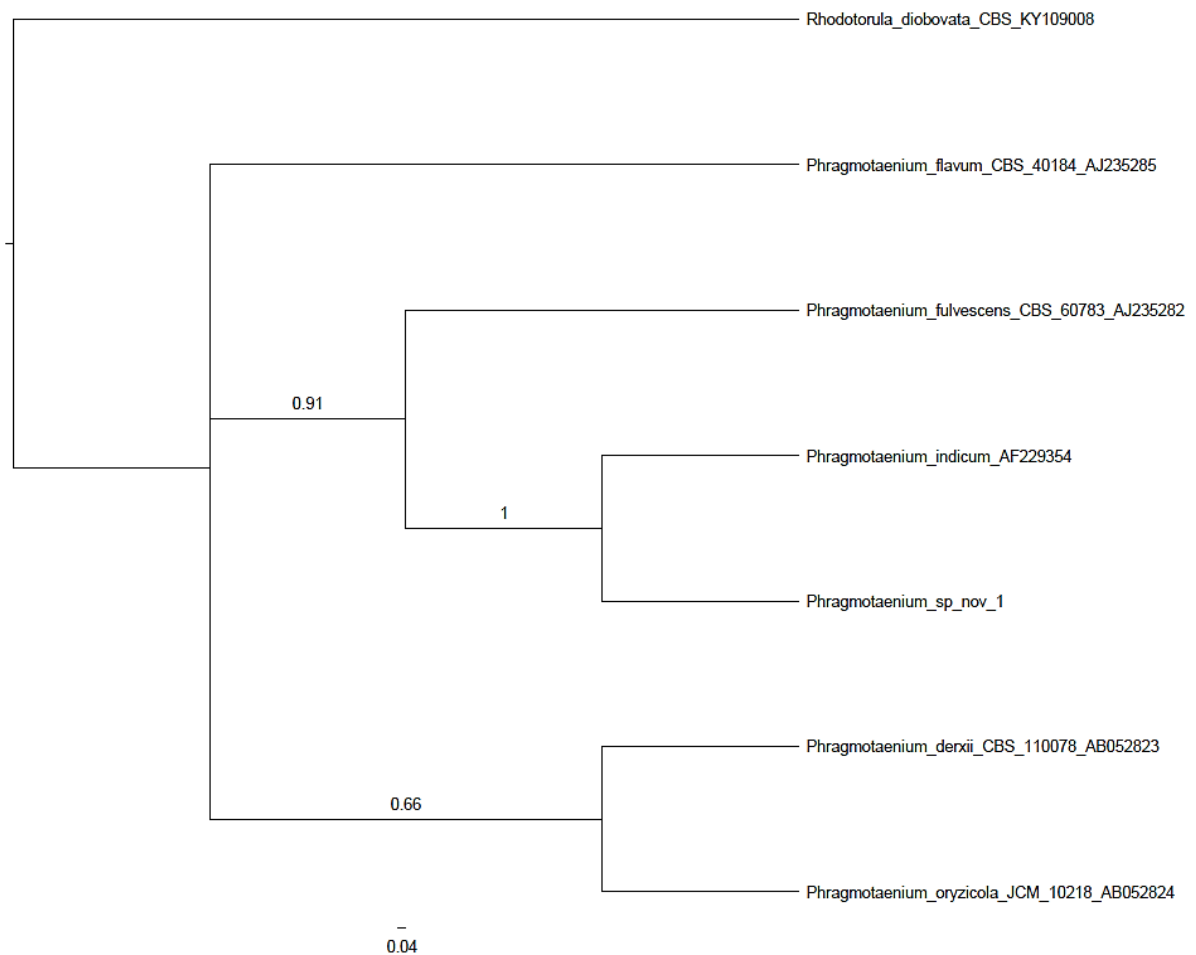


Figura 13 - Árvore consenso da espécie *Phragmotaelium* sp. nov. 1 construída com análise de maioria Bayesiana utilizando sequências da região D1/D2 do gene do RNA ribossomal. Esta árvore é derivada de 15000 árvores retidas. O grupo externo corresponde a espécie *Rhodotorula diobovata*. Os números nos ramos representam a probabilidade posterior (PP). O limite do suporte bayesiano da PP é definido para valores $\geq 0,95$. A barra indica o número de passos mutacionais. Sequências de referência aparecem com o código de depósito do *GenBank database*.

Priceomyces sp. nov.1

Priceomyces sp. nov.1 possui um isolado obtido a partir de uma amostra de flor de murici. A espécie mais próxima é *Pr. fermenticarens* (CBS 7040, acesso GenBank KY102085) (Figura 14), diferenciando desta espécie por nove substituições de nucleotídeos e quatro gaps tanto na sequência dos domínios D1/D2 quanto na sequência da região ITS.

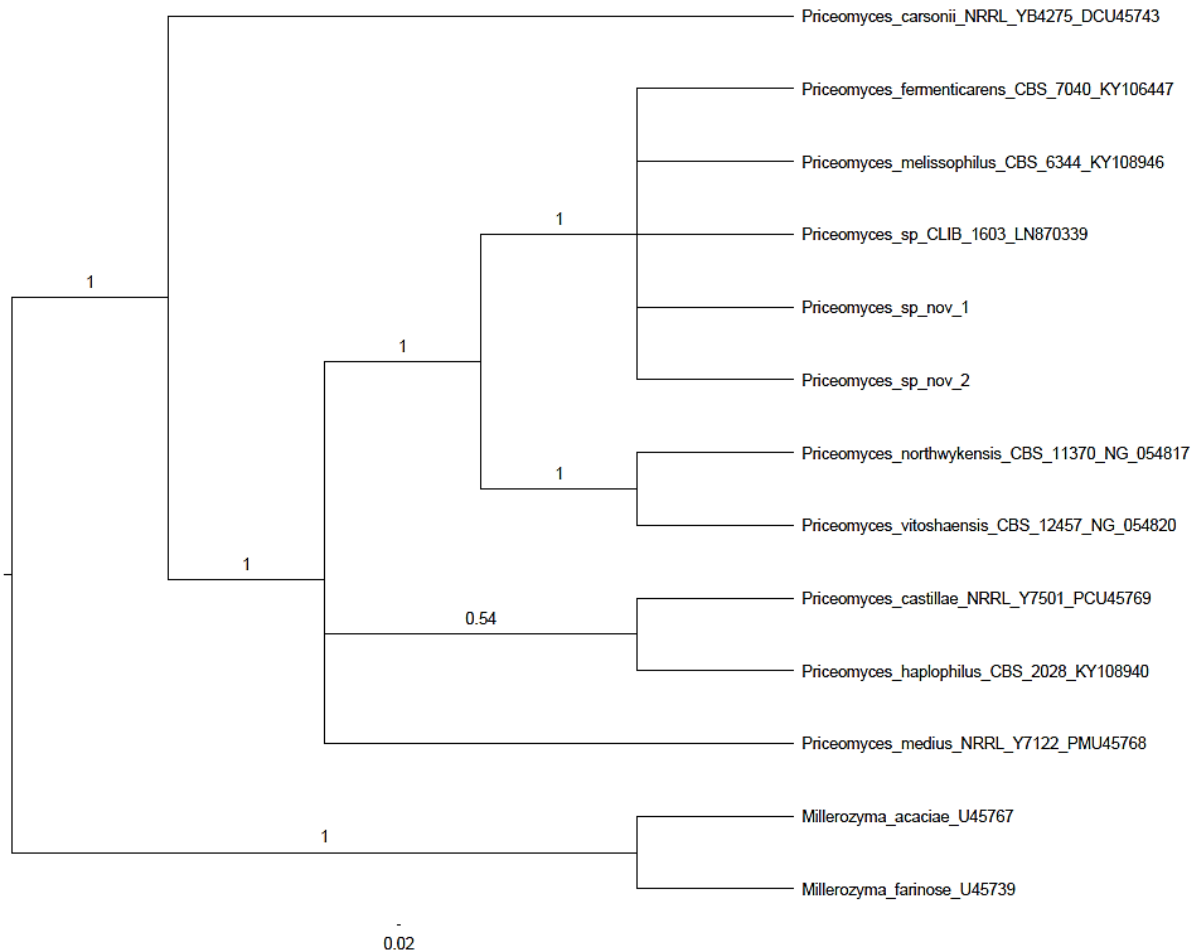


Figura 14 - Árvore consenso da espécie *Phragmotaenium* sp. nov. 1 construída com análise de maioria Bayesiana utilizando sequências da região D1/D2 do gene do RNA ribossomal. Esta árvore é derivada de 15000 árvores retidas. O grupo externo corresponde a espécie *Millerozyma farinose*. Os números nos ramos representam a probabilidade posterior (PP). O limite do suporte bayesiano da PP é definido para valores $\geq 0,95$. A barra indica o número de passos mutacionais. Sequências de referência aparecem com o código de depósito do *GenBank database*.

***Priceomyces* sp. nov. 2**

Priceomyces sp. nov. 2 possui um isolado obtido a partir de fruto de murici. Essa espécie é idêntica *Priceomyces* sp. (CLIB 1603, acesso GenBank LN870339), que ainda não tem uma descrição formal publicada. A espécie mais próxima é a *P. melissophilus* (CBS 6344, acesso GenBank KY108946) (Figura 14), possuindo cinco substituições de nucleotídeos na sequência dos domínios D1/D2.

***Starmerella* sp. nov. 1**

Starmerella sp.nov. 1 possui um isolado obtido a partir de flor de murici. A espécie mais próxima é *St. caucasica* (CBS:12650 acesso GenBank KY109783) (Figura 15), pois difere em 20 substituições na sequência dos domínios D1/D2 e 39 substituições e 18 gaps na região ITS (CBS 12650 acesso GenBank KY105545) em relação a esta espécie.

***Starmerella* sp. nov. 2**

Starmerella sp.nov. 2 possui um isolado obtido a partir de uma amostra de flor. Essa espécie é mais próxima a *St. bombycola* (NRRL Y-17069, acesso GenBank NG_042648) (Figura 15) pois difere em 19 substituições e um gap na sequência dos domínios D1/D2 em relação a esta espécie. Em relação a sequência da região ITS, a espécie mais próxima é *C. riodecensis* (CBS 10087, acesso GenBank NR_137870) tendo 23 substituições de nucleotídeos e quatro gaps em relação a esta espécie.

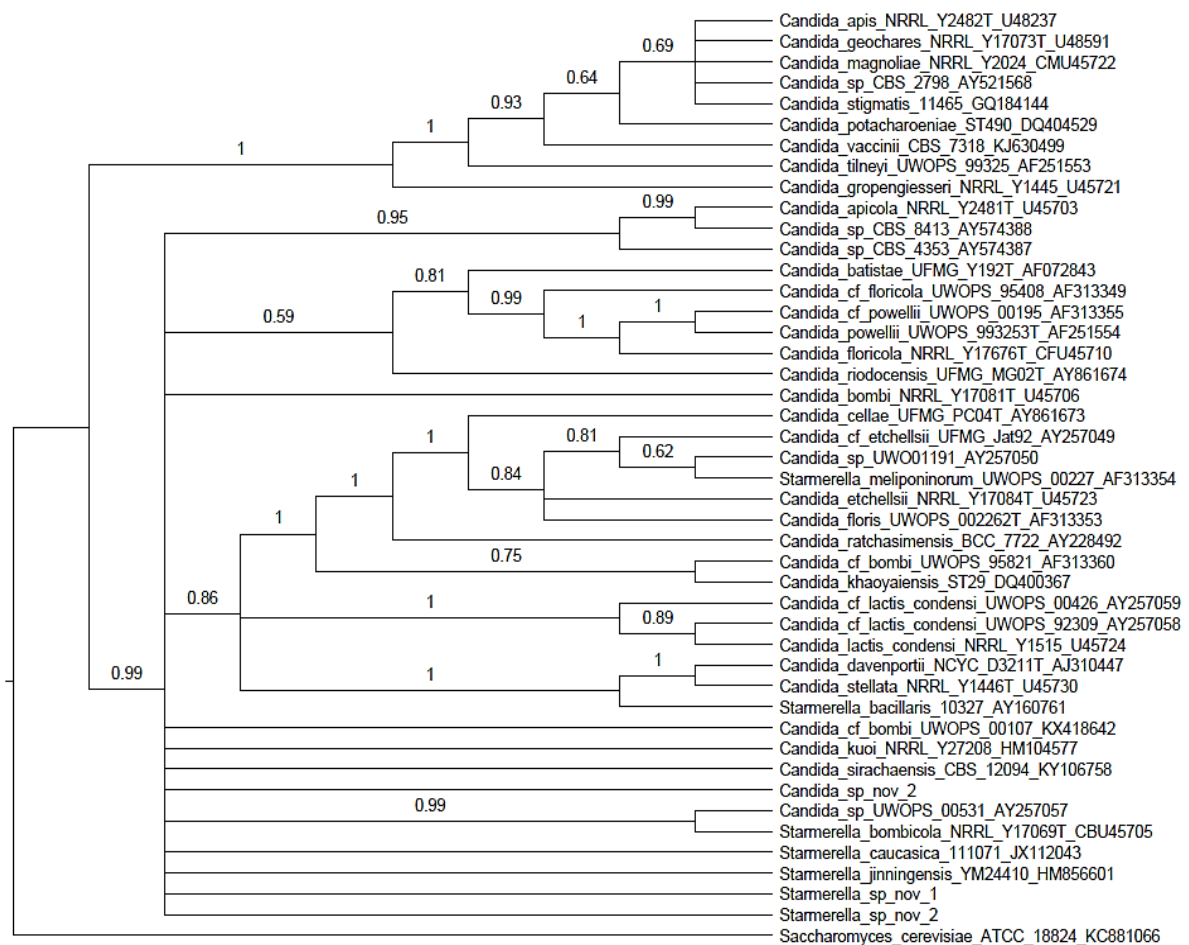


Figura 15 - Árvore consenso das espécies *Candida* sp. nov. 1 e *Starmerella* sp. nov. 1 e *Starmerella* sp. nov. 2 construída com análise de maioria Bayesiana utilizando sequências da região D1/D2 do gene do RNA ribossomal. Esta árvore é derivada de 15000 árvores retidas. O grupo externo corresponde a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Os números nos ramos representam a probabilidade posterior (PP). O limite do suporte bayesiano da PP é definido para valores $\geq 0,95$. A barra indica o número de passos mutacionais. Sequências de referência aparecem com o código de depósito do *GenBank database*.

