



MATILDE GUIMARÃES

**DIVERSIDADE E AFILIAÇÃO FILOGENÉTICA DE LEVEDURAS
ASSOCIADAS Á PLANTAS DE SORGO SACARINO [*Sorghum bicolor*
(L.) MOENCH] CULTIVADAS NO CERRADO**

**SETE LAGOAS / MG
2016**

MATILDE GUIMARÃES

**DIVERSIDADE E AFILIAÇÃO FILOGENÉTICA DE LEVEDURAS
ASSOCIADAS Á PLANTAS DE SORGO SACARINO [*Sorghum bicolor*
(L.) MOENCH] CULTIVADAS NO CERRADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João Del Rei, *Campus* Sete Lagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias (Área de concentração em Produção Vegetal).

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel

**SETE LAGOAS / MG
2016**

MATILDE GUIMARÃES

**DIVERSIDADE E AFILIAÇÃO FILOGENÉTICA DE LEVEDURAS
ASSOCIADAS Á PLANTAS DE SORGO SACARINO [*Sorghum bicolor*
(L.) MOENCH] CULTIVADAS NO CERRADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João Del Rei, *Campus* Sete Lagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias (Área de concentração em Produção Vegetal).

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel

Sete Lagoas MG, 15 de fevereiro de 2016

Banca examinadora:

Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva ó Embrapa Milho e Sorgo

Dr. Francisco Adriano de Souza ó Embrapa Milho e Sorgo

Dr. Ivanildo Evódio Marriel
(Orientador)

Se você não consegue explicar algo de modo simples é porque não entendeu bem a coisa

Albert Einstein

Dedico a:

A minha mãe Ângela, meu anjo, que segura minhas mãos em todos os momentos, a ela, meu
singelo agradecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor meu Deus, pelo seu amor e misericórdia.

À Universidade Federal de São João Del Rei ó UFSJ, Campus Sete Lagoas ó CSL, à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, área de concentração Produção Vegetal, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Embrapa pela oportunidade de estágio para realização dos estudos em especial ao Laboratório de Microbiologia dos solos.

Ao Professor Dr. Ivanildo Evódio Marriel, pela orientação, dedicação, paciência e ensinamentos que foram de grande relevância para realização deste trabalho.

Aos membros da banca Dra. Christiane A. O. Paiva, Dr. Francisco Adriano de Sousa, pela prontidão ao convite para compor a mesa e pelos vários apoios e ensinamentos.

Ao Ubiraci (NBA) pelo auxílio na parte do sequenciamento.

Aos meus pais Ângela e Raimundo e minha irmã Mirian pelo amor e apoio.

A minha prima Elaine por sua prontidão em ajudar e carinho.

Ao meu amigo Taioba pela presença amiga o tempo todo neste mestrado.

As minhas amigas Crísia, Michele, Talita pela ajuda e ombro amigo.

Obrigada a todos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura do DNA ribossomal (rDNA).....	9
Figura 2. Fontes de carbono nas microplacas Biolog GN2.....	18
Figura 3. Caracterização Morfológica das leveduras isoladas de sorgo sacarino.....	21
Figura 4. Variações morfológicas de colônias das leveduras isoladas crescidas por 5 dias em meio YEPD a 28°C.....	22
Figura 5. Dendograma de similaridade fenética, pelo programa Past 2.17, utilizando o coeficiente Jaccard de similaridade.....	23
Figura 6. Aspectos morfológicos celulares.....	25
Figura 7. Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose de isolados de leveduras de sorgo sacarino, usando o primer GTG(5). Marcador de peso molecular: 1kb Invitrogen Plus.....	26
Figura 8. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J), a partir dos perfis gerados por ISSR obtidos de leveduras isolados de sorgo sacarino, com o iniciador GTG(5).....	27
Figura 9. Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose de isolados leveduras de sorgo sacarino, usando os primers NL1 e NL4. Marcador de peso molecular: 1kb Invitrogen Plus.....	31
Figura 10. Árvore Filogenética, gerada a partir do sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S das leveduras isoladas de plantas de sorgo sacarino, derivada do método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e teste de bootstrap com 1000 replicatas. A espécie <i>Schizosaccharomyces pombe</i> foi usada como outgroup.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de leveduras e suas aplicações em biotecnologia.....	13
Tabela 2. Sequências das Leveduras α Tipo α correspondentes a região D1/D2 do gene 26S do DNA ribossomal depositadas no α GenBank e utilizadas nas análises filogenéticas.....	17
Tabela 3. Caracterização Microscópica de Leveduras isoladas de sorgo sacarino.....	24
Tabela 4. Identificação de leveduras isoladas de sorgo sacarino por sequenciamento da região D1/D2 do rDNA do gene 26S pela ferramenta α BLAST N α no GenBank.....	32
Tabela 5. Diversidade funcional de leveduras avaliada através do índice de diversidade de Shannon (H), riqueza de substrato (S), equidade de substrato (E) para 95 fontes de carbono da microplaca GN2 Biolog. Valores médios de três repetições.....	37
Tabela 6. Produtividade de etanol das 34 cepas de leveduras isoladas de sorgo sacarino, em 48 horas de fermentação, em meios YEPD, fonte Glucose.....	39

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1. Sorgo Sacarino.....	4
2.2. Taxonomia Clássica de Leveduras.....	6
2.3. Métodos Moleculares para Agrupar Isolados de Leveduras.....	8
2.3.1. Amplificação de sequências simples entre repetições de DNA (Inter Simple Sequence Repeats ó ISSR).....	9
2.4. Leveduras e sua Importância Biotecnológica.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Caracterização Morfológica de Leveduras de Sorgo Sacarino.....	14
3.2. Identificação e Diversidade Genética.....	15
3.2.1. Extração de DNA.....	15
3.2.2. Amplificação com o iniciador (GTG) ₅	15
3.2.3. Sequenciamento do gene 26S do DNA ribossomal.....	16
3.2.4. Análise filogenética.....	17
3.3. Utilizações de Substratos por Leveduras de Sorgo Sacarino Via Sistema Biolog.....	18
3.4. Produção de Etanol por Leveduras de Sorgo Sacarino.....	19
3.5. Análise Estatística.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Caracterização Morfológica de Leveduras de Sorgo Sacarino.....	21
4.2. Identificação e Diversidade Genética.....	25
4.2.1. Técnica ISSR (GTG) ₅	25
4.2.2. Sequenciamento do gene 26S do DNA ribossomal.....	31
4.2.3. Análise filogenética.....	34
4.3. Capacidade de Utilização de Fontes de Carbono por Biolog em Leveduras de Sorgo Sacarino.....	37

4.4. Capacidade de Produção de Etanol por Leveduras de Sorgo Sacarino.....	38
5. CONCLUSÃO.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

DIVERSIDADE E AFILIAÇÃO FILOGENÉTICA DE LEVEDURAS ASSOCIADAS Á PLANTAS DE SORGO SACARINO [*Sorghum bicolor* (L.) MOENCH] CULTIVADAS NO CERRADO

RESUMO O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade genética e funcional de leveduras associadas a plantas de sorgo sacarino. Um total de 110 cepas de leveduras foram recuperadas da Coleção de Leveduras de Sorgo Sacarino da Embrapa milho e sorgo (CLSS). Para análise morfológica as colônias de leveduras foram caracterizadas de acordo com o formato, tamanho, superfície borda e perfil. Para tal, após o repique em meio específico foram observadas as características macromorfológicas e micromorfológicas. A caracterização genética foi realizada através da técnica de δ ISSR com iniciador (GTG)₅ para agrupamento de perfis genéticos similares e o sequenciamento do gene 26S do RNA ribossomal. A caracterização funcional foi feita através do sistema δ Biologö para determinar a capacidade de utilizar fontes de carbono por meio das microplacas GN2. Foi realizado um teste para produção de etanol a partir do δ Kit Etanol Sigma-Aldrich. Na caracterização morfológica foram obtidos 25 agrupamentos distintos. O iniciador (GTG)₅ resultou como eficiente em discriminar inter e intraespecífica as espécies de leveduras. O sequenciamento do Domínio D1/D2 do gene 26S do RNA ribossomal revelou a presença de 6 gêneros: *Meyerozyma*, *Wickerhamomyces*, *Candida*, *Torulaspota*, *Pichia* e *Saccharomyces*. O gênero *Wickerhamomyces* foi dominante com 24 isolados identificados. A linhagem que obteve maior uso das fontes de carbono foi identificada como a espécie *Pichia membranifaciens* tendo esta utilizado mais de 40 substratos. Verificou-se que a produção de etanol foi superior nas linhagens 1.21 (9.166 ng/ μ l) e 4.16 (6.776 ng/ μ l) respectivamente, *cândida intermedia* e *Wickerhamomyces anomalus*.

Palavras-Chave: Fungos leveduriformes; produção de etanol; caracterização morfológica; caracterização molecular; δ ISSR (GTG)₅.

PHYLOGENETIC DIVERSITY AND AFFILIATION OF YEAST ASSOCIATED TO SWEET SORGHUM PLANTS [*Sorghum bicolor* (L.) MOENCH] CULTIVATED IN THE CERRADO

ABSTRACT 6 The objective of this work was to characterize the genetic and functional diversity of yeast associated to sweet sorghum plants. A total of 110 yeast stumps were recovered from the Sweet Sorghum Yeast Collection (CLSS) of the Embrapa corn and sorghum. For morphological analysis, the yeast colonies were characterized according to shape, size, edge surface and profile. For such, after replication in specific medium, we observed the macromorphometric and micromorphometric traits. Genetic characterization was performed by means of the ISSR technique with indicator (GTG)₅ for grouping similar genetic profiles and for sequencing the 26S gene of the ribosomal RNA. Functional characterization was done by means of the Biolog system for determining the capacity of using carbon sources by means of GN2 microplates. We conducted a test for producing ethanol from the Sigma-Aldrich Ethanol Kit. From the morphometric characterization, 25 distinct groupings were obtained. The indicator (GTG)₅ was efficient in discriminating inter and intraspecific species of yeast. The sequencing of the D1/D2 domain of the 26S gene of the ribosomal RNA revealed the presence of 6 genera: Meyerozyma, Wickerhamomyces, Candida, Torulaspora, Pichia and Saccharomyces. The Wickerhamomyces genus was dominant with 24 identified isolates. The lineage with the highest use of carbon sources was identified as the Pichia membranifaciens species, using more than 40 substrates. We verified that the production of ethanol was superior for lineages 1.21 (9.166 ng/μl) and 4.16 (6.776 ng/μl), respectively Candida intermedia and Wickerhamomyces anomalus.

Keywords: Leveduriform fungi; ethanol production; morphological characterization; molecular characterization; ISSR (GTG)₅.

1. INTRODUÇÃO

A substituição de parte do petróleo na matriz energética global tornou-se imperativo para o equilíbrio ambiental e qualidade de vida da população. Conseqüentemente, o desenvolvimento de tecnologias que atendam à crescente demanda da sociedade por energia, para transporte, aquecimento e processos industriais, como alternativas à energia derivada de combustíveis fósseis, constitui um dos maiores desafios da atualidade.