Symmetrospora sp. nov. 1

Symmetrospora sp. nov. 1 possui um isolado obtido de uma amostra de fruto. Essa espécie é mais próxima de *Sy. marina* (CBS 2365, acesso GenBank AF189944) (Figura 16). As duas espécies diferem por 11 substituições de nucleotídeos e quatro gaps na sequência dos domínios D1/D2.

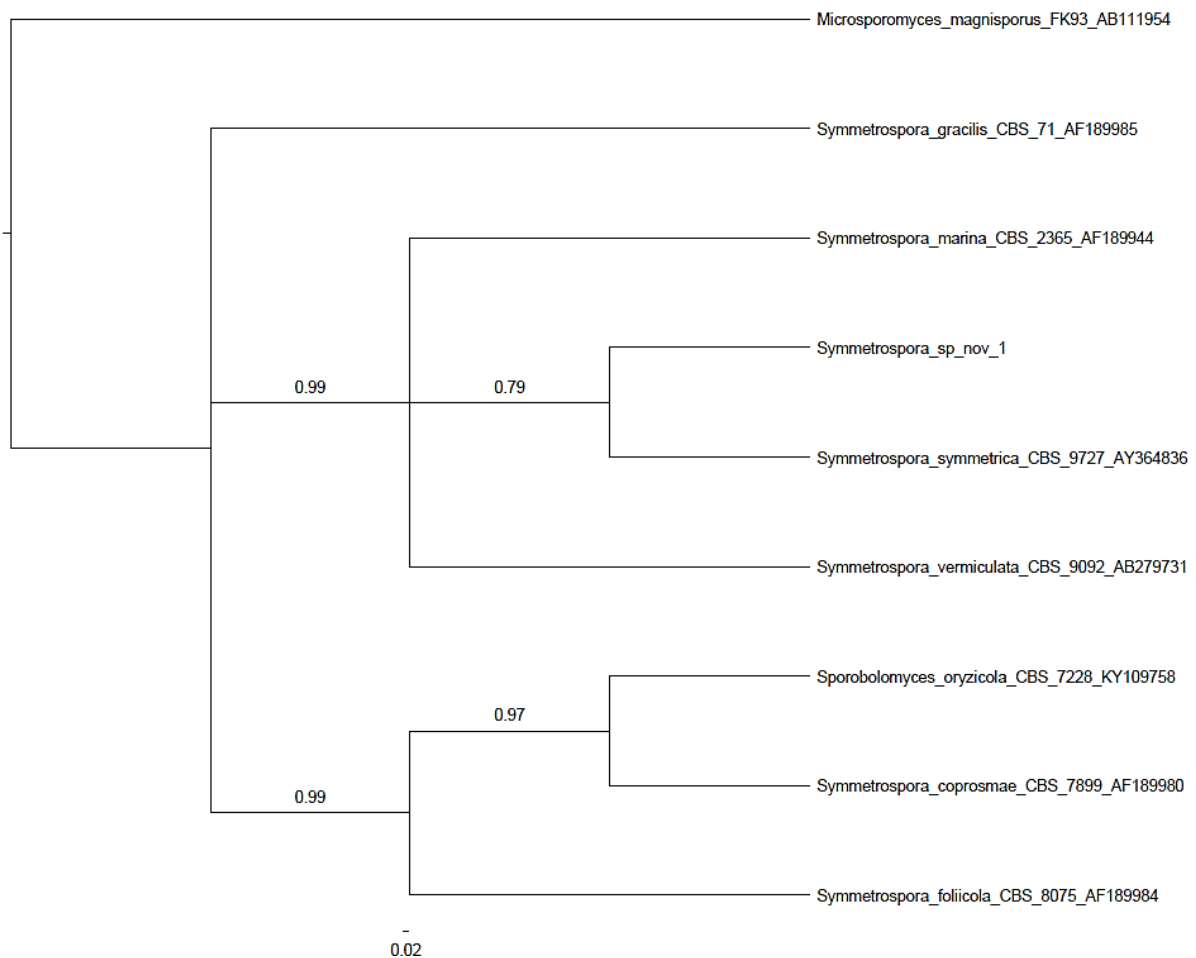


Figura 16 - Árvore consenso da espécie *Symmetrospora* sp. nov. 1 construída com análise de maioria Bayesiana utilizando sequências da região D1/D2 do gene do RNA ribossomal. Esta árvore é derivada de 15000 árvores retidas. O grupo externo corresponde a espécie *Microsporomyces magnisporus*. Os números nos ramos representam a probabilidade posterior (PP). O limite do suporte bayesiano da PP é definido para valores $\geq 0,95$. A barra indica o número de passos mutacionais. Sequências de referência aparecem com o código de depósito do *GenBank database*.

***Sympodiomyopsis* sp. nov. 1**

Sympodiomyopsis sp. nov. 1 possui três isolados obtidos de flores. Essa espécie é mais próxima de *Sym. paphiopedili* (CBS 7429, acesso GenBank KY109813) (Figura 17). As duas espécies diferem por sete substituições na sequência dos domínios D1/D2 e 32 substituições de nucleotídeos e cinco gaps na região ITS.

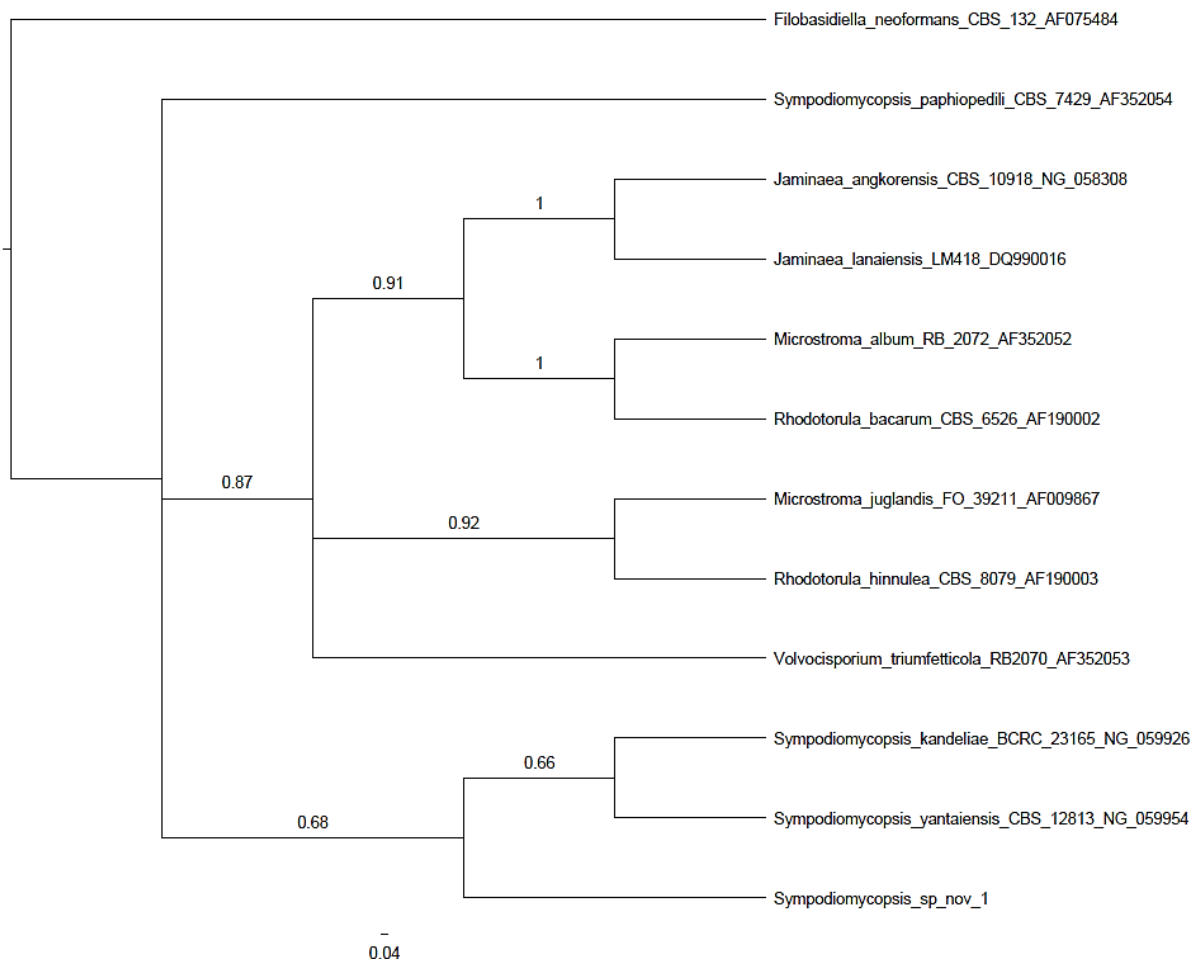


Figura 17 - Árvore consenso da espécie *Sympodiomyces* sp. nov. 1 construída com análise de maioria Bayesiana utilizando sequências da região D1/D2 do gene do RNA ribossomal. Esta árvore é derivada de 15000 árvores retidas. O grupo externo corresponde a espécie *Filobasidiella neoformans*. Os números nos ramos representam a probabilidade posterior (PP). O limite do suporte bayesiano da PP é definido para valores $\geq 0,95$. A barra indica o número de passos mutacionais. Sequências de referência aparecem com o código de depósito do *GenBank database*.

***Triodiomyces* sp. nov.1**

Triodiomyces sp. nov.1 possui um isolado obtido de uma amostra de fruto. Essa espécie é próxima a *T. triodiae* (H.U.V.17662, acesso GenBank AY740126) (Figura 18). As duas espécies diferem por 10 substituições de nucleotídeos na sequência dos domínios D1/D2.

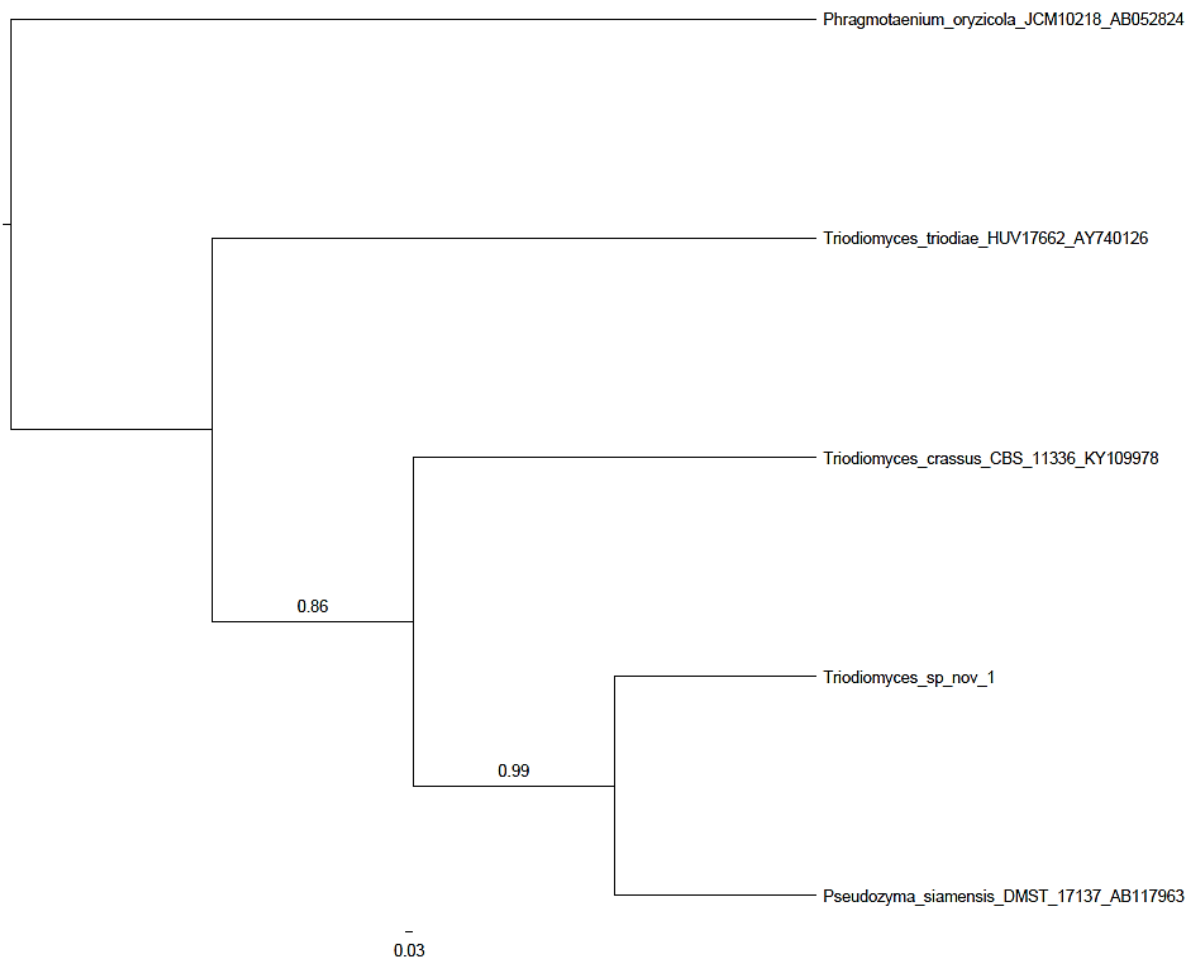


Figura 18 - Árvore consenso da espécie *Tridiomyces* sp. nov. 1 construída com análise de maioria Bayesiana utilizando sequências da região D1/D2 do gene do RNA ribossomal. Esta árvore é derivada de 15000 árvores retidas. O grupo externo corresponde a espécie *Phragmotaeium oryzicola*. Os números nos ramos representam a probabilidade posterior (PP). O limite do suporte bayesiano da PP é definido para valores $\geq 0,95$. A barra indica o número de passos mutacionais. Sequências de referência aparecem com o código de depósito do *GenBank database*.

***Wickerhamiella* sp. nov.1**

Wickerhamiella sp. nov. 1 possui um isolado obtido a partir de uma amostra de fruto. Essa espécie é próxima a *W. slavikovae* (IMUFRJ 52096, acesso GenBank FJ463264) (Figura 19). As duas espécies diferem por 12 substituições na sequência dos domínios D1/D2.

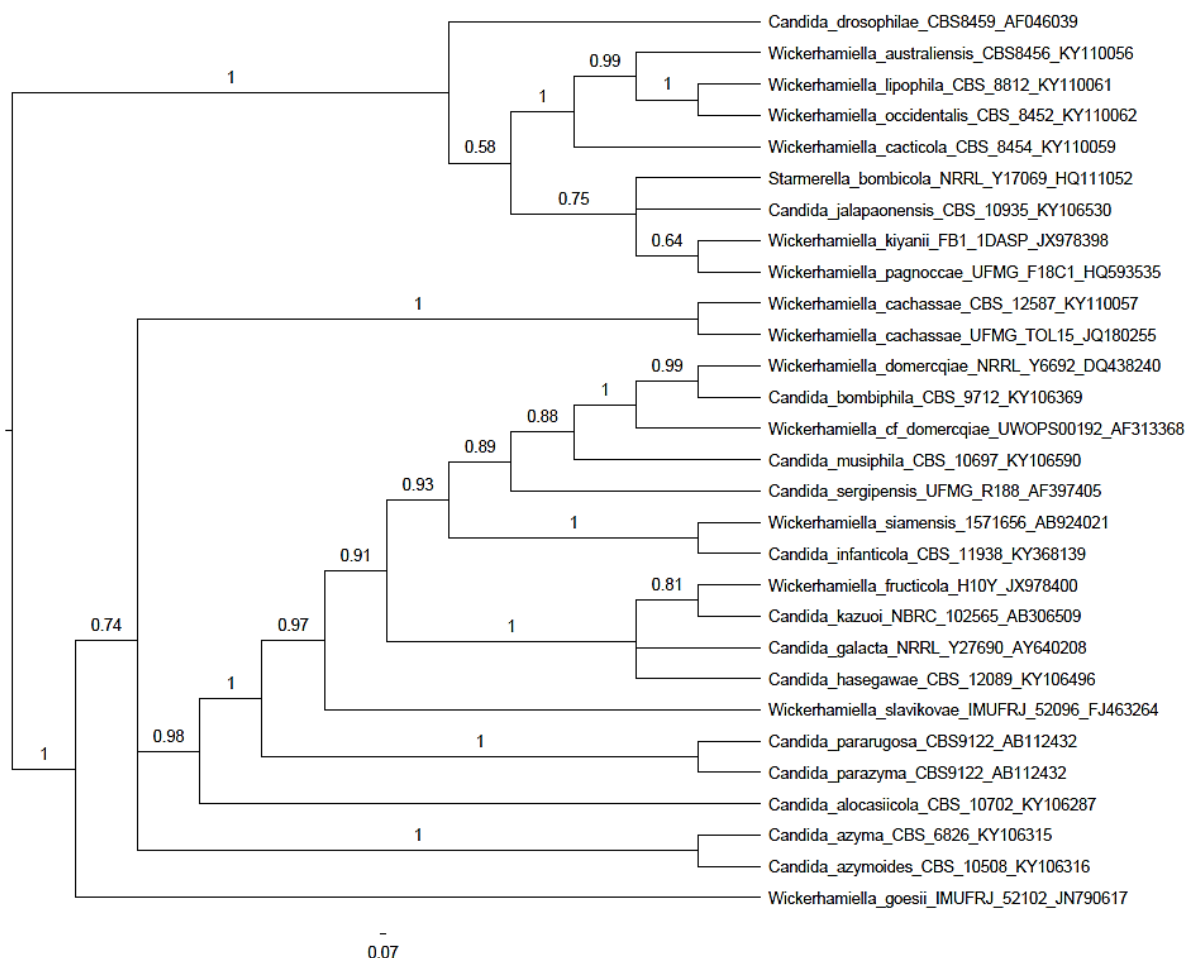


Figura 19 - Árvore consenso das espécies *Wickerhamiella* sp. nov. 1 e *Wickerhamiella* sp. nov. 2 construída com análise de maioria Bayesiana utilizando sequências da região D1/D2 do gene do RNA ribossomal. Esta árvore é derivada de 15000 árvores retidas. O grupo externo corresponde a espécie *Stammerella bombicola*. Os números nos ramos representam a probabilidade posterior (PP). O limite do suporte bayesiano da PP é definido para valores $\geq 0,95$. A barra indica o número de passos mutacionais. Sequências de referência aparecem com o código de depósito do *GenBank database*.

Wickerhamiella sp. nov. 2

Wickerhamiella sp. nov. 2 possui um isolado obtido a partir de uma amostra de flor. Essa espécie é idêntica a sequência dos domínios D1/D2 de *Wickerhamiella* sp. (CLIB 1732) (Figura 19) um isolado obtido a partir de uma amostra de flor coletada na Guiana Francesa (acesso GenBank LN909498). Outra linhagem próxima filogeneticamente é *Wickerhamiella* cf. *domercqiae* (UWO(PS)00-192.1 acesso GenBank AF313368). Esta espécie difere da linhagem isolada de murici por sete substituições e dois gaps na sequência dos domínios D1/D2. Em relação à região ITS, a espécie mais próxima é *C. musiphila* (AS 2.3479, acesso GenBank NR_137695) com 84 substituições de nucleotídeos e 34 gaps em relação a esta espécie.

Yamadazyma sp. nov. 1

Yamadazyma sp. nov. 1 possui um isolado obtido de uma amostra de flor. Essa espécie é próxima a *Y. mexicana* (CBS:7066, acesso GenBank KY110154) (Figura 20). Estas espécies diferem em nove substituições na sequência dos domínios D1/D2 e 20 substituições e cinco gaps na região ITS (CBS 7066 acesso GenBank KY105940).

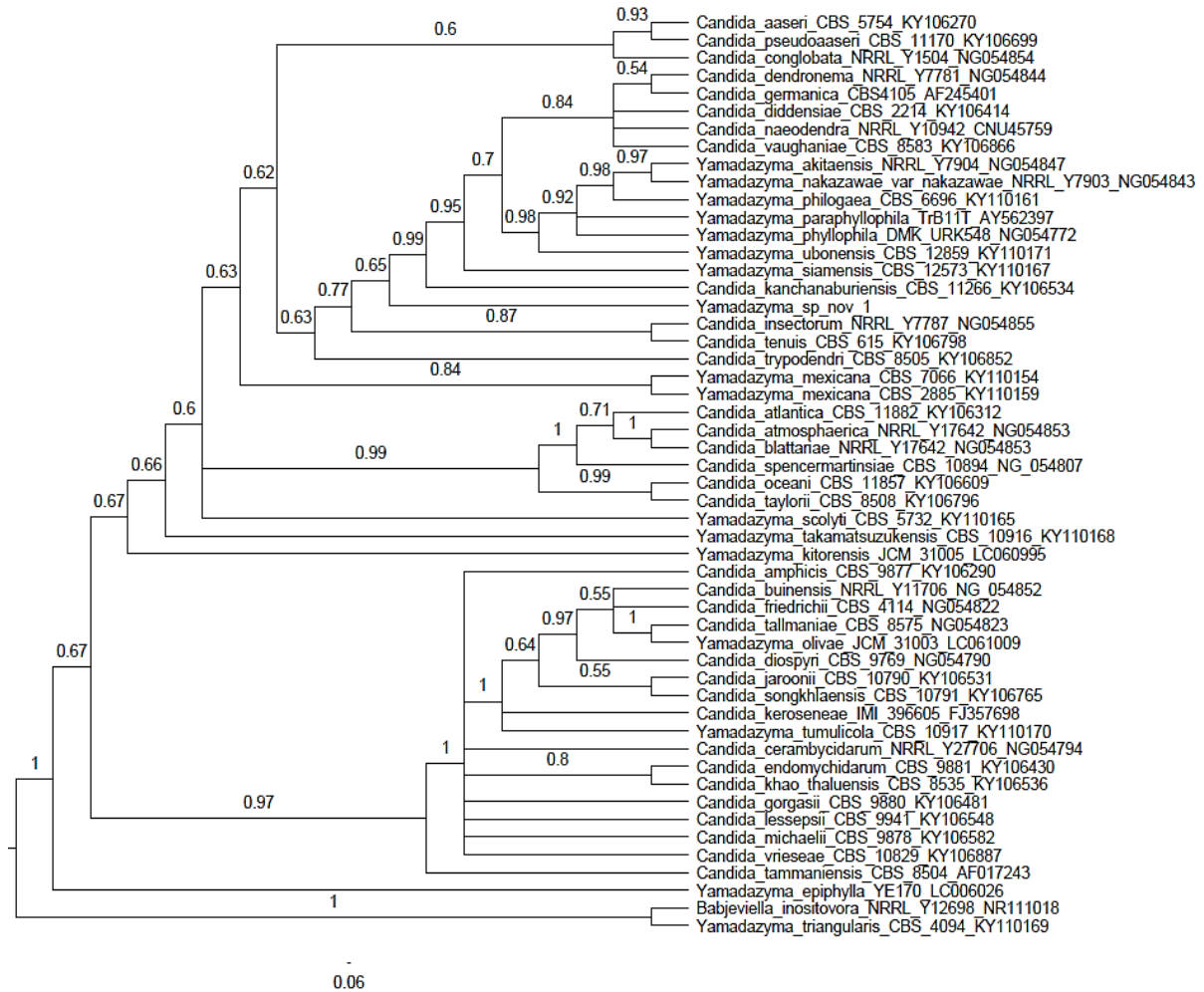


Figura 20 - Árvore consenso da espécie *Yamadazyma* sp. nov. 1 construída com análise de maioria Bayesiana utilizando sequências da região D1/D2 do gene do RNA ribossomal. Esta árvore é derivada de 15000 árvores retidas. O grupo externo corresponde a espécie *Babjeviella inositovora*. Os números nos ramos representam a probabilidade posterior (PP). O limite do suporte bayesiano da PP é definido para valores $\geq 0,95$. A barra indica o número de passos mutacionais. Sequências de referência aparecem com o código de depósito do *GenBank database*.

Zygosaccharomyces sp. nov. 1

Zygosaccharomyces sp. nov.1 possui um isolado obtido de uma amostra de fruto. Essa espécie é próxima a *Z. bailii* (CBS 4691, acesso GenBank KY110241) (Figura 21). Estas espécies diferem por 43 substituições e 17 gaps na sequência dos domínios D1/D2.