Dentre as fontes de matérias primas alternativas potenciais disponíveis, salienta-se a utilização de biomassa para produção de biocombustíveis, que possui uma plataforma tecnológica bem estabelecida no Brasil (Goldemberg, 2007). A produção e uso de etanol representam componente importante da matriz energética nacional, com base na cultura de cana-de-açúcar, com projeção de expansão em função da perspectiva de exportação, apesar da instabilidade de mercado (Federação das Indústrias do Estado de São Paulo - Fiesp, 2015). Estas estimativas tornaram-se mais concretas em função dos compromissos de políticas públicas assumidas pelo Brasil e demais países, durante a COP 21 realizada em Paris em dezembro de 2015, para redução da emissão de CO₂, nas próximas décadas. Entretanto, o domínio desta tecnologia com a inserção de novas fontes renováveis de energia contribuirá para a estabilidade de produção e competitividade deste biocombustível no mercado interno e externo (Parrella et al., 2010).

Dentre as matérias-primas com potencial de uso como fontes de biocombustíveis, incluem-se o milho, beterraba açucareira, mandioca, com destaque para o grande potencial da cultura do sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). O sorgo sacarino é similar à cana-de-açúcar em armazenar açúcares nos colmos e na quantidade de bagaço adequada para cogeração industrial. Mas, possui algumas vantagens competitivas, pois apresenta três opções de materiais para fermentação, os açúcares dos colmos, o amido presente nos grãos e o material ligno-celulósico, como o bagaço e, além disso, difere da cana pelo fato de apresentar propagação por sementes e um ciclo vegetativo mais curto (Alvira et al., 2010; Fontes et al., 2011).

Assim sendo, a melhora na eficiência da fermentação, etapa central desse processo, permite um grande aumento na produção de etanol. No entanto, poucos estudos têm sido direcionados para o desenvolvimento desta área. Na década de 70, o sucesso do Proálcool se

deu, em grande parte, aos avanços dos estudos feitos em fermentação (Furtado & Scandiffio, 2007).

O bioetanol, biocombustível de primeira geração, é o produto da fermentação do açúcar presente nas diferentes matérias-primas através de processos biotecnológicos que transformam a sacarose em etanol, por meio de reações químicas mediadas por enzimas. Embora diferentes tipos de microrganismos possuam a capacidade de produzir etanol a partir de açúcares fermentáveis, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido amplamente utilizada para produção de álcool combustível (Abdel-Banat et al., 2010; Laopaiboon et al., 2010). Por outro lado, a literatura crescente demonstra o papel de várias outras espécies de levedura com potencial de produzir bioetanol, dependendo da matéria-prima processada (Fleet, 2008; Morais et al., 2013; Hesham et al., 2014; Kahar & Tanaka, 2014). A eficiência do processo de fermentação e volume produzido de etanol no País tem recebido contribuição significativa dos avanços técnico-científicos dos estudos associados ao melhoramento e seleção de leveduras com características apropriadas ao processo.

As leveduras são fungos ascomicetos ou basidiomicetos unicelulares cujo crescimento resulta principalmente de brotamento ou fissão binária (Kurtzman et al., 2011). Elas podem ser caracterizadas por estados sexuais que não são formados dentro ou sobre um corpo de frutificação (Barnett et al., 1992). Os métodos taxonômicos convencionais para diferenciação e identificação de leveduras são baseados em caracteres morfológicos (aparência macroscópica das colônias, aparência microscópica da célula e modo de reprodução sexual), testes bioquímicos e fisiológicos que incluem fermentação de diferentes fontes de açúcares, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, crescimento em diferentes temperaturas, entre outros (Kurtzman et al., 2011). Entretanto, esses protocolos são laboriosos e consumidores de tempo e de precisão, as vezes, questionáveis.

As análises fisiológicas em diferentes tipos de microrganismos têm sido efetuadas com sucesso utilizando-se perfis metabólicos, com base na utilização de diferentes substratos de carbono (C) (Zak et al., 1994). O sistema biolog, consiste na habilidade de um microrganismo utilizar e oxidar uma quantidade pré-selecionada de diferentes fontes de carbono.

Avanços mais recentes nos estudos sobre microrganismos, em geral, tem sido alcançado com abordagens moleculares para caracterizar e identificar as leveduras e baseiam-se na composição de bases de DNA, reassociação genômica, sequenciamento gênico,

cariotipagem cromossômica e métodos baseados em PCR (Baleiras-Couto et al., 1996; Schuller et al., 2004; Fernandez-Espinar et al., 2006).

Neste sentido, muitas técnicas moleculares foram desenvolvidas para discriminar espécies de leveduras diferentes. Dentre estas, a técnica de Microsatellite Primed (MSP)-PCR Fingerprinting foi amplamente usada na literatura para discriminar cepas do gênero *Saccharomyces* (Lieckfeldt et al., 1993; Torriani et al., 1999; Naumova et al., 2003; Silva-Filho et al., 2005) e não *Saccharomyces* (Caruso et al., 2002; Basilio et al., 2008) usando primers como (GAC)₅, (GACA)₄, (GTG)₅ e M₁₃.

Atualmente, a taxonomia de leveduras tem uma abordagem polifásica, com espécies e gêneros formados por clados monofiléticos e baseados em dados genômicos, genotípicos, fenotípicos e ecológicos. Entretanto ainda não há relatos disponíveis sobre a estrutura e função de comunidade de leveduras que colonizam naturalmente plantas de sorgo sacarino, em solos ácidos.

A principal proposta deste trabalho foi realizar a caracterização de leveduras isoladas a partir de caldo de colmo de plantas de sorgo sacarino cultivadas no cerrado, quanto as suas características morfo-fisiológicas, genéticas e funcionais.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

A crescente demanda energética da população em geral torna altamente relevante os esforços para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de tecnologias com base em recursos renováveis em substituição aos combustíveis fósseis, que são responsáveis por emissão de gases de efeito estufa.

Em relação ao uso de biomassas como matéria-prima para produção de biocombustíveis alternativos para transporte merece destaque o etanol obtido a partir da cana-de-açúcar, denominado etanol de primeira geração (Fischer et al., 2008; Gonçalves et al., 2011). O balanço energético positivo deste produto aliado aos benefícios de apoio a políticas em vários países justificam os investimentos nesta cultura, principalmente no Brasil. Neste caso, o bioetanol responde por aproximadamente 40% do combustível para veículos de passageiros, que coloca o País em destaque quando se considera sua matriz energética (Goldemberg, 2007). O uso de etanol puro ou em mistura com gasolina, como biocombustíveis de transporte, há vários anos como alternativa para superar dificuldades impostas por períodos de instabilidade da oferta de petróleo, permitiu avanços em estudos agrícolas e tecnológicos relacionados ao cultivo, processamento de cana-de-açúcar, que deixaram o Brasil em uma posição muito favorável em termos de segurança energética para transporte (Kim et al., 2010; Soccol et al., 2010).

Dentre as diversas matérias-primas com potencial de uso como fontes de etanol, o sorgo sacarino tem se mostrado como uma excelente alternativa (Almodares et al., 2008; Moreira & Fávaro, 2011; Parrella, 2011; Albuquerque et al., 2012), principalmente em função de características favoráveis, tais como teores de açúcares, sacarose e frutose, ciclo, propagação por sementes, tolerância a estresses culturais (Ribas, 2008; Fontes et al., 2011).

2.1. Sorgo Sacarino como alternativa para produção de biocombustíveis

O sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] é uma planta de origem Africana que se propagou pela Ásia, Europa, Austrália e outros países. Pertencente à mesma família botânica do milho, é utilizado na alimentação animal, principalmente dos bovinos na forma de feno e silagem. Dentre as plantas pertencentes ao gênero *Sorghum* as cultivares são bem

distintas. As variedades mais cultivadas no Brasil são o granífero e o sacarino (Kolling, 2012). Em termos globais, o sorgo é uma cultura bem adaptada a condições edafoclimáticas diversas e ocupa a quinta posição em área cultivada, após o trigo, arroz, milho e cevada (Bantilan et al., 2004; Dalvi et al., 2012). Reconhecidamente promissor como fonte de energia de biomassa (Alvin et al., 2012). O sorgo sacarino caracteriza-se pelo elevado rendimento de biomassa e, grande quantidade de açúcares fermentescíveis (Albuquerque et al., 2012).

O sorgo sacarino pode ser cultivado sob diversas condições agroclimáticas com menor exigência, comparado à cana e milho e ainda produzindo mais etanol por hectare em unidade de tempo (Reddy et al., 2005). Em relação ao tempo numa escala comparativa, o sorgo sacarino apresenta ciclo fenológico inferior ao da cana-de-açúcar, alcançando sua maturação fisiológica e período de colheita em aproximadamente 120 dias, nos quais são obtidos valores de sólidos solúveis na faixa de 16-21°Brix e elevada produção de biomassa vegetal (Fontes et al., 2011). Entre as espécies alimentares, o sorgo é considerado uma das espécies mais flexíveis e eficientes, tanto do ponto de vista fotossintético como em velocidade de maturação. Sua versatilidade se estende desde o uso de seus grãos como alimento humano e animal; como matéria-prima para produção de álcool anidro, bebidas alcoólicas, colas e tintas, o uso de suas panículas para produção de vassouras, extração de açúcar de seus colmos, até as inúmeras aplicações de sua forragem na nutrição de ruminantes.

Neste cenário, o sorgo sacarino surge como uma cultura energética, possuindo na constituição três grupos de materiais susceptíveis à fermentação etanólica, os açúcares presentes nos colmos, o amido dos grãos, e os materiais lenho-celulósicos como seu bagaço. Além disso, o sorgo sacarino mostra-se produtivo também em climas temperados e mediterrâneos (Jardine et al., 2009). O sorgo sacarino apresenta-se como alternativa promissora para complementação no fornecimento de matéria-prima para indústria sucroenergética.

No Brasil, o desenvolvimento de variedades de sorgo sacarino iniciou com a responsabilidade da Embrapa Milho e Sorgo com o programa Pró-Álcool, em 1970. Inicialmente o material genético foi importado dos Estados Unidos, África e Índia e, após o período de cruzamentos, no início dos anos 80 foram lançadas as primeiras variedades, com produtividades de colmos superiores a 40 ton/ha e o teor de sólidos solúveis entre 18 e 20° Brix (Parrella, 2011; Kolling, 2012). Contudo, com o insatisfatório êxito do Proálcool e da

política nacional direcionada para grandes destilarias, o foco das pesquisas com sorgo sacarino foi redirecionado para a produção de cultivares forrageiras (Parrella, 2011). Entretanto em 2008 o programa de desenvolvimento de cultivares de sorgo sacarino foi retomado, devido ao potencial desta cultura na geração de energia renovável e devido à grande demanda por matéria-prima alternativa para a produção de etanol (Parrella, 2011).

2.2. Taxonomia Clássica de Leveduras

A palavra inglesa *öyeastö* (derivado do alemão *öGischtö* que significa espuma) ou similarmente em outros idiomas refere-se diretamente aos microrganismos presentes na fermentação do pão ou cerveja. As leveduras são fungos ascomicetos ou basidiomicetos unicelulares cujo crescimento resulta principalmente de brotamento ou fissão binária (Kurtzman et al., 2011). Elas podem ser caracterizadas por estados sexuais que não são formados dentro ou sobre um corpo de frutificação (Barnett et al., 1990). No trabalho mais recente sobre taxonomia de leveduras, mais de 149 gêneros e 1500 espécies de levedura estão descritos (Kurtzman et al., 2011). A classificação é referida ao agrupamento de organismos em taxa baseado nas similaridades ou relações ancestrais comuns, enquanto que a identificação incorpora a ideia de comparar organismos desconhecidos a espécies classificadas baseado em características similares (Kurtzman et al., 2011). A taxonomia é vista como uma descrição coletiva de classificação e identificação (Barnett et al., 2000; Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Inicialmente, o taxonomista classifica espécies de leveduras (sejam ascomicéticas ou basidiomicéticas) sobre a sexualidade ou perda de fase sexual (Kurtzman, 2003; Ribéreau-Gayon et al., 2006) e, em seguida, por outras subdivisões, enquanto que a classificação e identificação são baseadas em critérios morfológicos, fisiológicos (nutricionais) e moleculares (Pretorius et al., 1999; Kurtzman et al., 2011).