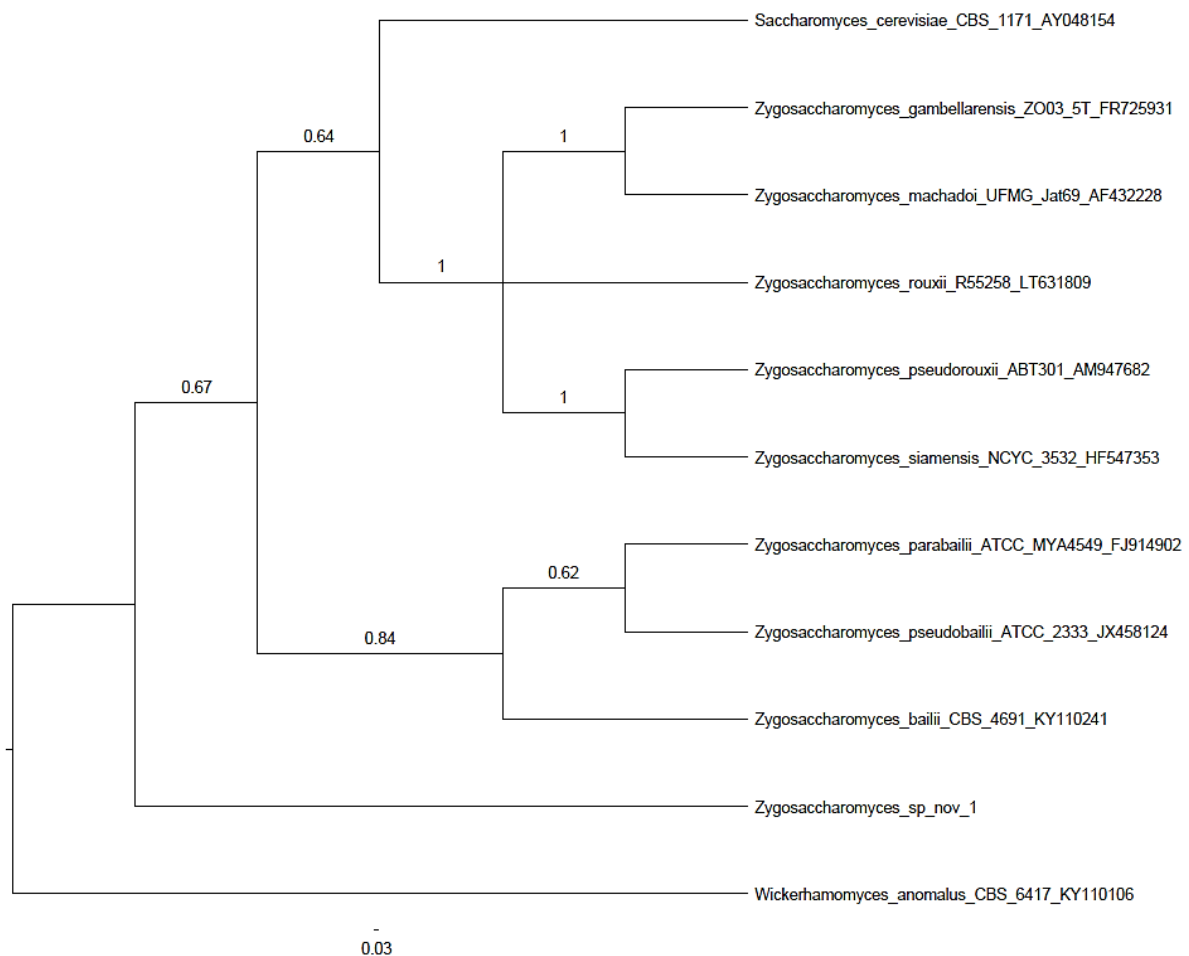


Figura 21 - Árvore consenso da espécie *Yamadazyma* sp. nov. 1 construída com análise de maioria Bayesiana utilizando sequências da região D1/D2 do gene do RNA ribossomal. Esta árvore é derivada de 15000 árvores retidas. O grupo externo corresponde a espécie *Wickerhamomyces anomalus*. Os números nos ramos representam a probabilidade posterior (PP). O limite do suporte bayesiano da PP é definido para valores $\geq 0,95$. A barra indica o número de passos mutacionais. Sequências de referência aparecem com o código de depósito do *GenBank database*.

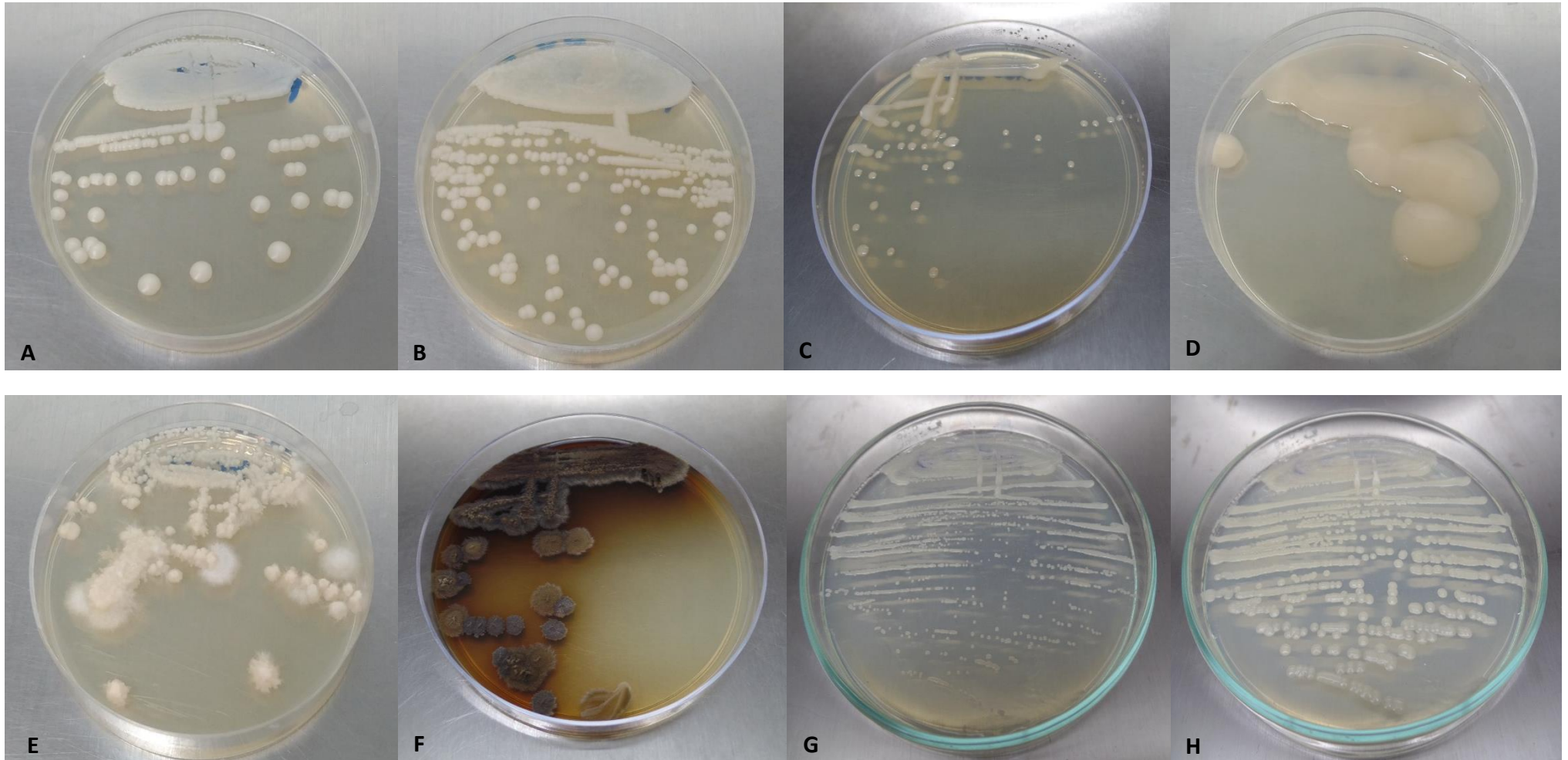


Figura 22 - Aspecto morfológico das possíveis espécies novas isoladas neste trabalho. A: *Candida* sp. nov. 1; B: *Candida* sp. nov. 2; C: *Hannaella* sp. nov. 1; D: *Hannaella* sp. nov. 2; E: *Moniliella* sp. nov. 1; F: *Moniliella* sp. nov. 2; G: *Papiliotrema* sp. nov. 1; H: *Papiliotrema* sp. nov. 2.

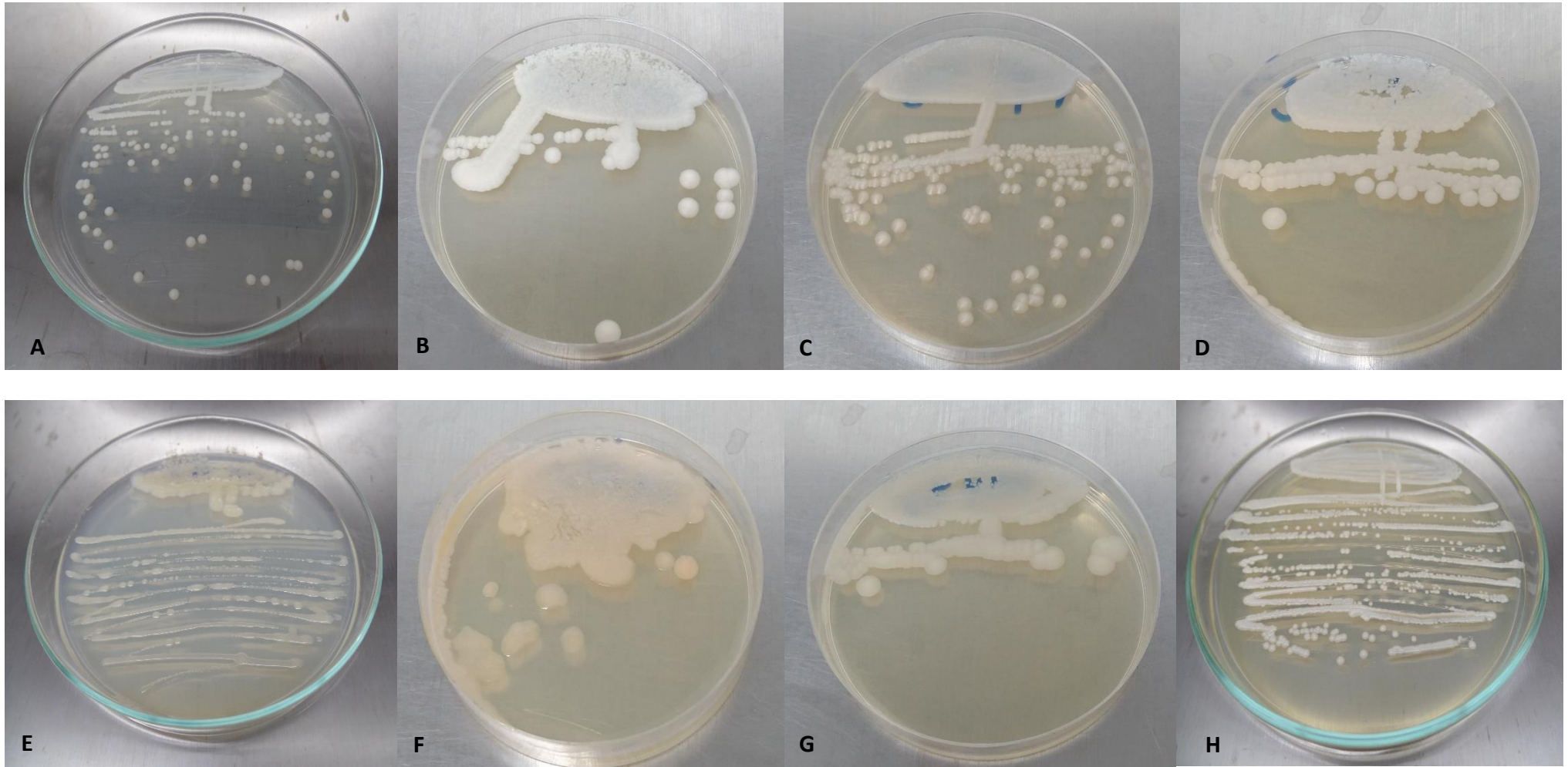


Figura 23 - Aspecto morfológico das possíveis espécies novas isoladas neste trabalho. A: *Priceomyces* sp. nov. 1; B: *Priceomyces* sp. nov. 2; C: *Starmerella* sp. nov. 1; D: *Starmerella* sp. nov. 2; E: *Sympodiomyopsis* sp. nov.1; F: *Triodiomyces* sp. nov.1; G: *Wickerhamiella* sp. nov. 1; H: *Wickerhamiella* sp. nov. 2.

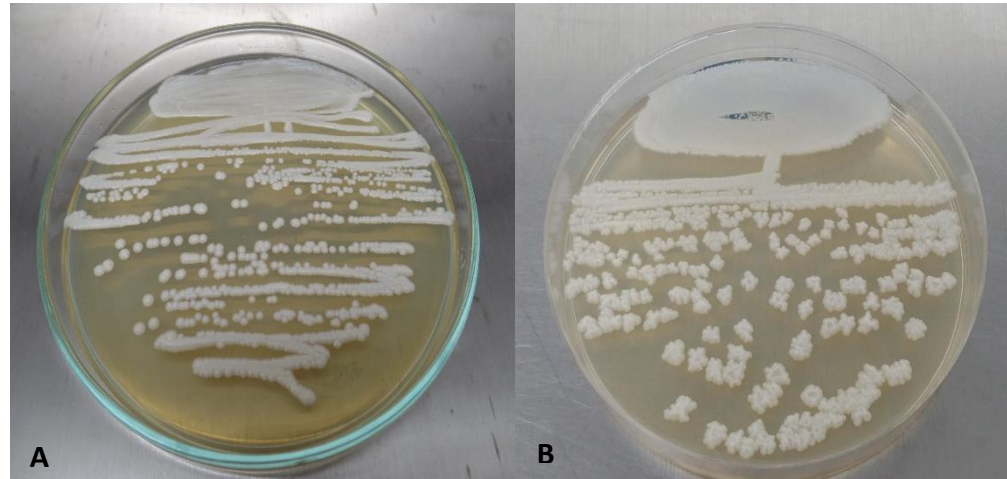


Figura 24 - Aspecto morfológico das possíveis espécies novas isoladas neste trabalho. A: *Yamadazyma* sp. nov. 1; B: *Zygosaccharomyces* sp. nov. 1.

7. CONCLUSÕES

- Entre as leveduras isoladas a partir das amostras de flores, houve predominância de leveduras ascomicéticas. Já que as flores de *B. crassifolia* não produzem néctar como recompensa floral, isso sugere que o néctar é somente um dos fatores que favorece a predominância de leveduras ascomicéticas nas flores.
- O fungo leveduriforme *A. pullulans* foi a espécie mais frequente nas amostras de flores de murici, seguida de *Pa. flavescens*, *C. apicola*, *M. guilliermondii*, *Mon. fonsecae*, *Hy. burtonii*, *Ps. hubeiensis*, *C. carpophila*, *Pa. laurentii* e *St. meliponinorum*. Estas espécies estão frequentemente associadas a uma diversidade de substratos, incluindo material vegetal, podendo ser consideradas espécies cosmopolitas. No entanto, *Mon. fonsecae* parece ser uma espécie endêmica de murici, já que foi isolada tanto em flores quanto frutos e insetos associados a estes substratos.
- Dentre as leveduras isoladas a partir das amostras de insetos, houve predomínio de leveduras basidiomicéticas e baixa similaridade entre as comunidades de leveduras de flores e insetos. Isso sugere que os insetos amostrados visitam outros substratos, e não apenas as flores de murici e que muitas leveduras isoladas dos insetos podem ser consideradas alóctones em relação às flores.
- Dentre as leveduras coletadas a partir das amostras de frutos, houve predomínio de leveduras ascomicéticas, sendo que a espécie mais frequente nesse substrato foi *P. occidentalis*, seguida de *Z. bailii*, *S. halophilus*, *P. kluyveri*, *Hanseniaspora* spp., *P. kudriavzevii* e *C. tropicalis*. Estas espécies são associadas a plantas e/ou ambientes de fermentação. As três espécies de *Pichia* encontradas estão associadas a frutos em fases iniciais de deterioração, e portanto, podem ser consideradas como autóctones de frutos de murici.
- Flores e frutos de murici apresentaram uma alta riqueza de espécies de leveduras, no entanto, estes micro-habitas compartilharam poucas espécies. Isto pode ser explicado pela constituição dos dois substratos, já que a flor não apresenta nectários, e as fontes de carbono utilizadas pelas leveduras seriam diferentes do néctar. Os frutos propiciaram uma riqueza maior de fontes de carbono, como açúcares simples rapidamente fermentáveis, e isto possivelmente influenciou na composição da comunidade de leveduras associadas a este substrato.
- A utilização de meios seletivos para o isolamento de leveduras a partir de flores e frutos de murici possibilitou a detecção de nove possíveis espécies novas, que não foram

encontradas utilizando-se apenas o meio de cultura padrão (YM) usado para a obtenção de leveduras de ambientes naturais. Este resultado reforça a utilização de diferentes meios de cultura para uma melhor caracterização da diversidade de leveduras associadas a substratos naturais.

- Dos 42 isolados pertencentes ao gênero *Moniliella*, 73,8% foram isolados de flores e insetos associados a flores. Isso pode estar relacionado ao fato de que as flores de *B. crassifolia* fornecem óleo como recompensa floral, favorecendo a permanência de espécies que tem preferência por habitats oleaginosos.
- No presente trabalho foram isoladas vinte possíveis espécies novas mostrando que flores, frutos e insetos associados ao murici representam um rico substrato para a obtenção de novas espécies de leveduras.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, J. et al. The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. **Can. J. Microbiol.**, vol. 43, 1997.
- ABRANCHES, J. et al. The yeast community and mycocin producers of guava fruit in Rio de Janeiro, Brazil. **Mycologia**, New York, v. 92, n. 1, p. 16-22, 2000.
- ABRANCHES, J.; STARMER, W. T.; HAGLER, A. N. Yeast-yeast interactions in Guava and tomato fruits. **Microb. Ecol.**, New York, v. 42, p. 186192, 2001.
- ADAMIAK, J. et al. Halophilic microorganisms in deteriorated historic buildings: insights into their characteristics. **Act. Bioc. Polonica**, v. 63, n. 2, p. 335-341, 2016.
- AGRA, M.D. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Braz. J. of Pharmacognos.**, v.18, p. 472–508, 2008.
- AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2388-2392, 2005.
- ALLEN, T.W. et al. Effect of foliar disease on the epiphytic yeast communities of creeping bentgrass and tall fescue. **Can. J. Microbiol.**, v. 50, n.10, p. 853-60, 2004.
- ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p.85-88.
- ÁLVAREZ-PÉREZ, S. et al. Nectar yeasts of the *Metschnikowia* clade are highly susceptible to azole antifungals widely used in medicine and agriculture. **FEMS Yeast Res.**, v. 16, n.1, 2016.
- ALVAREZ-PÉREZ, S.; HERRERA, C.M. Composition, richness and nonrandom assembly of culturable bacterial-microfungal communities in floral nectar of Mediterranean plants. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 83, p. 685–99, 2013.
- AMARAL, F.M.M. et al. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.16, p. 696-720, 2006.
- ANDREWS, J.H.; HARRIS, R.F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 38, p.145–180, 2000.
- APONTE, M; BLAIOTTA, G. Potential Role of Yeast Strains Isolated from Grapes in the Production of Taurasi DOCG. **Front. Microbiol.**, v.27, n. 7, p. 809, 2016.
- ARAGUATINS. Prefeitura Municipal. **A cidade**. Araguatins, 2015. Disponível em:<<http://www.araguatins.to.gov.br/>>. Acesso em: 23 jul. 2015.
- ARRIZON, J. et al. Fructanase and fructosyltransferase activity of non-Saccharomyces yeasts isolated from fermenting musts of mezcal. **Biores. Tec.**, v. 110, p. 560 –565, 2012.

- BAI, F. Reclassification of the *Sporobolomyces roseus* and *Sporidiobolus pararoseus* complexes, with the description of *Sporobolomyces phaffii* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 52, p.2309–2314, 2002.
- BARBOSA, A. C. et al. *Wickerhamiella pagnoccae* sp. nov. and *Candida tocantinsensis* sp. nov., two ascomycetous yeasts from flower bracts of *Heliconia psittacorum* (Heliconiaceae). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 62, n. 2, p. 459-464, 2012.
- BASELGA, A. Partitioning the turnover and nestedness components of beta diversity. **Global Ecol. Biogeog.**, Oxford, v.19, p.134 – 143. jan. 2010.
- BELISLE, M.; MENDENHALL, C.D.; OVIEDO BRENES, F.; FUKAMI, T. Temporal variation in fungal communities associated with tropical hummingbirds and nectarivorous bats. **Fungal Ecol.**, v. 12, p. 1–7, 2014.
- BELISLE, M.; PEAY, K.G.; FUKAMI, T. Flowers as islands: spatial distribution of nectar-inhabiting microfungi among plants of *Mimulus aurenticus*, a hummigbird-pollinated shrub. **Microb Ecol**, v. 63, p.711–718, 2012.
- BERGER, I. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 62, p. 107–115, 1998.
- BEZERRA-BUSSOLI, C. et al. Yeast Diversity Isolated from Grape Musts During Spontaneous Fermentation from a Brazilian Winery. **Curr. Microbiol.**, v. 67, p. 356–361, 2013
- BHADRA, B. et al. *Pichia cecembensis* sp. nov. isolated from a papaya fruit (*Carica papaya* L., Caricaceae). **FEMS Yeast Res.**, v.7, n. 4, p. 579-84, 2007.
- BLANCO, P.; SIEIRO, C.; VILLA, T.G. Production of pectic enzymes in yeasts: MiniReview. **FEMS Microbiol Lett.**, v.175, p.1-9, 1999.
- BOBY, V. U.; BALAKRISHNA, A. N.; BAGYARAJ, D. J. Interaction between *Glomus mosseae* and soil yeasts on growth and nutrition of cowpea. **Microbiol. Res.** v.163, p. 693–700, 2008.
- BRANDÃO, L. R. et al. Diversity and biogeographical patterns of yeast communities in Antarctic, Patagonian and tropical lakes. **Fungal Ecol.**, v. 28, p. 33-43, 2017.
- BRITO DA CUNHA, A., EL-TABEY SHEHATA, A. M.; DE OLIVEIRA, W. A study of the diets and nutritional preferences of tropical species *Drosophila*. **Ecology**, v. 38, p. 98–106, 1957.
- BRYSCH-HERZBERG, M. Ecology of yeasts in plant-bumblebee mutualism in Central Europe. **FEMS Microbiol. Ecol.** v.50, n. 2, p. 87–100, 2004.
- BUCHMANN, S.L. The ecology of oil flowers and their bees. **Annual Rev. Ecol. Syst.**, v.18, p.343-369, 1987.

- CACERES, A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. **J. Ethnopharmacol.**, v.30, p.55–73, 1990.
- CACERES, A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v.31, p.263–276, 1991.
- CADETE, R. M. et al. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLoS One**, v. 7, n. 8, 2012.
- CADEZ, N. et al. *Hanseniaspora nectarophila* sp. nov., a new yeast species isolated from ephemeral flowers in Brazil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, p. ijs. 0.061499-0, 2014.
- CAMARA MUNICIPAL DE ARAGUATINS. **História de Araguatins-TO**. 2017. Disponível em: <<http://www.araguatins.to.leg.br/institucional/historia>>. Acesso em: 12/04/17
- CANTO, A. et al. Pollinator foraging modifies nectar sugar composition in *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae): an experimental test. **Am J Bot.**, v. 95, p. 315–320, 2008.
- CANTO, A.; HERRERA, C. M. Micro-organisms behind the pollination scenes: microbial imprint on floral nectar sugar variation in a tropical plant community. **Ann. Bot.**, v. 110, p. 1173–1183, 2012.
- CANTO, A.; HERRERA, C. M.; RODRIGUEZ, R. Nectar-living yeasts of a tropical host plant community: diversity and effects on community-wide floral nectar traits, **PeerJ**, v. 5, 2017.
- CARVALHO, B. F. et al. Occurrence of mycotoxins and yeasts and moulds identification in corn silages in tropical climate. **J. Appl. Microbiol.**, v. 120, n. 5, p.1181-1192, 2016.
- CARVALHO, J.E.U.; NASCIMENTO, W.M.O. Caracterização biométrica e respostas fisiológicas de diásporos de murucizeiro a tratamentos para superação da dormência. **Rev. Bras. Frutic.**, v.35, p.704-712, 2013.
- CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis na Amazônia**. 7 ed. Belém: CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi, 2010.
- CHANDLER, J. A.; EISEN, J. A.; KOPP, A. Yeast communities of diverse *Drosophila* species: comparison of two symbiont groups in the same hosts. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.78, n. 20, p.7327-7336, 2012.
- CLINE, A. R. et al. Interactions between a Sap Beetle, Sabal Palm, Scale Insect, Filamentous Fungi and Yeast, with Discovery of Potential Antifungal Compounds. **PLoS One**, vol. 9, n. 2, 2014.
- CLOETE, K. J. et al. Evidence of symbiosis between the soil yeast *Cryptococcus laurentii* and a sclerophyllous medicinal shrub, *Agathosma betulina* (Berg.) Pillans. **Microb. Ecol.**, v.57, p. 624–632, 2009.
- COSTA, C.B.N.; COSTA, J.A.S.; RAMALHO, M. Biologia reprodutiva de espécies simpátricas de Malpighiaceae em dunas costeiras da Bahia, Brasil. **Rev. Bras. Bot.**, v.29, n.1, p.103-114, 2006.