A taxonomia clássica para microrganismos utiliza principalmente caracteres morfológicos, estruturais, bioquímicos e fisiológicos para comparações entre organismos e grupos de organismos. Para leveduras, caracteres morfológicos, tais como a forma da célula, os tipos de brotamento e de esporo, e a formação de filamento são considerados parâmetros importantes para identificação dos gêneros. E os fisiológicos, como os de assimilação e

fermentação de açúcares, são utilizados para os níveis taxonômicos de espécies. Este tipo de taxonomia foi empregado pela Escola Holandesa e os tratados gerados, por influência direta ou histórica, dessa escola até a sua última edição, possuem esta forma de comparação (Kurtzman & Fell, 1998). As análises macro e microscópica de colônias de leveduras constituem etapas necessárias à identificação das mesmas. Caracteres morfológicos das colônias como aspecto, cor, forma e tamanho são utilizados para classificar os isolados em morfotipos (Dias & Schwan, 2010).

Os testes bioquímicos e fisiológicos aplicados na identificação de leveduras avaliam características do metabolismo com relação à capacidade fermentativa de diversas fontes de carboidratos (mono, di e oligossacarídeos), assimilação de diversas fontes de carbono e nitrogênio, requerimento de vitaminas e outros fatores de crescimento, resistência à cicloheximida e outros compostos e produção/secreção de metabólitos (ácido acético, amido, enzimas) (Dias & Schwan, 2010). O conjunto de características semelhantes é utilizado principalmente para distinção entre espécies, porém alguns gêneros também podem ser separados por alguma característica fisiológica em particular, como exemplo, espécies do gênero *Saccharomyces* são conhecidas por suas habilidades em fermentar D-glucose (Barnett et al., 1986).

Por outro lado, a morfologia celular também é avaliada, levando-se em consideração a forma e tamanho da célula e formação de pseudo-hifas (Dias & Schwan, 2010); se o modo de reprodução vegetativa se dá por brotamento (multilateral, bipolar ou unipolar), por fissão ou por formação de filamentos; e a forma, estrutura e modo de formação dos esporos sexuais (ascósporos ou teliósporos), quando presentes (Barnett et al., 1986).

A diversidade metabólica é definida pelo número, tipo e taxa de utilização de um conjunto de substratos pela comunidade microbiana, que é consequência da diversidade genética, dos efeitos ambientais na expressão gênica e das interações ecológicas entre as diferentes populações (Zak et al., 1994). O sistema biolog, utilizando microplacas GN2, introduzido inicialmente para identificação de bactérias gram-negativas, tem sido utilizado para caracterização de microrganismos através de fingerprints metabólicos gerados pelo padrão de utilização de diferentes substratos de carbono (Garland & Mills, 1991; Zak et al., 1994). O princípio deste método consiste na habilidade de um microrganismo utilizar e oxidar uma quantidade pré-selecionada de diferentes fontes de carbono. A utilização do método

Biolog utilizando microplacas apresenta as vantagens de possuir uma alta sensibilidade e resolução, facilita aquisição de características da impressão digital metabólica das comunidades de microrganismos, mantém as características metabólicas originais, além de ser um teste rápido e eficiente na avaliação do perfil metabólico (Donegan et al., 1995; Griffiths et al., 2000; Tesfayea et al., 2003).

A Taxonomia Polifásica (Colwell, 1970) se caracteriza pela inclusão de dados moleculares ao conjunto de dados que anteriormente eram utilizados e a utilização de dados filogenéticos para classificação do organismo. Por utilizar um conjunto mais amplo e diverso de dados e informações, ela essencialmente indica um consenso entre as associações (Uilenberg & Goff, 2006). Ela surgiu e se desenvolveu com o advento da Biologia Molecular e também do contínuo desenvolvimento da Ciência Computacional e seu crescente uso na Biologia.

Para identificação mais segura, atualmente são utilizados em conjunto a taxonomia morfológica e molecular, onde todos os caracteres mencionados são levados em consideração para a identificação de leveduras (Libkind et al., 2003; Wuczowski & Prillinger, 2004).

2.3. Métodos Moleculares para caracterização e identificação de leveduras

A identificação e caracterização de espécies e cepas de leveduras são na maioria das vezes realizadas por testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos (Barnett et al., 1990). Entretanto, este processo resulta em aproximadamente 90 testes e os resultados variam dependendo do estado fisiológico do cultivo ou da variabilidade intraespecífica, além disso, os testes bioquímicos não são muito sensíveis, levando à identificação de leveduras imprecisa (Arias et al., 2002).

Testes moleculares têm sido bastante utilizados como ferramenta na identificação de leveduras, principalmente as linhagens que não possibilitam sua diferenciação através de características morfológicas essenciais, impossibilitando a por métodos convencionais de identificação. Portanto, para a identificação e análise filogenética, é muito importante o uso das ferramentas de caracterização molecular que utilizam desde proteínas e RNA, até o próprio DNA como alvo de identificação. O alvo mais frequente nas pesquisas de identificação molecular por PCR e suas variações são os DNA ribossomais. Os genes de DNA

ribossomal são encontrados em todos os microrganismos e são conhecidos por acumular mutações lentas (Kurtzman & Fell, 1998). O gene presente no DNA ribossomal tem sido bastante utilizado em estudos taxonômicos pelo fato de ser universal, ou seja, estar presente em todos os organismos, que evoluíram de um ancestral em comum; está presente em várias cópias e também pela presença de regiões codificantes e não codificantes (Barnett et al., 1990).

O gene 26S tem sido usado para diferenciação em nível de gênero e espécies, enquanto a região ITS é comumente utilizada para separar espécies próximas e/ou subespécies, bem como a região IGS que discrimina subespécies e até estirpes quando combinada com análises utilizando enzimas de restrição (Valente et al., 1999).

Em leveduras, os genes ribossomais estão organizados em clusters, na disposição 5' a 3' da seguinte forma, segmentos 5S, 5.8S, 18S e 26S, que estão presentes em várias cópias no genoma (Figura 1). Os espaços transcritos internos (ITS) se intercalam entre esses genes e são denominados ITS1 e ITS2. Estas regiões são menos conservadas e são utilizadas para discriminar espécies relacionadas (Barnett et al., 2000).

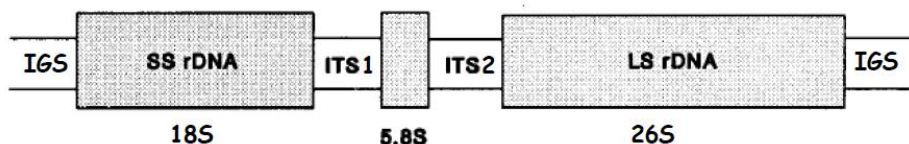


Figura 1. Esquemática da estrutura e organização dos genes e espaços intergênicos do RNA ribossomal de leveduras. Adaptado de Baleiras Couto et al. (1996).

Kurtzman & Robenett (1998) demonstraram que a sequência de nucleotídeos do domínio D1/D2 do gene 26S do RNA ribossomal possui variação suficiente para identificar quase todas as espécies conhecidas de leveduras ascomicéticas e basidiomicéticas, embora em algumas leveduras basiomicéticas seja necessário sequenciar também as regiões ITS do RNA ribossomal (Fell et al., 2000).

As técnicas moleculares para agrupar leveduras possuem a vantagem de diferenciar entre espécies (variabilidade interespecífica) ou cepas da mesma espécie (variabilidade intraespecífica) e são aplicadas com o objetivo de melhorar a eficiência e diminuir o custo da identificação de leveduras (Fernandez-Espinar et al., 2006).

2.3.1. Amplificação de sequências simples entre repetições de DNA (Inter Simple Sequence Repeats - ISSR)

O δ ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) constitui um método baseado na variação nas regiões entre microssatélites, que realiza amplificação de sequências simples entre repetições de DNA por meio de iniciadores homólogos (Consolo et al., 2012).

Esta técnica consiste em um composto de microssatélites, tais como (CA)_n, (CT)_n, (GT)_n, (GAC)_n, (GTG)_n, (GACA)_n, (GATA)_n, (TGTC)_n, dentre outros, ou minissatélites, que funcionam como iniciadores de uma PCR de segmentos genômicos que são seguidos por sequências repetidas, como no caso de microssatélites (Lieckfeldt et al., 1993) ou por sequências de DNA minissatélite (Meyer & Mitchell, 1995).

O método de tipagem molecular baseado na reação em cadeia de DNA polimerase (PCR) ó PCR δ fingerprinting utilizando um iniciador que amplifica regiões simples entre duas sequências de microssatélites tem se mostrado uma técnica capaz de rotineiramente acompanhar o processo fermentativo e sua população de leveduras. Através do uso do marcador molecular (GTG)₅ padronizado por Lieckfeldt et al. (1993). O uso de marcadores microssatélites nas análises genéticas é muito vantajoso em relação a outros tipos de marcadores (RFLP, RAPD, AFLP): são altamente informativos, são baseados em PCR, portanto, exigem uma pequena quantidade de DNA; são altamente reprodutíveis. Estão bem dispersos nos genomas, em regiões codificadoras e não codificadoras (Salles et al., 2003).

Esta técnica envolve amplificações de DNA genômico utilizando um único primer. Além da desobrigação de obter informações sobre a sequência que flanqueia parte do genoma, a análise de δ ISSR é tecnicamente mais simples do que muitos outros sistemas marcadores. O método fornece resultados altamente reprodutíveis e gera abundante polimorfismo em muitos sistemas (Liu & Wendel, 2001).

Os primeiros ensaios de genotipagem por microssatélites em leveduras foram feitos no final da década de 90 para identificar cepas laboratoriais de *Saccharomyces cerevisiae*. Mais recentemente eles têm sido usados para identificar cepas industriais e cepas patogênicas desta mesma espécie (Richard et al., 2008).

Silva-Filho et al. (2005) utilizaram o primer (GTG)₅ para demonstrar a sucessão de leveduras, durante a fermentação para produção de álcool combustível. Os resultados indicaram que linhagens de *S. cerevisiae* indígenas presentes no caldo de cana podem ser mais adaptadas ao processo industrial de obtenção do etanol. Os autores também identificaram que linhagens *S. cerevisiae* indígenas dominaram a população de leveduras. Estes resultados confirmaram o potencial desse marcador como método eficiente e confiável para a discriminação de leveduras ao nível de linhagens e espécie.

2.4. Leveduras e sua importância biotecnológica

As leveduras favorecem a humanidade por milhares de anos, pois possuem ampla e fundamental importância na indústria, na ciência, na medicina e na agricultura. Participam de processos fermentativos para a produção de cerveja. Muitas são as espécies de leveduras empregadas em processos biotecnológicos sendo que a principal é a *Saccharomyces cerevisiae*, devido a sua fisiologia fermentativa única (Johnson & Echavarri-Erasun, 2011). As leveduras são cultivadas visando à obtenção de biomassa, para indústrias de fermentos biológicos, derivados de componentes celulares, como nas indústrias farmacêuticas e de suplementos alimentares, e a produção de compostos, como o etanol (Tortora et al., 2000).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* são usadas na produção brasileira de etanol e podem ser consideradas as principais responsáveis pela produção desse combustível no Brasil. As linhagens utilizadas nestes processos foram selecionadas ao longo de muitos anos e são muito eficientes na fermentação de sacarose, glicose e frutose presentes nos caldos e grandemente adaptadas à fermentação do caldo de cana de açúcar.

No caso de sorgo sacarino a fermentação no caldo de sorgo sacarino por algumas linhagens de *Saccharomyces* têm sido realizadas e os resultados demonstram mais uma vez a eficiência dessas linhagens na conversão de açúcares a etanol. A utilização das mesmas linhagens para fermentação de caldos de cana e de sorgo sacarino facilitará a utilização deste último em usinas de etanol no país, pois não existirá a necessidade de desenvolvimento (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, 2011). Em processos de conversão de açúcares em etanol a imobilização de células microbianas fermentativas oferece vantagens em relação aos sistemas que utilizam células em suspensão (Liu & Shen, 2008). Objetivando

aperfeiçoar processos de fermentação para obtenção de etanol a partir do suco dos talos de sorgo sacarino, Liu & Shen (2008) avaliaram o desempenho de *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308) imobilizado em alginato de sódio. Estes experimentos demonstraram que o rendimento de etanol aumentou de 75,79% para 89,89% à medida que a temperatura de fermentação foi aumentada de 28 para 37 graus Celsius. Em certos níveis o aumento da temperatura resulta em aumento na concentração de etanol, sendo que a temperatura ideal para a fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* livre está acima de 30 graus, para a levedura imobilizada as temperaturas ideais estão acima desta.

A importância industrial das leveduras vem se estendendo além da fermentação tradicional. Na época atual, os produtos da biotecnologia a partir das leveduras afetam muitos setores comerciais importantes, como as indústrias alimentícias, bebidas, biocombustíveis, produtos químicos, enzimas para aplicações industriais, produtos farmacêuticos e agrícolas (Pretorius & Toit, 2003). A *Debaryomyces hansenii* é uma levedura oleaginosa, utilizada na síntese de produtos lácteos, processos fermentativos e formação de enzimas lítica e eficiente em produzir xilitol a partir de D-glicose proveniente da hidrólise de madeira (Breuer & Harms, 2006); *Schizosaccharomyces pombe* e *Pichia pastoris* utilizadas para a expressão heteróloga de proteínas (Johnson & Echavarri-Erasun, 2011). *Candida rugosa* tem sido abundantemente aplicada em processos biotecnológicos e industriais devido à produção de lipases que atuam em processos fermentativos da indústria de alimentos, como: produção de sucos, alimentos assados, vegetais fermentados, processos de enriquecimento de laticínios e também de sabores e aromas desejáveis de queijos; produção de óleos, margarinas e sorvetes; e na indústria farmacêutica essas lipases atuam como catalisadoras para a síntese de inúmeras drogas (Benjamin & Pandey, 1998).

Pichia pastoris tem sido usada para a expressão heteróloga de proteínas pela sua capacidade em utilizar várias fontes de Carbono, e principalmente por utilizar o metanol como única fonte de energia e carbono. A via de metabolismo do metanol é então utilizada para a expressão heteróloga de proteínas uma vez que é regulada por promotores e, estes por sua vez, podem ser reprimidos na presença de glicose, ativados por glicerol e induzidos por metanol, uma vez que a expressão gênica é dependente da fonte de Carbono (Gellissen et al., 2005).

Levando-se em consideração a agricultura, Sperandio (2012) demonstrou a eficiência de isolados de *Aureobasidium sp.*, isolados de folhas e frutos de plantas nativas do Cerrado,

no controle do bolor verde do citros causado por *Penicillium digitatum*. Zong et al. (2010) demonstraram que a aplicação em conjunto das leveduras antagonistas *Candida guilliermondii* e *Pichia membranaefaciens* é eficiente no controle do patógeno *Botrytis cinerea* em frutos de tomate, em casos de infecções pós-colheita.

Liu et al. (2013) elucidaram que o mecanismo utilizado por *Kloeckera apiculata* para controlar o crescimento do fungo *Penicillium italicum*, agente causal do mofo azul em citros, foi a competição por nutrientes.

Alguns exemplos de aplicações biotecnológicas de leveduras são ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1. Espécies de leveduras e suas aplicações em biotecnologia. Adaptado e Traduzido de Deak (2009).

Espécie	Aplicação Biotecnológica
<i>Candida milleri</i>	Agricultura
<i>C. shehatae</i>	Bioetanol
<i>C. sake</i>	Biocontrole
<i>C. oleophila</i>	Proteína
<i>Debarymyces hansenii</i>	Amilase
<i>D. (Schwanniomycetes) occidentalis</i>	Riboflavina
<i>Eremothecium ashbyi</i>	Aprimoramento do queijo
<i>Geotrichum candidum</i>	Fermentação de vinho
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Fermentação de leite; proteína de soro
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Fermentação de leite; proteína de soro
<i>K. lactis</i>	Bioetanol
<i>Pachysolen tannophilus</i>	Astaxantina
<i>Pichia angusta (Hansenula polymorpha)</i>	Bioetanol
<i>P. anômala</i>	Biocontrole
<i>P. jadinii (C. utilis)</i>	Matéria-prima
<i>P. pastoris</i>	Proteína heteróloga
<i>P. stipitis</i>	Bioetanol
<i>Pseudozyma flocculosa</i>	Biocontrole
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Caroteno
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Fermentação de cidra
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermentação cerveja, pão, vinho; bioetanol, invertase; proteína heteróloga
<i>S. exiguus</i>	Agricultura
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	Aglicultura
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Molho de soja

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG.

3.1. Caracterização Morfológica de Leveduras de Sorgo Sacarino

Um total de 110 cepas de leveduras isoladas de caldo de sorgo sacarino foi recuperado da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa milho e sorgo (CLSS). Os isolados foram identificados de acordo com as iniciais da amostra coletada seguido do número da levedura isolada, por exemplo, CLSS.1 é o primeiro isolado recuperado da amostra do caldo do genótipo tipo 1. Após as caracterizações morfológicas foram realizados agrupamentos de acordo com as características similares, em CLSS 1.1.

Para testes de pureza e estudos posteriores as colônias de leveduras foram inoculadas em placa com meio YEPG (5 g de extrato de levedura, 10 g de peptona de soja, 20 g de glicose, 15 g de ágar, por litro) por meio de estrias compostas para posterior caracterização morfológica.

Para análise morfológica as leveduras foram caracterizadas tomando-se como base os trabalhos de Dias & Schwan (2010). Para tal, após o repique em meio YEPG pela técnica de esgotamento em estrias, as características celulares foram observadas pela análise do crescimento das colônias com o auxílio de lupa estereomicroscópica com aumento de até 30 X. Com relação às características macroscópicas as linhagens foram avaliadas quanto aos aspectos das colônias, como: tamanho, cor, tempo de crescimento, tipo de borda, forma da superfície e perfil da colônia, entre outros.

em relação à análise das características micromorfológicas, efetuou-se a montagem de uma lâmina a fresco utilizando Lactoglicerol; para observação à microscopia ótica as células foram observadas em aumentos de 400X. As lâminas foram observadas e fotografadas em Microscópio ótico (Leica DFC 490) e caracterizadas de acordo com a terminologia comumente referenciada às células tais como: forma elipsoide, globosa, cilíndrica, apiculada, triangular, taloide, globular com hifas, globular com pseudo-hifas.

Para a conservação dos isolados caracterizados, utilizou-se o método de criopreservação (Kirsop & Kurtzman (1988)). As colônias puras foram cultivadas em meio GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1% e de fosfato de sódio 0,2%) a 28 °C, sob rotação (200 rpm), após o período de 24 horas foi acrescido de 15% glicerol e depositado no ultrafreezer a ó 85 °C e reincorporada à Coleção com a respectiva identificação.

3.2. Identificação e Diversidade Genética de leveduras

3.2.1. Extração de DNA

Para a extração do DNA total foi utilizado o protocolo modificado de Kurtzmann & Fell (1998). Após o crescimento em meio YEPD, uma colônia de cada linhagem foi diluída em 100 L de tampão de lise e incubada em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 100 L de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) aos tubos homogeneizados em vortex durante 4 minutos e centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta e transferido para outro tubo, ao qual foram adicionados 100 L de etanol 70% gelado. Os tubos foram novamente centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos. O etanol foi descartado e os tubos incubados à temperatura ambiente para total evaporação do etanol. Após essa etapa, o DNA foi diluído em 50 L de tampão Tris EDTA 0,1 M (TE) pH 8 e estocado a ó 20°C.

A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (0.04 M Tris-Acetato, 0.001 M EDTA, pH 8.0), corado com Gel RedÍ (Biotium, Hayward, Califórnia, USA). Após a eletroforese, os géis foram visualizados em luz UV e fotodocumentados no equipamento Gel Logic 200 (KODAK Company, Rochester, NY, USA).

3.2.2. Amplificação com o iniciador (GTG)₅

Todos os isolados foram genotipados via reação de amplificação de sequências curtas simples entre repetições (ISSR) por PCR com o iniciador (GTG)₅ (5Ø GTGGTGGTGGTGGTG -3Ø).

A reação de PCR foi realizada em volume final de 20 μ L contendo 2,5 μ L de tampão de PCR Fermentans 10X, 2 μ L de $MgCl_2$ 1,5M, 1 μ L de dNTP 0,05mM, 2 μ L do iniciador (GTG)₅ a 10pmol/ μ L, 2 a 5 μ L de DNA a 50 a 150ng/ μ L, 0,2 μ L de Taq DNA Polimerase 1,25 U/ μ L (Taq DNA Polymerase Fermentans) e água Milli-Q. Todas as amplificações foram realizadas em termociclador modelo Veriti[®] 96-Well Thermal Cyclers (Applied Biosystems, EUA). O programa de ciclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 93°C, 1 minuto de anelamento do iniciador a 50°C e 1 minuto de extensão a 72°C, e uma extensão final por 6 minutos a 72°C. Após o término da reação os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, durante 2 horas a 100 V e corados em solução de Gel Red[®] (Biotium, Hayward, Califórnia, USA) diluída 3.300 x em 0,1 M NaCl por 20 minutos. Em seguida foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Gel Logic 200 (KODAK Company, Rochester, NY, USA).

3.2.3. Sequenciamento do gene 26S do DNA ribossomal

Após análise de agrupamento usando o iniciador GTG⁵, foram selecionados ao acaso para sequenciamento do DNA ribossomal representantes de cada grupo.

A região D1/D2 do gene 26S do RNA ribossomal foi amplificada por PCR utilizando os primers NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') e NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGAGGG 3') (Kurtzman & Robnett, 1998), gerando um fragmento de aproximadamente 600bp. A reação de PCR foi feita para um volume final de 50 μ L contendo 20-30 ng de DNA molde, 20 pmol de cada primer, $MgCl_2$ 1,5 mM e 0,2 mM dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). O programa de termociclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 33 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 6 minutos.