- DANDI, N.D.; DANDI, B.N.; CHAUDHARI, A.B. Bioprospecting of thermo- and osmo-tolerant fungi from mango pulp-peel compost for bioethanol production. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v. 103, n. 4, p. 723-736, 2013.
- DANIEL, H. et al. *Starmerella neotropicalis* f. a., sp. nov., a yeast species found in bees and pollen. . **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**,v.63, p.3896–3903, 2013.
- DAYO-OWOYEMI, I. et al.; *Wickerhamiella kiyanii* f.a., sp. nov. and *Wickerhamiella fructicola* f.a., sp. nov., two yeasts isolated from native plants of Atlantic rainforest in Brazil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 64, p. 2152–2158, 2014.
- de HOOG, G.S.; GUÉHO, E. Deoxyribonucleic acid base composition and taxonomy of *Moniliella* and allied genera. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v. 50, n. 2, p. 135-41, 1984.
- de Ponzzes-Gomes, C.M. et al. *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts in grape varieties of the São Francisco Valley. **Braz. J. Microbiol.**, v. 45, n. 2, p. 411-416, 2014.
- DE VEGA C.; HERRERA, C.M. Relationships among nectar-dwelling yeasts, flowers and ants: patterns and incidence on nectar traits. **Oikos**, v. 11, p. 1878-1888, 2012.
- DE VEGA, C. et al. *Metschnikowia proteae* sp. nov., a nectarivorous insect-associated yeast species from Africa. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.62, p.2538–2545, 2012.
- DE VEGA, C. et al. *Metschnikowia drakensbergensis* sp. nov. and *Metschnikowia caudata* sp. nov., endemic yeasts associated with *Protea* flowers in South Africa. . **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 64, p. 3724–3732, 2014.
- DEL MÓNACO, S.M.; RODRÍGUEZ, M.E.; LOPES, C.A. *Pichia kudriavzevii* as a representative yeast of North Patagonian winemaking terroir. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 230, p. 31-39, 2016.
- DRUMONDE-NEVES, J. et al. Yeast Biodiversity in Vineyard Environments Is Increased by Human Intervention. **PLoS One.**, v. 11, n. 8, 2016.
- EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.
- FACCHIN, S. Yeasts and hygienic-sanitary microbial indicators in water buffalo mozzarella produced and commercialized in Minas Gerais, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 44, n. 3, p.701-7, 2014.
- FERNÁNDEZ MAURA, Y. et al. The environmental and intrinsic yeast diversity of Cuban cocoa bean heap fermentations. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 16, p. 233:34-43, 2016.
- FIERER, N. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 7059–7066, 2007.

FREITAS, L. F. D. de. **Comunidades de leveduras associadas a cactáceas de ecossistemas de cerrado e restinga**. 2014. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FREITAS, L. F. D. et al. *Kodamaea transpacificica* fa, sp. nov., a yeast species isolated from ephemeral flowers and insects in the Galápagos Islands and Malaysia: further evidence for ancient human transpacific contacts. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 63, n.11, p. 4324-4329, 2013.

FUENTEFRIA, A.M. *Trichosporon insectorum* sp. nov., a new anamorphic basidiomycetous killer yeast. **Mycol Res.**, v. 112, n.1., p. 93-99, 2008.

GADANHO, M.; ALMEIDA, J.M.; SAMPAIO, J.P. Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v. 84, n. 3, p.17-27, 2003.

GADANHO, M.; LIBKIND, D.; SAMPAIO, J.P. Yeast diversity in the extreme acidic environments of the Iberian Pyrite Belt. **Microb. Ecol.** v. 52, n.3, p. 552-63, 2006.

GANTER, P. F. Yeast and invertebrate associations. In: **Biology and Ecophysiology of Yeasts**. Springer Berlin Heidelberg, 2006, p. 303-370.

GIESE, S.O.K. **Estudo da composição química dos óleos florais de *Byrsonima brachybotrya* (Malpighiaceae)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná.

GIMÉNEZ-JURADO, G. et al. *Metschnikowia vanudenii* sp. nov. and *Metschnikowia lachancei* sp. nov., from flowers and associated insects in North America. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.53, p.1665–1670, 2003.

GKATZIONIS, K. Diversity and activities of yeasts from different parts of a Stilton cheese. **Int. J. Food Microbiol.** v. 177, p.109-116, 2014.

GOOGLE MAPS. [Araguatins, Tocantins]. [2017]. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/place/Araguatins+-+TO/@-5.6424481,48.3892758,10z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x92c4d8f08ae4a855:0xf38c6d4991869156!8m2!3d-5.6484113!4d-48.1193893>>. Acesso em:12/04/17

GOMES, R. P. **Fruti. Brasileira**. 13. ed. São Paulo: Nobel, 2007. 446 p.

GORENSTEIN, M. R. **Métodos de Amostragem no Levantamento da Comunidade Arbórea em Floresta Estacional Semidecidual**. 2002. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

GOTELLI, N. J.; CHAO, A.; LEVIN, S. Measuring and estimating species richness, species diversity, and biotic similarity from sampling data. **Encycl. of biod.**, v. 5, p. 195- 211, 2013.

GRÜNDER, S. et al. Mycological examinations on the fungal flora of the chicken comb. **Mycoses**, v.48, n.2, p.114-119, 2005.

- GUREVITCH, J., SCHEINER, S. M.; GORDON, A. **Ecol. vegetal.** 2 ed. Fox, 2009. p.212-217.
- GUTIERREZ, R. M. P.; FLORES, J. M. M. Effect of chronic administration of hexane extract of *Byrsonima crassifolia* seed on β -cell and pancreatic oxidative parameters in streptozotocin-induced diabetic rat. **Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.**, v.11, n.2, p. 231-236, 2014.
- HAMBY, K. A. et al. Associations of yeasts with spotted-wing drosophila (*Drosophila suzukii*; Diptera: Drosophilidae) in cherries and raspberries. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, p. 4869–4873, 2012.
- HAN, S.M. et al. Isolation and Identification of Yeasts from Wild Flowers Collected around Jangseong Lake in Jeollanam-do, Republic of Korea, and Characterization of the Unrecorded Yeast *Bullera coprosmaensis*. **Mycobiology.** v. 43, n. 3, 2015.
- HELLSTRÖM, A.M. et al. Biodiversity and phytase capacity of yeasts isolated from Tanzanian togwa. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 136, p. 352–358, 2010.
- HERRERA, C. M. Population growth of the floricolous yeast *Metschnikowia reukaufii*: effects of nectar host, yeast genotype, and host x genotype interaction. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 88, p. 250–257, 2014.
- HERRERA, C. M.; GARCÍA, I. M.; PÉREZ, R. Invisible floral larcenies: microbial communities degrade floral nectar of bumble bee-pollinated plants. **Ecology**, v.89, n. 9, p. 2369–2376, 2008.
- HERRERA, C. M.; POZO, M. I. ; BAZAGA, P. Clonality, genetic diversity and support for the diversifying selection hypothesis in natural populations of a flower-living yeast. **Mol. Ecol.**, v. 20, p.4395–4407, 2011.
- HERRERA, C. M.; POZO, M. I. Nectar yeasts warm the flowers of a winter-blooming plant. **Proceed. Royal S. B.**, v. 277, p.1827–1834, 2010.
- HERRERA, C. M.; POZO, M. I.; MEDRANO, M. Yeasts in nectar of an early-blooming herb: sought by bumble bees, detrimental to plant fecundity. **Ecology**, v. 94, n. 2, p. 273–279, 2013.
- HERRERA, C.M. et al. Inhospitable sweetness: nectar filtering of pollinator-borne inocula leads to impoverished, phylogenetically clustered yeast communities. **Proc. Biol. Sci.**, v. 277, p. 747–754, 2010.
- HERRERA, C.M. et al. Yeasts in floral nectar: a quantitative survey. **Ann. Bot.**, v. 103, p.1415–1423, 2009.
- HERRERA-RUIZ, M. et al. Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytomedicine**, v.18, p.1255–1261, 2011.
- HERZBERG, M.; FISCHER, R.; TITZE, A. Conflicting results obtained by RAPD-PCR and large-subunit rDNA sequences in determining and comparing yeast strains isolated from flowers: a comparison of two methods. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 52, p. 1423-1433, 2002.

- HIERRO, N. Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast population during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration. **FEMS Yeast Res.**, v.6, p. 102–111, 2006.
- HITTINGER, C. T. et al. For the “Genomes and Evolution” Special Issue of Current Opinion in Genetics and Development. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 35, p. 100–109, 2015.
- HONG, S. G. et al. *Metschnikowia koreensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from flowers in Korea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, n.5, p.1927-31, 2001.
- IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Araguatins**. 2014. Disponível em:<<http://cod.ibge.gov.br/23B1S>>. Acesso em: 23 jul. 2015.
- JAMES, S.A. et al. *Saturnispora quitensis* sp. nov., a yeast species isolated from the Maquipucuna cloud forest reserve in Ecuador. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 61, p. 3072–3076, 2011.
- JEYA, M. et al. Isolation of a novel high erythritol-producing *Pseudozyma tsukubaensis* and scale-up of erythritol fermentation to industrial level. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 83, p.225–231, 2009.
- JINDAMORAKOT, S. et al. Three new species of bipolar budding yeasts of the genus *Hanseniaspora* and its anamorph *Kloeckera* isolated in Thailand. **FEMS Yeast Res**, v. 9, p.1327–1337, 2009.
- JINDAMORAKOT, S. et al. *Yamadazyma insecticola* f.a., sp. nov. and *Yamadazyma epiphylla* f.a., sp. nov., two novel yeast species. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.65, p.1290–1296, 2016.
- KANPIENGJAI, A. et al. Distribution of tannin-tolerant yeasts isolated from Miang, a traditional fermented tea leaf (*Camellia sinensis* var. *assamica*) in northern Thailand. **Int. J. Food Microbiol.** v. 238, p. 121-131, 2016.
- KOBAYASHI, Y. et al. Erythritol production by *Moniliella megachiliensis* using nonrefined glycerol waste as carbon source. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, p. 475-480, 2015.
- KOBAYASHI, Y. et al. Metabolic correlation between polyol and energy-storing carbohydrate under osmotic and oxidative stress condition in *Moniliella megachiliensis*. **J. of Biosci. and Bioeng.**, v. 120, n. 4, p. 405–410, 2015.
- KOLEFF, P.; GASTON, K. J.; LENNON, J. J. Measuring beta diversity for presence–absence data. **J. of Animal Ecol.**, v. 72, n. 3, p. 367-382, 2003.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Mol. Biol. And Biology Evol.**, v. 33, n.7, p. 1870-1874, 2016.
- KURTZMAN, C. P. et al. Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways. **FEMS Yeast Res.**, v.15, 2015.

KURTZMAN, C. P. Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 64, p. 325–332, 2014.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. (Eds). **The yeasts, a taxonomic study**, 5 ed. Amsterdam: Elsevier, 2011.

LABBANI, F. K. et al. A novel killer protein from *Pichia kluyveri* isolated from an Algerian soil: purification and characterization of its in vitro activity against food and beverage spoilage yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v. 107, p. 961–970, 2015.

LACERDA, I.C. et al. Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. **Int. J. Food Microbiol.** v. 105, n. 2, p.213-219, 2005.

LACHANCE, M. A. et al. *Metschnikovia continentalis* var. *borealis*, *Metschnikowia continentalis* var. *continentalis* and *metschnikowia hibisci*, new heterotalic haploid yeasts from ephemeral flowers and associated insects. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 43, p. 368-373, 1998c.

LACHANCE, M. A. et al. *Metschnikowia cubensis* sp. nov., a yeast species isolated from flowers in Cuba. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 58, p. 2955-2961, 2008.

LACHANCE, M. A. et al. Spatial scale, genetic structure, and speciation of hawaiian endemic yeasts. **Pacific Sci.**, v. 70, n. 4, p. 389-408, 2016.

LACHANCE, M. A.; BOWLES, J. M. *Metschnikowia arizonensis* and *Metschnikowia dekortorum*, two new large-spored yeast species associated with floricolous beetles. **FEMS Yeast Res.**, Amsterdam, v. 2, p. 81-86, 2002.

LACHANCE, M. A.; BOWLES, J. M.; STARMER, W. T. *Metschnikowia santaceciliae*, *Candida hawaiiiana*, and *Candida kipukae*, three new yeast species associated with insects of tropical morning glory. **FEMS Yeast Res.**, v. 3, p. 97–103, 2003.

LACHANCE, M. A; FEDOR, A. N. Catching speciation in the act: *Metschnikowia bowlesiae* sp. nov., a yeast species found in nitidulid beetles of Hawaii and Belize. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v.105, p. 541–550, 2014.

LACHANCE, M.A. et al. Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. **FEMS Yeast Res.** v.1, p.1-8, 2001.

LACHANCE, M.A. et al. *Candida cleridarum*, *Candida tilneyi*, and *Candida powellii*, three new yeast species isolated from insects associated with flowers. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.296, 2000.

LACHANCE, M.-A. et al. *Candida ipomoeae*, a new yeast species related to larged-spored *Metschnikowia* species. **Can. J. Microbiol.**, v. 44, n. 8, p. 718-722, 1998.

LACHANCE, M.A. et al. *Wickerhamiella australiensis*, *Wickerhamiella cacticola*, *Wickerhamiella occidentalis*, *Candida drosophilae* and *Candida lipophila*, five new related yeast species from flowers and associated insects. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.48, p.1431-1444, 1998b.

LACHANCE, M.A. Yeast biodiversity: how many and how much? In: ROSA, C.A.; PETER, G. (Eds). **Biod. and Ecophysiol. of yeasts**. Berlin: Springer, 2006. p. 1–9.

LACHANCE, M.A. Yeasts. In: *eLS*. Chichester, South-East England: John Wiley & Sons, 2011. p. 1-12.

LACHANCE, M.A.; BOWLES, J.M.; STARMER, W.T. Geography and niche occupancy as determinants of yeast biodiversity: the yeast-insect-morning glory ecosystem of Kipuka Puauu, Hawai'i. **FEMS Yeast Res.**, v. 4 p.105-111, 2003.

LACHANCE, M.A.; STARMER, W.T.; BOWLES, J.M. The yeast community of morning glory and associated drosophilids in a Hawaiian kipuka. **Yeast**, v. 5, p. 501-504, 1988.