Os fragmentos foram checados e quantificados em gel de agarose 1,2% utilizando o marcador DNA Low Mass Ladder (Invitrogen[®]) para quantificar a concentração de DNA. Os amplicons gerados foram tratados com a enzima Exo-Sap[®] as reações de sequenciamento foram realizadas com o kit ABI Prism[®] BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Ready

Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), no sequenciador modelo ABI PRISM 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Para sequenciamento foi utilizado o iniciador NL1 e NL4. As sequências foram editadas manualmente usando o programa *Sequencher* 4.1 para geração da sequência consenso de cada isolado, posteriormente foram comparadas no *GenBank* através do programa *BLAST* N^o no *NCBI* (National Center for Biotechnology Information - NCBI, 2015).

3.2.4. Análise filogenética

Foram utilizados 53 isolados de leveduras de sorgo sacarino para o sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S do DNA ribossomal (Tabela 3). Na análise também foram utilizadas sequências de isolados *typos* das espécies *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida intermedia*, *Pichia membranifaciens*, *Candida Pyralidae*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida oleophila*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* (Tabela 2).

Os eletroferogramas gerados pelo sequenciamento foram analisados visualmente com o auxílio do programa *Sequencher* 4.1 e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados *GenBank*, do *National Center for Biotechnological Information* ó *NCBI*, por meio da ferramenta *BLAST* (Altschul et al., 1990). Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram gerados utilizando-se a ferramenta *CLUSTALW* (Thompson et al., 1994), implementado pelo programa *MEGA 5* (Tamura et al., 2011). Os alinhamentos foram corrigidos manualmente. A análise filogenética foi realizada pelo método de Máxima verossimilhança, utilizando o modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros, através do programa *Mega5* (Tamura et al., 2011). A espécie *Schizosaccharomyces pombe* foi usada como *outgroup* (Tabela 2).

Tabela 2. Sequências das Leveduras *typos* correspondentes à região D1/D2 do gene 26S do DNA ribossomal depositadas no *GenBank* e utilizadas nas análises filogenéticas.

Espécie	Código	Acesso <i>GenBank</i>
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	NRRL Y-366	EU057562
<i>Candida intermedia</i>	NRRL Y-981	U44809
<i>Pichia membranifaciens</i>	NRRL Y-2026	EF550227
<i>Candida Pyralidae</i>	NRRL Y-27085	AY013715
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NRRL Y-2075	U45709
<i>Candida oleophila</i>	NRRL Y-2317	U45793

Saccharomyces cerevisiae
Torulaspora delbrueckii
Schizosaccharomyces pombe

NRRL Y-12632
 NRRL Y-866
 NRRL Y-12796

AY048154
 JQ689018
 AY048171

3.3. Utilizações de Substratos de Leveduras de Sorgo Sacarino Via Sistema Biolog

Para determinar a capacidade de utilizar fontes de carbono foram utilizadas as microplacas GN₂ (Biolog®, Cabot Boulevard Hayward, USA), que contêm 95 fontes de carbono e um poço controle, como indicado na Figura 2.

1 Água	A2 A- Ciclohexi- ma	A3 Destrino	A4 Glicogêni- o	A5 Tween 40	A6 Tween 80	A7 N-Acetil- D- galactosa- mina	A8 N-Acetil- D- glucosami- na	A9 Adonitol	A10 L- Arabinose	A11 D-Arabitól	A12 D- Celobiose
B1 i-Eritritol	B2 D-Frutose	B3 L-Fucose	B4 D- Galactose	B5 Gentobio- se	B6 e-D- Glucose	B7 m-Inositol	B8 e-D- Lactose	B9 Lactulos- e	B10 Maltose	B11 D-Mantol	B12 D- Mannose
C1 D-Melibiose	C2 β-Metil- D- Glucoside o	C3 D-Picose	C4 D- Rafinose	C5 L- Rhamnose	C6 D- Sorbitol	C7 Sacarose	C8 D-Trelose	C9 Turinose	C10 Xilitol	C11 Metilpurv- ato	C12 Mono- Metil- Succinato
D1 Acido Acético	D2 Acido Ci- aconítico	D3 Acido Ci- trico	D4 Acido For- mático	D5 Acido D- galactônico o lactona	D6 Acido D- Galacturô- nico	D7 Acido D- Glucônico	D8 Acido D- Glucosami- nico	D9 Acido D- Glucurô- nico	D10 Acido α- Hidroxibut- írico	D11 Acido β- Hidroxibut- írico	D12 Acido γ- Hidroxibut- írico
E1 Acido p- hidroxibenil- cético	E2 Acido it- acônico	E3 Acido α- cetobutí- rico	E4 Acido α- Cetoglú- tá- rico	E5 Acido α- Cetovalé- rico	E6 Acido D,L- Lático	E7 Acido Mal- ônico	E8 Acido propi- ônico	E9 Acido qui- nâmico	E10 Acido D- sacárico	E11 Acido sebá- cico	E12 Acido succi- nâmico
F1 Acido bromo- succinâmico	F2 Acido succinâmico	F3 Glucurona mida	F4 L- Alaninam- ida	F5 D-Alanina	F6 L-Alanina	F7 L-Alanil- glicina	F8 L- Asparagin- a	F9 Acido L- Aspártico	F10 Acido L- Glutâmico	F11 Acido Glicil- L- Aspártico	F12 Acido Glicil- L- Glutâmico
G1 L-Histidina	G2 Hidroxil- L-Prolina	G3 L-Leucina	G4 L- Ornitina	G5 Fenilalanina	G6 L-Prolina	G7 Acido L- Pirrolidina- mido	G8 D-Serina	G9 L-Serina	G10 L-Treonina	G11 D,L- Carnitina	G12 Acido γ- Aminobuti- rírico
H1 Acido Urocânico	H2 Inosina	H3 Urdina	H4 Timidina	H5 Fenilalanina	H6 Putrescina	H7 2- Aminoetanol	H8 2,3- Butanodiol	H9 Glicerol	H10 D,L-α- Glicerol fosfato	H11 Glucose-1- Fosfato	H12 Glucose-6- Fosfato

Figura 2. Fontes de Carbono nas microplacas Biolog® GN2.

Foram selecionadas 3 cepas ao acaso de leveduras de cada um dos 5 genótipos em estudo, totalizando 15 isolados. As cepas foram inoculadas em meio de cultivo YEPD (glicose 1%, extrato de levedura 0,3%, peptona bacteriológica 0,5%, ágar 2%) por 48 horas a 28°C. Após o crescimento as colônias isoladas foram utilizadas para preparar uma suspensão, em água estéril. Uma alíquota de 120 microlitros da diluição 10⁻² da suspensão de leveduras foi inoculada em cada um dos 96 poços da microplaca Biolog® GN2, a qual foi incubada a 36°C. Efetuou-se a leitura de absorbância das reações em um leitor de placa elisa (Labstems, Multiskan, MS) a 590 nm em 72 e 96 horas de incubação e o desenvolvimento de coloração púrpura nos poços foi considerado como reação positiva para o respectivo substrato.

Os parâmetros de diversidade metabólica analisados foram: índice de diversidade de Shannon (H), riqueza de substrato (S), equidade ou índice de similaridade (E), e a atividade total (soma da absorbância de todos os substratos).

3.4. Produção de Etanol por Leveduras de Sorgo Sacarino

Para avaliação da capacidade fermentativa de glicose e produção de etanol, foram utilizadas 34 cepas de leveduras selecionadas aleatoriamente com base nos agrupamentos anteriores.

A quantificação de etanol no meio de fermentação foi efetuada utilizando-se o Kit Etanol Sigma-Aldrich (produto número MAK076), conforme instruções do fornecedor. Uma colônia pura em meio sólido foi transferida para meio líquido de YEPD incubadas com agitação de 160 rpm a 30 °C durante 24 horas, e uma alíquota da cultura resultante foi diluída a 1:10 em novo caldo de YEPD incubadas com agitação de 160 rpm a 30 °C durante 48 horas. Após este período, uma alíquota da cultura enriquecida foi diluída a 1:10 em novo caldo de YEPD e incubada durante 48 horas, sob agitação de 160 rpm, a 30 °C. Em seguida, uma alíquota de 1 mL desta cultura de células foi centrifugada a 3000 x g, durante 5 min. Uma alíquota de 50 microlitros do sobrenadante foi misturada com reagentes para colorimetria e, após um período de incubação de 60 minutos, efetuou-se a leitura de absorvância, em espectrofotômetro, a 570 nm. A concentração de etanol em cada cultura, expressa em ng mL^{-1} , foi estimada a partir de análise de regressão linear, utilizando-se a curva de calibração com solução padrão.

3.5. Análise Estatística

Para o agrupamento das características morfológicas das leveduras foi realizada uma análise fenética por meio da construção de uma matriz binária de presença (1) ou ausência (0) da característica morfológica observada para cada colônia, que posteriormente foi analisada no programa Past 2.17 (Hammer et al., 2001). O dendograma de similaridade fenética foi construído pelo algoritmo Paired group utilizando o coeficiente Jaccard para cálculo de similaridade. Foi realizada uma linha de corte de 70% de similaridade para análise dos agrupamentos gerados.

Para as análises nos padrões de *õfingerprintingö* geradas por ISSR-PCR, a matriz de similaridade entre as amostras foi realizada a partir de imagens dos géis de agarose, usando o programa *õBioNumericsö* versão 6.1 (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica) com o método Jaccard e uma tolerância de posição 3%. Posteriormente foi construído um dendrograma pelo método *õUPGMAö* (Unweighted Pair Group With Mathematical Average). Foi estabelecido o critério de 70% de similaridade para definir os grupos.

Os resultados dos ensaios do *õBiolog GNö* e Produção de etanol foram submetidos individualmente à análise de variância e, quando ocorreram diferenças significativas pelo teste F (p menor ou igual a 0,05), os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de *õScott-Knottö* a 5% de probabilidade por meio do programa estatístico SISVAR® 4.3 (Ferreira, 2010).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização Morfológica de Leveduras de Sorgo Sacarino

Analisando os dados referentes aos aspectos morfológicos, dos 110 isolados, as médias dos parâmetros encontrados estão apresentadas na figura 3.

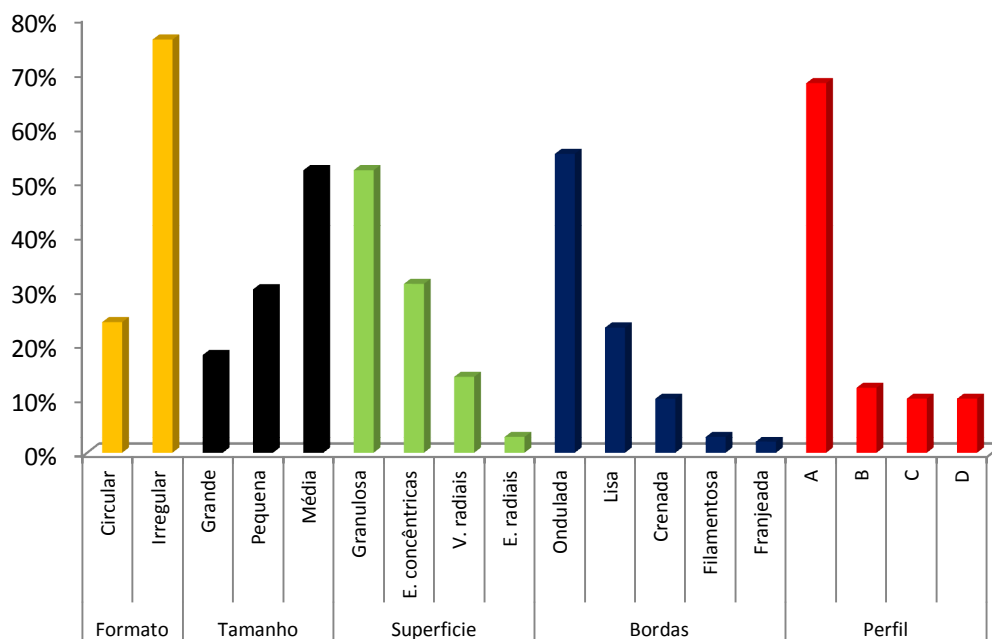


Figura 3. Caracterização Morfológica das leveduras isoladas de sorgo sacarino. As colônias grandes possuem até 5 mm, médias de 2 a 5mm e pequenas inferiores a 2mm. As superfícies são estrias concêntricas, vales radiais e estrias radiais. O perfil em A é representado por lisa e convexa com cume central, B lisa e convexa, C achatada e pregueada e D achatada.

Neste trabalho todas as cepas de leveduras apresentaram coloração de branca a bege. Segundo Yarrow (1998) existe uma predominância das colônias com coloração de branca a bege. A presença de cores diferentes como amarelo, vermelho e laranja deve-se à produção de pigmentos carotenoides e são características de determinados gêneros de leveduras, como *Rhodospiridium* e *Sporidiobolus*, o que não foi observado nestas leveduras.

Ao observar os morfótipos (Figura 3) as colônias em (B) apresentaram o crescimento membranoso que resulta da formação de filamentos (Yarrow, 1998). As colônias isoladas diferenciaram-se principalmente pelo tipo de superfície, borda e perfil.

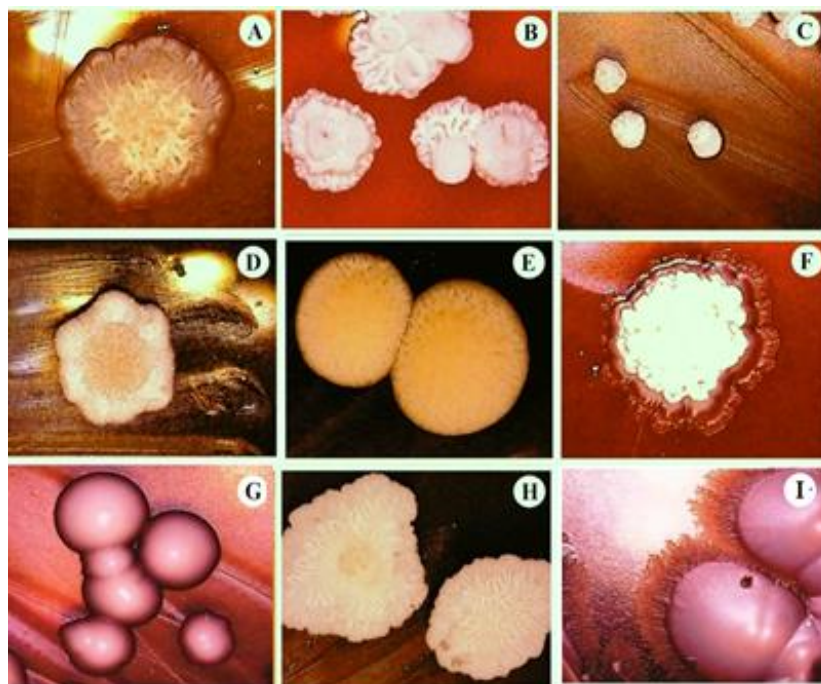


Figura 4. Variações morfológicas das colônias de leveduras isoladas de sorgo sacarino crescidas por 5 dias em meio YEPD a 28°C. Em (A) ó Irregular, grande, vales radiais, ondulada, achatada e pregueada. (B) ó Irregular, grande, estrias radiais, crenada, lisa e convexa com cume central. (C) ó Irregular, pequena, granulosa, ondulada, lisa e convexa. (D) ó Irregular, média, granulosa, ondulada, achatada e pregueada. (E) ó Circular, grande, crenada, lisa e convexa. (F) ó Irregular, média, granulosa, franjeada, achatada e pregueada. (G) ó Circular, média, estrias concêntricas, lisa, lisa e convexa com cume central. (H) ó Irregular, grande, estrias radiais, ondulada, achatada. (I) ó Circular, grande, estrias concêntricas, filamentososa, lisa e convexa.

Segundo Casalone et al. (2005), algumas variações morfológicas entre as colônias durante o processo de caracterização estão diretamente associadas à constituição do meio de cultura. A composição dos meios de cultivo pode alterar a morfologia das colônias de uma mesma espécie, motivo pela qual se prefere a utilização do meio MYGP ou YEPD (Dias & Schwan, 2010), e a análise morfológica das colônias é mais descritiva e serve para ajudar na diferenciação inicial durante o isolamento das leveduras, não chegando a uma conclusão taxonômica precisa no nível de espécie.

Com o objetivo de agrupar os isolados com características morfológicas semelhantes, e também confrontar com as características moleculares estudadas num segundo momento, os dados morfológicos referentes aos caracteres discutidos acima foram transformadas em uma matriz binária. Esses dados, quando submetidos à análise estatística pelo método "Paired group" utilizando o coeficiente "Jaccard" para cálculo de similaridade produziram 22 agrupamentos distintos conforme apresentado na Figura 5.

SIMILARIDADE

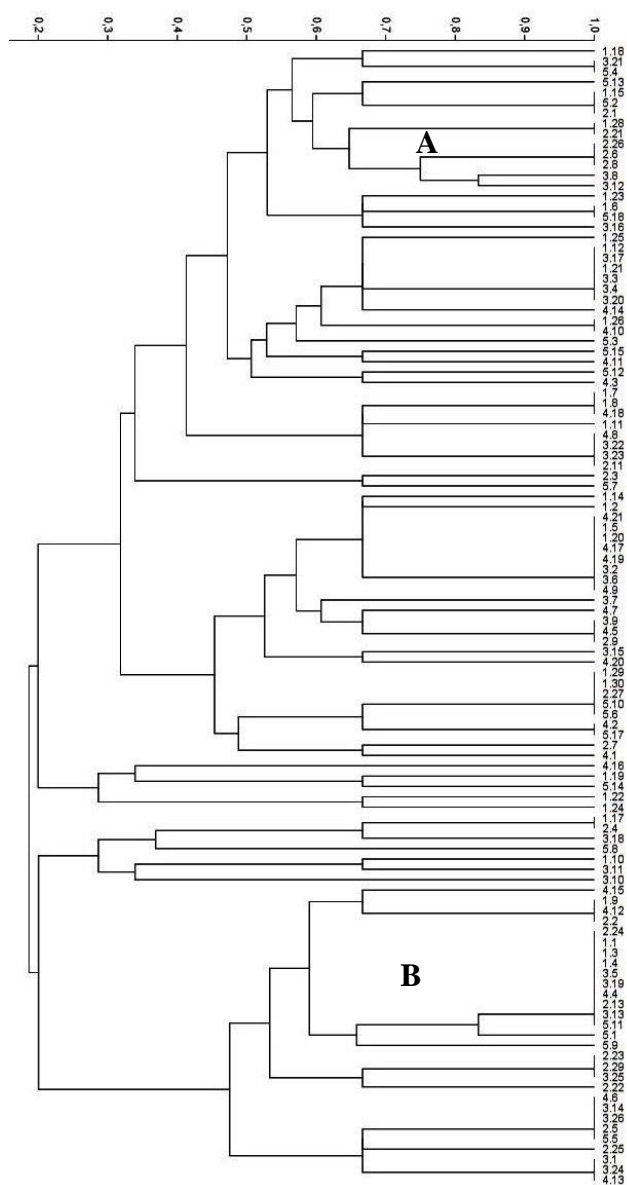


Figura 5. Dendrograma de similaridade fenética, pelo programa *õPastõ 2.17*, utilizando o coeficiente *õJaccardõ* de similaridade com 70%.

Foram obtidos 19 perfis com 100% de similaridade. Uma explicação para este agrupamento pode ter se dado por variação genotípica, apresentando características comuns dentro do genótipo (2) confirmados pelo agrupamento (A) na figura 4. Também ocorreu agrupamento entre os genótipos variados (B), o que pode ser explicado pelas características dominantes como perfil das colônias lisa convexa com cume central 68% dos isolados,

superfície granulosa com 52% isolados e borda ondulada com 55% isolados. Estas variações estiveram presentes em todos os agrupamentos.

A análise microscópica foi feita para todos os 110 isolados que foram crescidos em meio YEPD por um período de 5 dias e então foram montadas lâminas microscópicas com Lactoglicerol. Na tabela 3 encontram-se as médias dos formatos celulares encontrados.

Tabela 3. Caracterização microscópica dos isolados de leveduras de sorgo sacarino.

Formatos celulares			
Globular	Globular com pseudo-hifas	Elipsoide	Cilíndrica
--- % ---			
73	11	13	3

Verificando-se os dados referentes à análise microscópica, observa-se que o formato celular mais frequente foi o globular apresentando 73% dos isolados analisados. Nenhum representante foi encontrado com morfologia microscópica triangular e taloide.

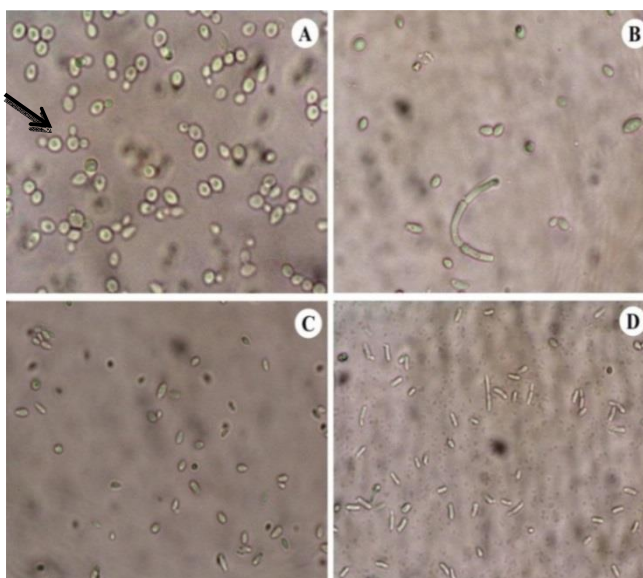


Figura 6. Aspectos morfológicos celulares. (A) globosas com destaque o brotamento multipolar; (B) globosas com pseudohifas; (C) elipsoides; (D) cilíndricas.

Baseando-se apenas nos dados morfológicos e microscópicos, não foi possível agrupar em gêneros os isolados de levedura deste trabalho. Contudo, esse resultado serve como ponto

de partida para elencar, num segundo momento, caracteres importantes que, quando confirmados por técnicas moleculares possam agrupar indivíduos de interesse nessas etapas de seleção de características potencialmente desejáveis num processo de obtenção de cepas com potencial biotecnológico.

4.2. Identificação e Diversidade Genética

4.2.1. Técnica ISSR (GTG)₅

A técnica de δ ISSR δ (Inter simple sequence repeat) foi eficiente para evidenciar polimorfismo entre os isolados estudados e as reações de amplificação apresentaram reprodutibilidade. A amplificação do DNA das leveduras com o primer (GTG)₅ gerou perfis de 3 a 15 fragmentos polimórficos (figura 6).