LANDELL, M.F. et al. *Candida aechmeae* sp. nov. and *Candida vrieseae* sp. nov., novel yeast species isolated from the phylloplane of bromeliads in Southern Brazil. . **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 60, p. 244-248, 2010.

LANDELL, M.F. et al. *Hannaella pagnoccae* sp. nov., a tremellaceous yeast species isolated from plants and soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 64, n.6, p.1970-1977, 2014.

LAS HERAS-VAZQUEZ, F.J. et al. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. **FEMS Yeast Res.**, v. 3, n. 1, p. 3-9, 2003.

LEE, D.H. et al. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel erythrose reductase from *Candida magnoliae* JH110. **Microb Cell Fact**, v 9, p.43, 2010.

LEVENTDURUR, S. et al. Yeast biota of naturally fermented black olives in different brines made from cv. Gemlik grown in various districts of the Cukurova region of Turkey. **Yeast**, v. 33, n. 7, p. 289-301, 2016.

LIECKFELDT, E.; MEYER W FAU - BORNER, T.; BORNER, T. (1993). Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. n. 0233-111X (Print), 19940202 DCOM- 19940202.

LIEVENS, B. et al. Microbiology of sugar-rich environments: diversity, ecology and system constraints. **Envirom. Microbiol.**, 2014.

LIMA, J. R.. et al. Isolation, identification and activity *in vitro* of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. **J. of Basic Microbiol.**, v. 52, p. 1–10, 2012.

LIMTONG, S. Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 30, n. 6, p.1785–1796, 2014.

LIN, S.J. et al. High-level production of erythritol by mutants of osmophilic *Moniliella* sp. **Process Biochem.**, v. 45, p. 973–979, 2010.

- LIU, X.Z. et al. Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses. **Stud. Mycol.**, v. 81, p.1-26, 2015b.
- LIU, X.Z. et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. . **Stud. Mycol.**, v. 81, p.85-147, 2015a.
- LOGUERCIO-LEITE, C.; ESPOSITO, E. Fungos: estrutura e ultra-estrutura. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul, RS: EDUCS, 2004, p. 15-44.
- LOPES, M. R. et al. *Yamadazyma riverae* sp. nov., a yeast species isolated from plant materials. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 65, p. 4469–4473, 2015.
- LORENZI, H.; **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v.31, 2009. p. 190.
- LUCION, F. B. **Isolamento, identificação e caracterização de leveduras do mirtilo**. 2015. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- LUDWIG, J. A.; REYNOLDS, J. F. **Statistical ecology: a primer on methods and computing**. John Wiley & Sons, **New Sons**, New York, 1988.
- MACIEL, N.O. et al. The diversity and antifungal susceptibility of the yeasts isolated from coconut water and reconstituted fruit juices in Brazil. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 160, n. 3, p. 201-5, 2013.
- MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. Chapman and Hall, London, 1998. 179p.
- MAKSIMOVA, A. et al. Yeast Communities of *Formica aquilonia* Colonies. **Mikrobiologija**. v. 85, n.1, p.100-106, 2016.
- MALDINI, M. et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. **J. Ethnopharmacol.**, v.122, p.430–433, 2009.
- MAMBUSCAY, M. L. A. et al. Identificación de las levaduras nativas presentes en zumos de piña, mora y uva. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**. Ed. Especial. n. 2, p. 136-144, 2013.
- MARTINEZ-VASQUEZ, M. et al. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K.J. **Ethnopharmacol.**, v. 66, p. 79–82, 1999.
- MARTINS, F. R. **Atributos de comunidades vegetais**. Quid Teresina, v. 9, p. 12-17, 1991.
- MAŠÍNOVÁ, T. et al. Drivers of yeast community composition in the litter and soil of a temperate forest. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 93, n. 2, 2017.
- MAUTONE, J. N. **Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de folhas de figueiras do Parque de Itapuã, RS, Brasil**.

2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre.

MITTELBACH, M. et al. Inoculation order of nectar-borne yeasts opens a door for transient species and changes nectar rewarded to pollinators. **Fungal Ecol.**, 2016.

MITTELBACH, M. et al. Nectar sugars and bird visitation define a floral niche for basidiomycetous yeast on the Canary Islands. **BMC Ecology**, v. 15, n. 2, 2015.

MOLLER, L.; LERM, B.; BOTHA, A. Interactions of arboreal yeast endophytes: an unexplored discipline. **A. Botha. Ecology**, v. 22, p. 73-82, 2016.

MOON, H.J. et al. Biotechnological production of erythritol and its applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 86, n. 4, p. 1017–1025, 2010.

MORAIS, P. B. et al. Yeast succession in the amazon fruit *Parahancornia amapa* as a resource partitioning among *Drosophila* spp. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 61, p. 4251-4257, 1995a.

MORAIS, P. B.; PAGNOCCA, F.C. ROSA, C.A. Yeast communities in tropical rain forests in Brazil and other South American ecosystems. In: **Biology and Ecophysiology of Yeasts**. Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 461-484.

MORAIS, P.B. et al. Yeasts associated with *Drosophila* in tropical forests of Rio de Janeiro, Brazil. **Can. J. Microbiol.**, v. 38, n. 11, p.1150-1155, 1992.

MORAIS, P.B. et al. Yeast communities as descriptors of habitat use by the *Drosophila fasciola* subgroup (repleta group) in Atlantic rain forests. **Oecologia**, v. 104, p. 45–51, 1995b.

MORAIS, P.B.; LACHANCE, M.-A.; ROSA, C.A. *Saturnispora hagleri* sp. nov., a yeast species isolated from *Drosophila* flies in Atlantic Rain Forest in Brazil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 55, p. 1725–1727, 2005.

MORAIS, P.B.; ROSA, C.A. Interações entre *Drosophila* e leveduras em ambientes tropicais. In: MARTINS, R.P.; LEWINSOHN, T.M.; BARBEITOS, M.S. (eds) **Ecologia e comportamento de insetos**. Oecologia Brasiliensis VIII. Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, 2000.

MORALES, C., GOMEZ-SERRANILLOS, M.P., IGLESIAS, I., VILLAR, A.M., CÀCERES, A. Preliminary screening of five ethnomedicinal plants of Guatemala. **II Farmaco**, v.56, p.523–526, 2001.

MUGULA, J.K. et al. Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 80, n.3, p. 187-99, 2003.

N'GUESSAN, K.F. et al. Identification of yeasts during alcoholic fermentation of tchapalo, a traditional sorghum beer from Côte d'Ivoire. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v. 99: 855-864, 2011.

NAKAYAMA, M. et al. Development of Rapid Identification and Risk Analysis of *Moniliella* spp. in Acidic Processed Foods. **Biocontrol Sci.**, v. 21, n. 2, p. 73-80, 2016.

- NASANIT, R. et al. Assessment of epiphytic yeast diversity in rice (*Oryza sativa*) phyllosphere in Thailand by a culture-independent approach. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v. 107, n. 6, p. 1475-1490, 2015a.
- NASANIT, R. et al. The assessment of epiphytic yeast diversity in sugarcane phyllosphere in Thailand by culture-independent method. **Fungal Biol.** v. 119, n. 12, p. 1145-57, 2015b.
- NASANIT, R. et al. Yeast diversity and novel yeast D1/D2 sequences from corn phylloplane obtained by a culture-independent approach. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v. 109, n. 12, p. 1615-1634, 2016.
- NGUYEN, N.H.; SUH, S.; BLACKWELL, M. Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from Neuroptera and other insects. **Mycologia**, v.99, n.6, p.842-858, 2007.
- NICOLSON, S.W., THORNBURG, R.W. Nectar chemistry. In: NICOLSON, S.W.; NEPI, M.; PACINI, E. (Eds). **Nectaries and nectar**. Berlin: Springer, 2007, p.215–264.
- NYLANDER, J. A. A. MrModeltest. Versão 2.3. Programa distribuído pelo autor. Centro de Biologia Evolucionária, Universidade de Uppsala, 2004.
- O'DONNELL, K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds, D.R.; Taylor, J.W. (Eds). **The Fungal Holomorph: mitotic, meiotic e pleomorphic speciation and fungal systematics**, Wallingford, U. K.: CAB International, 1993, p. 225-233.
- OKSANEN, J. et al. Vegan: community Ecology Package. R Package 2.0. 3. 2012.
- OLIVEIRA, E.S. et al. The production of volatile compounds by yeasts isolated from small Brazilian cachaça distilleries. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 21, p. 1569 –1576, 2005.
- OLIVEIRA, J. V. de C. *Pseudozyma brasiliensis* sp. nov., a xylanolytic, ustilaginomycetous yeast species isolated from an insect pest of sugarcane roots. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.64, p. 2159–2168, 2014.
- ORLANDI, L. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the stem bark of *Byrsonima intermedia* A. Juss. **J. Ethnopharmacol.**, v.137, p. 1469– 1476, 2011.
- OSORIO-CADAVID, E. et al. Detection and identification of wild yeasts in Champús, a fermented Colombian maize beverage. **Food Microbiol.**, v. 25, n. 6, p. 771-771, 2008.
- PAGANI, M. D. et al. *Papiliotrema leoncinii* sp. nov. and *Papiliotrema miconiae* sp. nov., two tremellaceous yeast species from Brazil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 66, n.4, p.1799-806, 2016.
- PARK, Y.C. et al. Proteomics and physiology of erythritol-producing strains. **J. Chromatogr. B.**, v.815, p.251–260, 2005.
- PERAZA-SÁNCHEZ, S.R. et al. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. **Fitoterapia**, v. 78, p.315–318, 2007.

- PEREIRA, G. V. de M. et al. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. **Inter. J. Food Microbiol.**, v. 188, p. 60–66, 2014.
- PEREIRA, J. O. P.; FREITAS, B. M. Estudo da biologia floral e requerimentos de polinização do muricizeiro (*Byrsonima crassifolia* L.). **Rev. C. Agron.**, v. 33, n. 2, p. 5-12, 2002.
- PERKO, R.; DECOCK, P. Erythritol. In: MITCHELL, H. (Ed). **Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2007. p. 151–176.
- PIMENTA, R.S. et al. Yeast communities in two Atlantic rain Forest fragments in Southeast Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 40, p.90-95, 2009.
- PIMENTEL, M. R. et al. *Candida riodecensis* and *Candida cellae*, two new yeast species from the *Starmerella* clade as sociated with solitary bees in the Atlantic rain forest of Brazil. **FEMS Yeast Res.**, v. 5, p.875-879, 2005.
- POZO, M. I. et al. The impact of nectar chemical features on phenotypic variation in two related nectar yeasts. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 91, 2015.
- POZO, M. I.; HERRERA, C. M.; BAZAGA, P. Species richness of yeast communities in floral néctar of Southern Spanish plants. **Microbial Ecol.**, v. 61, n.1, p.82-91, 2011.
- POZO, M.I.; LACHANCE, M-A.; HERRERA, C. Nectar yeasts of two southern Spanish plants: the roles of immigration and physiological traits in community assembly. **FEMS Microbiol. Ecol.**, p.1–13, 2011.
- QIN, H. et at. Microbial Diversity and Biochemical Analysis of Suanzhou: A Traditional Chinese Fermented Cereal Gruel. **Front. Microbiol.**, v. 7, p. 1311, 2016.
- RAMALHO, M.; SILVA, M. Flora oleífera e sua guilda de abelhas em uma comunidade de restinga tropical. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v.2, n.1, p.34-43, 2002.
- RAMBAUT, A. FigTree. Versão 1.4.0., 2012. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Acesso em: 20/10/2017.
- RAMIREZ, A.M.; COTERA, L.B.F; GUTIERREZ, R.M.P. Anti-inflammatory activity of the hexane extract of *Byrsonima crassifolia* seeds in experimental animal models. **Altern. Therap.**, v. 19, n.1, 2013.
- RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; MENDES, S. D. C.; VALENTE, P. South Brazilian wines: culturable yeasts associated to bottled wines produced in Rio Grande do Sul and Santa Catarina. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 33, p.77, 2017.
- RAMOS, C.L. et al. Microbiological and chemical characteristics of tarubá, an indigenous beverage produced from solid cassava fermentation. **Food Microbiol.**, v. 49, p. 182-188, 2015.
- RATTER, J. A.; DARGIE, T. C. D. An analysis of the floristics composition of 36 cerrado areas in Brazil. **Edinburgh J. Bot.**, v. 49, p. 235-250, 1992.

RAYMOND EDER, M.L. et al. Isolation and Identification of the Indigenous Yeast Population during Spontaneous Fermentation of Isabella (*Vitis labrusca* L.) Grape Must. **Front. Microbiol.**, v. 8, p.532, 2017.

REGO, M. M. C. et al. da Biologia de Nidificação de *Centris flavifrons* (Friese) (Hymenoptera: Apidae, Centridini), um dos principais polinizadores do murici (*Byrsonima crassifolia* L. Kunth, Malpighiaceae), no Maranhão. **Neot. Entomology**, v.35, n.5, p.579-587, 2006.

REN, Y. et al. *Candida baotianmanensis* sp. nov. and *Candida pseudoviswanathii* sp. nov., two ascosporic yeast species isolated from the gut of beetles. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 65, p. 3580–3585, 2015.