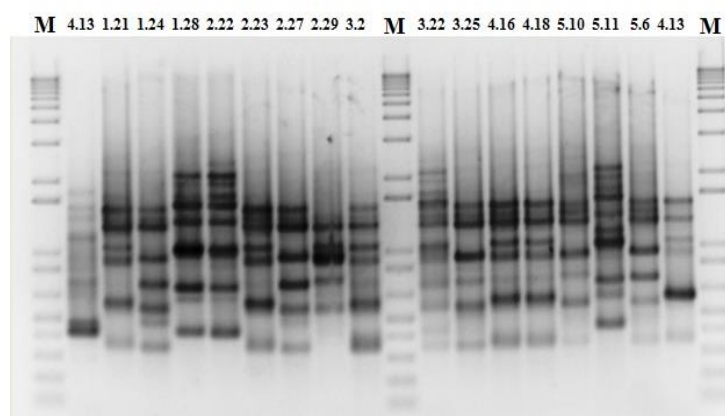


Figura 7. Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose de isolados de leveduras de sorgo sacarino, usando o primer GTG(5). Marcador de peso molecular: 1kb Invitrogen Plus.

A amplificação das cepas de leveduras isoladas a partir do iniciador (GTG)₅ demonstra a diversidade genética das leveduras isoladas neste trabalho (Figura 7).

Foram testadas algumas estratégias para agrupar os perfis genéticos em clusters coerentes. Primeiro, foram construídos dendrogramas com as 110 leveduras usando dois métodos de agrupamento baseados numa matriz binária de presença/ausência de bandas, δ UPGMA δ e método de δ Dice δ e δ UPGMA δ e método de δ Jaccard δ , mostrando diferenças

entre os grupos de cepas de leveduras. Porém, optou-se pelo método de Jaccard por apresentar mais coerência nos agrupamentos genéticos.

Para as análises dos dendrogramas foi estipulada uma linha de corte de 70% de similaridade entre os isolados (Figura 8).

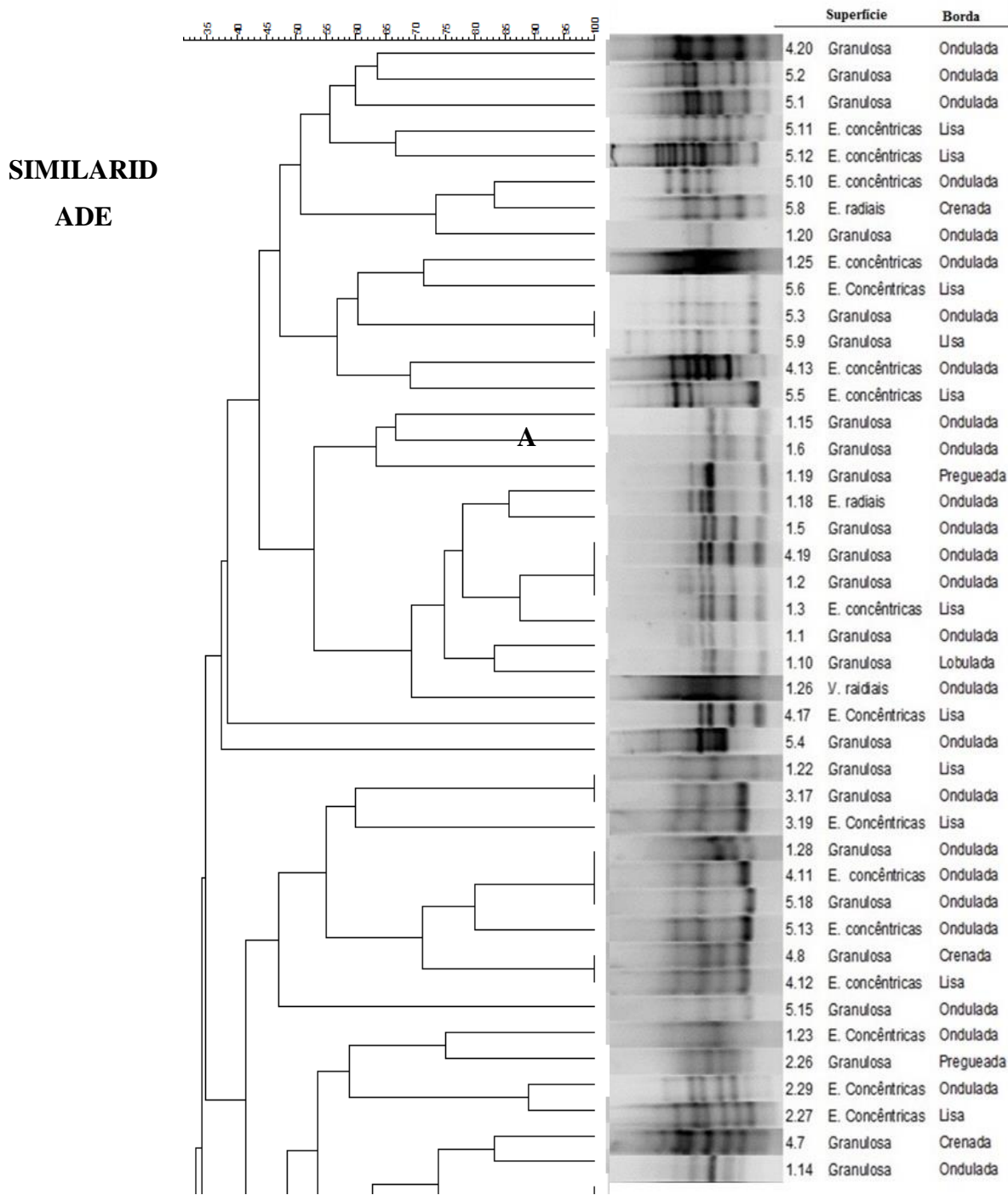


Figura 8. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J), a partir dos perfis gerados por ISSR obtidos de leveduras isolados de sorgo sacarino, com o iniciador GTG(5).

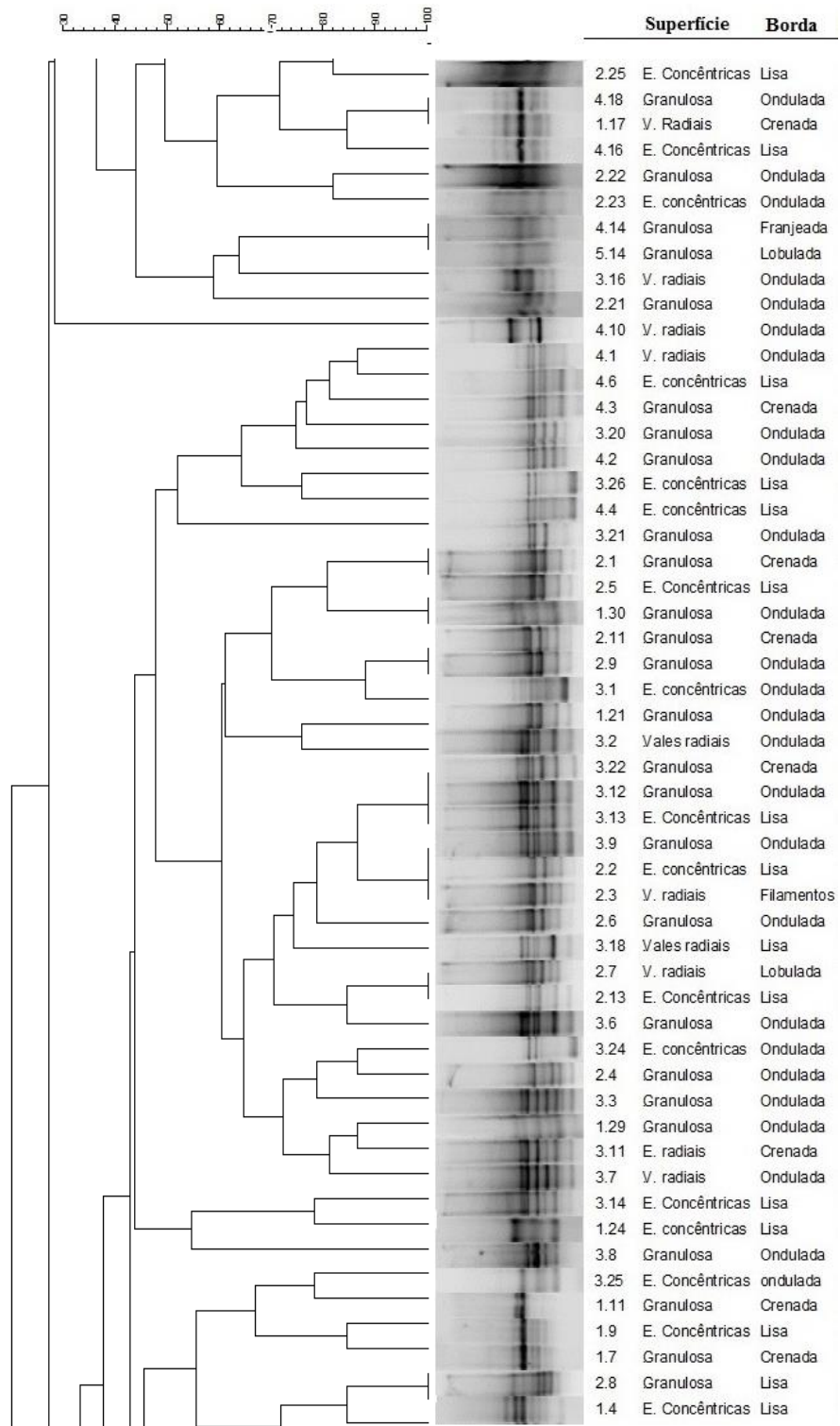


Figura 8. Continuação ó Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J), a partir dos perfis gerados por ISSR obtidos de leveduras isolados de sorgo sacarino, com o iniciador GTG(5).

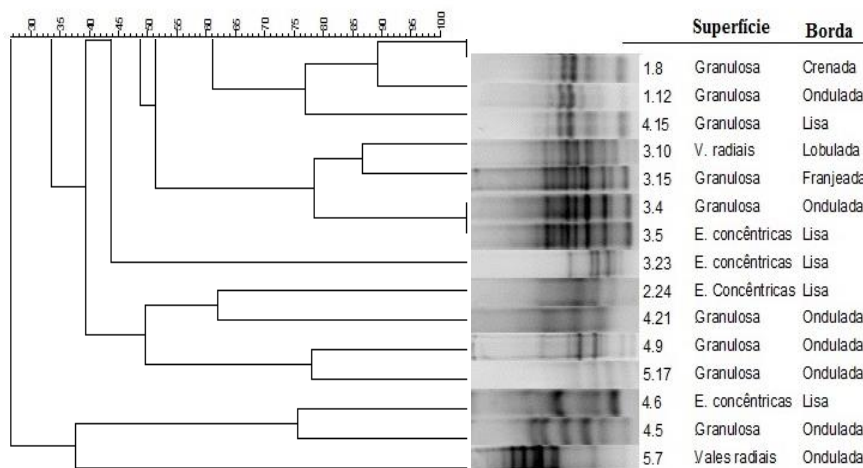


Figura 8. Continuação ó Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J), a partir dos perfis gerados por ISSR obtidos de leveduras isolados de sorgo sacarino, com o iniciador GTG(5).