REYES, M. E.; ROHRBACH, K. G.; PAULL, R. E. Microbial antagonists control postharvest black roto f pineapple fruit. **Postharvest Biol. Technol.**, v.33, p. 193-203, 2004.

REZENDE, C. M.; FRAGA, S. R. Chemical and aroma determination of the pulp and seeds of murici (*Byrsonima crassifolia* L.). **J. Braz. Chemistry Soc.**, v. 14, n. 3, p. 425-428, 2003.

RIBEIRO, E. K. M. D.; RÊGO, M. M. C.; MACHADO, I. C. S. 2008. Cargas polínicas de abelhas polinizadoras de *Byrsonima chrysophylla* Kunth. (Malpighiaceae): fidelidade e fontes alternativas de recursos florais. **Act. Bot. Bras.**, v. 22, n. 1, p. 165-171, 2008.

RILEY, R. et al. Comparative genomics of biotechnologically important yeasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v. 35, p. 9882-9887, 2016.

RIVERO-CRUZ, J. F. et al. Antibacterial compounds isolated from *Byrsonima crassifolia*. **Rev. Latinoamer. Quím.**, v. 37, n. 2, p. 155-163, 2009.

RODRIGUES, A. et al. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungus garden pathogens of leafcutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v. 96, p. 331–342, 2009.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572–1574, 2003.

ROSA, C.A. et al. *Candida azymoides* sp. n., a yeast species from tropical fruits and larva (Ascomycota) of *Anastrepha mucronota* (Diptera: Tephritidae). **Lundiana**, v. 7, p. 83–86, 2006.

ROSA, C. A. et al. *Metschnikowia cerradonensis* sp. nov., a yeast species isolated from ephemeral flowers and their nitidulid beetles in Brazil. **Inter. J. Systmatic Evol. Microbiol.**, v.57, p.161-165, 2007a.

ROSA, C. A. et al. Synonymy of the yeast genera *Moniliella* and *Trichosporonoides* and proposal of *Moniliella fonsecae* sp. nov. and five new species combinations. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.59, p. 425–429, 2009.

ROSA, C. A. et al. Yeast communities associated with different plant sandy coastal plains of southeastern Brazil. **Mycol. Res.**, v.99, n. 9, p.1047-1054, 1995.

ROSA, C.A. et al. Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Res.**, v.4, n.3, p.271-275, 2003.

- RUIVO, C.C.C. **Ocorrência de leveduras em espécies vegetais nativas da mata atlântica, Parque Estadual da Serra do Mar-Núcleo Picinguaba, São Paulo**. 2005. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Instituto de Biociências, Rio Claro.
- RUIZ-MOYANO, S. et al. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. **Food Microbiol.**, v. 57, p.45-53, 2016.
- RYMOWICZ, W.; RYWINSKA, A.; MARCINKIEWICZ, M. High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnol Lett.**, v.31, p.377–380, 2009.
- SANTOS, A. R. de O. **Moniliella spp. e outras leveduras osmotolerantes isoladas de nectários de flores tropicais**. 2015. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SANTOS, A.R. DE O. et al. The expanding large-spored Metschnikowia clade: *Metschnikowia matae* sp. nov., a yeast species with two varieties from the Brazilian Atlantic Forest. **Antonie van Leeuwenhoek.**,v. 108, n.3, p.753-63, 2015.
- SARANA, S. et al. High production of erythritol from *Candida sorbosivorans* SSE-24 and its inhibitory effect on biofilm formation of *Streptococcus mutans*. **Biores. Tec.**, v. 198, p. 31–38, 2015.
- SAVERGAVE, L.S. et al. Strain improvement and statistical media optimization for enhanced erythritol production with minimal by-products from *Candida magnoliae* mutant R23. **Biochem. Eng. J.**, v.55, p.92–100, 2011.
- SAWADA, K. et al. Key role for transketolase activity in erythritol production by *Trichosporonoides megachiliensis* SN-G42. **J. Biosci Bioeng.**, v. 108, p.385–390, 2009.
- SENSES-ERGUL, S. et al. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 108, n. 1, p.120-124, 2006.
- SEPLAN-Secretaria do Planejamento e Meio Ambiente do Tocantins. Diretoria de Zoneamento Ecológico-Econômico. **Atlas do Tocantins: Subsídios ao planejamento da gestão territorial**. Palmas: SEPLAN. 2008, 49 p.
- SIGRIST, M.R.; SAZIMA, M. 2004. Pollination and reproductive biology of twelve species of neotropical Malpighiaceae: stigma morphology and its implications for the breeding system. **Ann. Bot.**, v. 94, p. 33-41.
- SIGUEMOTO, E. S. **Composição nutricional e propriedades funcionais do murici (*Byrsonima crassifolia*) e da moringa (*Moringa oleifera*)**, São Paulo. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo.
- SILVA, E.M. et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v.101, p.1012–1018, 2007.
- SILVA-BEDOYA, LM.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; OSORIO-CADAVID, E. Yeast diversity associated to sediments and water from two Colombian artificial lakes. **Braz. J. Microbiol.**, v. 45, n. 1, p. 135-42, 2014.

SIPI CZKI M. *Pichia bruneiensis* sp. nov., a novel biofilm producing dimorphic yeast species isolated from flowers in Borneo. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2012b.

SIPI CZKI, M. *Candida borneonana* sp. nov., a methanol-assimilating anamorphic yeast isolated from decaying fruit. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 62, p. 2303–2306, 2012a.

SIPI CZKI, M. Detection of yeast species also occurring in substrates associated with animals and identification of a novel dimorphic species in *Verbascum* flowers from Georgia. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v.103, p.567–576, 2013a.

SIPI CZKI, M. Dimorphic cycle in *Candida citri* sp. nov., a novel yeast species isolated from rotting fruit in Borneo. **FEMS Yeast Res.**, v.11, p. 202–208, 2011.

SIPI CZKI, M. *Metschnikowia laotica* f.a., sp. nov., a dimorphic, pigment-producing yeast species isolated from fruit. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.64, p.1847–1852, 2014.

SIPI CZKI, M. *Starmerella caucasica* sp. nov., a novel anamorphic yeast species isolated from flowers in the Caucasus. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v.59, 67-73, 2013b.

SOUZA, J.N.S. et al. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: a correlation study using chemical and biological in vitro assays. **Food Chem.**, v.106, p.331–339, 2008.

SPENCER, D. M. et al. Yeasts associated with rotting citrus fruit in Tucumán, Argentina. **Mycol. Res.**, Cambridge, v. 96, p. 891-892, 1992.

SPERANDIO, E. M.; VALE, H. M. M.; MOREIRA, G. A. M. Yeasts from native Brazilian Cerrado plants: Occurrence, diversity and use in the biocontrol of citrus green mould. **Fungal Biol.**, v.119, p. 984 - 993, 2015.

SPERANDIO, E.M. **Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a plantas do cerrado.** 2012. 90f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade de Brasília. Departamento de Fitopatologia, Instituto de Ciências Biológicas, Brasília.

STAMPS, J. A. et al. *Drosophila* Regulate Yeast Density and Increase Yeast Community Similarity in a Natural Substrate. **PLoS One.** v.7, n.7, 2012.

STARMER, W.T.; LACHANCE M.A. Yeast Ecology. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. (Eds). **The yeasts, a taxonomic study**, v.1, 5 ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. p.65-83.

STEHMANN, J. R.; **Guia ilustrado do arboreto do Cerrado da Companhia Brasileira de Metalúrgica e Mineração- CBMM.** Belo Horizonte: Editora UFMG, 2012. 154 p.

STEVENSON, K. J. 2010. OriginPro — data analysis and graphing software. Version 8.5. [Accessed 10 May 2017.] Available from URL: [http:// www.originlab.com/origin](http://www.originlab.com/origin)

STOLK, A. C.; DAKIN, J. C. *Moniliella*, a new genus of Moniliales. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 32, p. 399–409, 1966.

- STOLL, M.; BEGEROW, D.; OBERWINKLER, F. Molecular phylogeny of *Ustilago*, *Sporisorium*, and related taxa based on combined analyses of rDNA sequences. **Mycol Res.**, v. 109, n. 3, p. 342-56, 2005.
- ŠTORNÍK, A.; SKOK, B.; TRČEK, J. Comparison of Cultivable Acetic Acid Bacterial Microbiota in Organic and Conventional Apple Cider Vinegar. **Food Technol Biotechnol.**, v. 54, n.1, p.113-119, 2016.
- SUGIYAMA, J. et al. *Sympodiomyopsis*: a new yeast-like anamorph genus with basidiomycetous nature from orchid nectar. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v.59, n.2, p.95-108, 1991.
- SUH, S. et al. Proposal of *Zygosaccharomyces parabailii* sp. nov. and *Zygosaccharomyces pseudobailii* sp. nov., novel species closely related to *Zygosaccharomyces bailii*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 63, p. 1922–1929, 2013
- SUH, S-O.; NGUYEN, N.H.; BLACKWELL, M. A yeast clade near *Candida kruisii* uncovered: nine novel *Candida* species associated with basidioma-feeding beetles. **Mycol Res.**, v. 110, p. 1379–1394, 2006.
- SUH, S-O.; NGUYEN, N.H.; BLACKWELL, M. A. Nine new *Candida* species near *C. membranifaciens* isolated from insects. **Mycol. Res.**, v. 109, p. 1045–1056, 2005.
- SUH, S-O.; GIBSON C.M.; BLACKWELL, M. *Metschnikowia chrysoperlae* sp. nov., *Candida picachoensis* sp. nov. and *Candida pimensis* sp. nov., isolated from the green lacewings *Chrysoperla comanche* and *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 54, p. 1883–1890, 2004.
- SURUSSAWADEE, J. *Papiliotrema siamense* f.a., sp. nov., a yeast species isolated from plant leaves. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 64, n. 9, 2014.
- TAKASHIMA, M.; NAKASE, T. *Tilletiopsis deroxii*, *Tilletiopsis oryzicola* and *Tilletiopsis penniseti*, three new species of the ustilagionomycetous anamorphic genus *Tilletiopsis* isolated from leaves in Thailand. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v. 80, n. 1, p. 43-56, 2001.
- THANH, V. N. et al. *Moniliella carnis* sp. nov. and *Moniliella dehoogii* sp. nov., two novel species of black yeasts isolated from meat processing environments. **Inter. J. of Syst. Evol. Microbiol.**, v. 62, p. 3088-3094, 2012.
- THANH, V.N.; HIEN, D.D.M.; THOM, T.T. *Moniliella byzovii* sp. nov., a chlamydospore forming black yeast isolated from flowers. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 63, p.1192-1196, 2013.
- TRINDADE, R. C. et al. *Candida sergipensis*, a new asexual yeast species isolated from frozen pulps of tropical fruits. **Antonie van Leeuwenhoek.**, Amsterdam, v. 86, n.1, p.27-32, 2004.
- TRINDADE, R.C. et al. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. **Syst. Appl. Microbiol.** v.25, n. 2, p. 294-300, 2002.

- URBINA, H.; SCHUSTER, J.; BLACKWELL, M. The gut of Guatemalan passalid beetles: a habitat colonized by cellobiose- and xylose-fermenting yeasts. **Fungal Ecol.** v.6, p.339–355, 2013.
- VALE, H. M. M. **Diversidade de leveduras endofíticas e epifíticas em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.) e sucessão durante a seca natural.** 2009. 88f. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- VINSON, S.B. et al. Floral lipid chemistry of *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae) and a use of floral lipid by *Centris* bees (Hymenoptera: Apidae). **Biotropica**, v. 29, n.1, p.76-83, 1997.
- VOGEL, S. **Flower offering fatty oil instead of nectar.** Prox. XI Intl. Bot. Congress, Seattle, 1969.
- WANG, C. et al. *Metschnikowia persici* sp. nov., A novel protease-producing yeast species from. **Curr. Microbiol.**, v.74, p. 365–370, 2017.
- WANG, C.; LIU, Y. Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang, China. **Food Microbiol.**, v. 33, p. 172-177, 2013.
- WANG, H. et al. Characterization of Osmotolerant Yeasts and Yeast-Like Molds from Apple Orchards and Apple Juice Processing Plants in China and Investigation of Their Spoilage Potential. **J Food Sci.**, v. 80, n. 8, 2015.
- WANG, Q. M. et al. Moniliellomycetes and Malasseziomycetes, two new classes in Ustilaginomycotina. **Persoonia**, v. 33, p. 41–47, 2014.
- WEHNER, J. et al. Specialist nectar-yeasts decline with urbanization in Berlin. **Sci. Rep.**, v. 7, 45315, 2017.
- WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. IN INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed) **PCR Protocols: A guide to Methods and Applications**, San Diego, U.S.A: Academic Press, 1990. p. 315±322.
- WHITTAKER, R. H. Evolution and measurement of species diversity. **Taxon.**, p. 213-251, 1972.
- WU, Q.; CHEN, L.; XU, Y. Yeast community associated with the solid state fermentation of traditional Chinese Maotai-flavor liquor. **Inter. J. Food. Microbiol.**, v. 166, n. 2, p.323-330, 2013.
- XUE, M.L. *Metschnikowia sinensis* sp. nov., *Metschnikowia zizyphicola* sp. nov. and *Metschnikowia shanxiensis* sp. nov., novel yeast species from jujube fruit. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 56, p. 2245–2250, 2006.