A análise molecular dos géis de PCR das amostras, com o primer (GTG)₅, forneceu 15 grupos com 100% de similaridade entre os perfis de bandeamento (Figura 8). Com isso foi observada a formação de 18 clusters contendo 2 a 17 isolados.

A técnica MSP-PCR (Fingerprinting) resulta em padrão de bandas no gel que correlaciona o tamanho molecular das bandas. É possível que bandas com sequências diferentes tenham o mesmo padrão de mobilidade num gel de agarose, levando a uma identificação falsa positiva. Alguns clusters gerados pelo algoritmo agruparam isolados identificados como espécies diferentes por sequenciamento do gene 26S do DNA ribossomal. A cepa (5.10) agrupou no cluster de *Wickerhamomyces anomalus* (figura 8 cluster A), porém, foi identificada como *Torulaspora delbrueckii*. Uma possível explicação foi o baixo número de bandas obtidas para esta cepa (o isolado 1.20 somente apresentou duas bandas, o que reduz a resolução do algoritmo para separar os diferentes grupos genéticos). Espécies identificadas como *Candida intermedia* linhagens (1.28, 1.21, 1.24 e 4.9) ficaram agrupadas em clusters diferentes (figura 8 cluster B, C, D e E). Uma explicação sugerida estaria na baixa resolução das bandas.

Muitos trabalhos vêm utilizando a técnica de MSP-PCR para agrupamento de isolados recuperados de amostras ambientais, como uma ferramenta para diminuir a quantidade de isolados que serão sequenciados, uma vez que tem poder discriminatório para diferenciar linhagens ou espécies (Lasker & Ran, 2004).

O método de microssatélites, que utiliza sequências (primers) curtas de até seis nucleotídeos, os quais são encontrados no genoma de vários microrganismos, foi relatada como muito válida para *S. cerevisiae*; os resultados confirmaram o potencial deste marcador como ferramenta rápida e confiável para discriminação de levedura ao nível de linhagens e espécie (Baleiras-Couto et al., 1996; Silva-Filho et al., 2005).

Silva-Filho et al. (2005) recomendaram este primer (GTG)₅ para monitorar populações de leveduras em fermentações de bioetanol e selecionar cepas selvagens como *õstarterö*.

A técnica MSP-PCR *õFingerprintingö* baseada no primer (GTG)₅ foi usada em outros trabalhos e apresentou confiabilidade para este objetivo (Lieckfeldt et al., 1993; Baleiras-Couto et al., 1996; Torriani et al., 1999; Silva-Filho et al., 2005; Brito et al., 2007).

A representatividade deste primer foi avaliada por Brito et al. (2007) em espécies do grupo *Saccharomyces sensu stricto* e foi confirmada neste estudo usando três cepas, sendo uma delas identificada como *Saccharomyces cerevisiae*.

Pan et al. (2010) sugeriram que a fonte de variabilidade em trabalhos de análise de diversidade microbiológica usando biologia molecular envolve principalmente o método de extração de DNA e os reagentes usados na PCR. Estes mesmos autores avaliaram a reprodutibilidade da metodologia proposta simulando diferentes condições de laboratório, dois métodos de extração de DNA genômico e duas marcas de Taq polimerase, além de dois diferentes termocicladores, foram aplicados. Os resultados mostraram variação na intensidade das bandas e, como consequência, no seu número, mas não na distribuição do padrão de bandas amplificadas. Consequentemente, cepas da mesma espécie mostraram perfis genéticos definidos caracterizados por bandas do mesmo tamanho, diferindo de outras espécies em pelo menos uma banda intensa.

Segundo Gadanho et al. (2003), a técnica de *õISSRö* usando iniciador (GTG)₅ continua sendo uma abordagem interessante em estudos de ecologia de leveduras, pois na maioria dos casos gera dados rápidos e apurados.

A técnica MSP-PCR destaca-se pela sua simplicidade metodológica, baixo custo e resultados rápidos, em comparação com outras técnicas de biologia molecular como o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, ou polimorfismo no comprimento fragmento restrição). Por sua vez, a técnica MSP-PCR tem alta versatilidade e reprodutibilidade para a existência de iniciadores com diferentes graus de resolução, que permitem a diferenciação tanto de espécies como de subespécies (Libkind, 2007).

Muitos autores utilizaram primers de microssatélites para analisar a variabilidade genética em leveduras. Baleiras-Couto et al. (1996) utilizaram com sucesso os primers (GAC)₅ e (GTG)₅ para discriminar espécies do gênero *Zygosaccharomyces*, da mesma forma, Meyer et al. (1997) utilizaram os primers (GTG)₅ e (GACA)₄ para identificar espécies de *Candida*. Esses resultados enfatizam a importância da utilização desses marcadores moleculares como ferramenta auxiliar nos estudos taxonômicos.

Quando se comparam os resultados dos dados morfológicos com aqueles da identificação molecular, é possível identificar uma grande divergência entre os padrões classificatórios obtidos. Ao observar os agrupamentos não foi possível relacionar o perfil genético com as características morfológicas. É possível que eventos de evolução tenham convergido caracteres outrora distintos numa única classe de dados moleculares, que não são expressos morfológicamente, o que também pode ser uma das explicações para esse evento de dissimilaridade de resultados.

4.2.2. Sequenciamento do gene 26S do DNA ribossomal

A identificação molecular dos isolados de leveduras de sorgo sacarino foi realizada com base nas informações geradas pelo sequenciamento do domínio D1/D2 do gene 26S do DNA ribossomal, cujo fragmento possui aproximadamente 600 bp (figura 9).

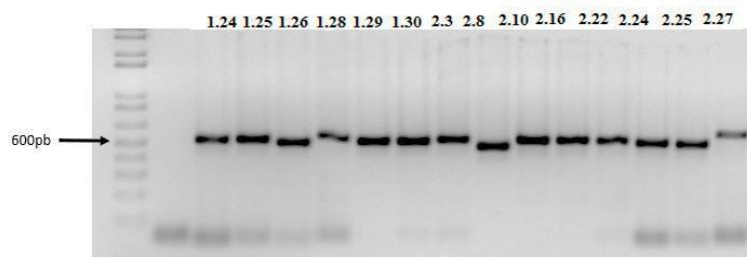


Figura 9. Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose de isolados leveduras de sorgo sacarino, usando os primers NL1 e NL4. Marcador de peso molecular: 1kb Invitrogen Plus.

Foram selecionadas 53 cepas de leveduras a partir da formação dos agrupamentos genéticos formados pelo iniciador (GTG)₅ para o sequenciamento no domínio D1/D2 do 26S rDNA. A identificação molecular das espécies encontra-se na Tabela 4, onde se observa as sequências do BLAST (Identidade %, Similaridade % e E-value).

Tabela 4. Identificação de leveduras isoladas de sorgo sacarino por sequenciamento da região D1/D2 do rDNA do gene 26S pela ferramenta BLAST no GenBank

Identificação (CLSS)	Identidade (%)	Número de acesso no Gen Bank *	Resultado Blast N
4.1	100%	JX129911	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
2.1	99%	KP171608	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
5.1	99%	JX183976	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
4.16	98%	KM521814	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
2.3	100%	JX129911	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
1.1	99%	KM521814	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
1.20	99%	KM521814	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
2.2	99%	KM521814	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
1.22	100%	KF612003	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
1.26	99%	KM246030	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
3.14	99%	HF952838	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
2.5	99%	HF952838	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
3.6	99%	KM521814	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
3.2	99%	KM655847	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
3.7	99%	KM521814	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
3.8	99%	KM521814	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
3.9	99%	KM521814	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
3.3	99%	KM521814	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
4.18	98%	KM521814	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
4.5	99%	KM521814	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
4.7	99%	KM521814	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
2.25	99%	KM521814	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
5.8	99%	KM521814	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
3.18	99%	KM521814	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
1.28	98%	FJ455102	<i>Candida intermedia</i>
1.24	98%	FJ455102	<i>Candida intermedia</i>
1.21	100%	KF830176	<i>Candida intermedia</i>
4.9	98%	FJ438479	<i>Candida intermedia</i>
4.8	99%	KF830179	<i>Candida oleophila</i>
4.10	99%	KF830179	<i>Candida oleophila</i>
4.13	98%	KJ746059	<i>Candida pyralidae</i>

3.24	99%	EU441895	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
2.23	99%	FN393992	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
2.24	97%	EU441895	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
2.22	98%	JX183959	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
1.30	99%	KF300891	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
2.27	99%	KF300891	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
2.29	99%	KF300891	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
3.26	99%	KF300891	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
3.5	98%	KM521824	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
3.1	99%	FN393992	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
4.4	99%	KP171607	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
5.10	99%	KF300891	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
5.11	99%	KF300891	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
5.6	99%	KF300891	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
4.14	99%	JQ686905	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
3.22	100%	JQ686901	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
1.2	99%	JQ686905	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
3.25	99%	JQ686905	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
1.29	98%	KM501442	<i>Pichia membranifaciens</i>
3.16	94%	KR558725	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
1.25	98%	KR558725	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3.4	98%	KR558725	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Foram identificados 6 gêneros, baseados nas análises de seqüências do gene 26S do DNA ribossomal comparadas com seqüências depositadas no GenBank, sendo eles: *Meyerozyma*, *Wickerhamomyces*, *Candida*, *Torulaspora*, *Pichia* e *Saccharomyces*. Todas as espécies encontradas pertencem ao Filo *Ascomycota*. A espécie dominante foi *Wickerhamomyces anomalus* com 24 cepas identificadas.

As espécies de leveduras obtidas a partir de plantas de sorgo sacarino apresentaram 100% de valor máximo de identidade comparado com as seqüências depositadas no GenBank para o gênero *Wickerhamomyces anomalus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida intermedia*, 99% de valor máximo de identidade para *Candida oleophila* e *Torulaspora delbrueckii* e 98% de identidade para *Pichia membranifaciens*, *Candida pyralidae* e *Saccharomyces cerevisiae* considerando o banco de dados do GenBank.

De acordo com Kurtzman & Robnett (1998), estes dados são considerados adequados para caracterizar um isolado em nível de espécie. O gene 26S é aquele que apresenta as seqüências menos conservadas, por isso foi selecionado para estudos de filogenia de espécies e grupos taxonômicos mais relacionados. A maioria das leveduras possui a região D1/D2 6S rDNA sequenciada (banco de dados altamente representativo) sendo, portanto, eficiente em

diferenciar quase todas as espécies de leveduras testadas visando a estudos de taxonomia (Kurtzman & Fell, 2006).

A predominância de *Wickerhamomyces anomalus* nas leveduras identificadas neste trabalho pode ser atribuída a sua capacidade de sobrevivência em uma variedade de nichos e sua ampla distribuição geográfica sugere um caráter generalista em contraste com microrganismos adaptados a um único habitat (Kurtzman & Suzuki, 2010).

4.2.3. Análise filogenética

A verificação das relações filogenéticas entre as leveduras isoladas de sorgo sacarino foi realizada através da árvore criada pelo método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e teste de bootstrap com 1000 replicatas com as sequências δ typoö (Figura 10).

Nota-se que a separação entre as espécies está bem delimitada. Ainda percebe-se a predominância da espécie *Wickerhamomyces anomalus* sob as demais. A maioria dos ramos ficou bem suportada com um valor de bootstrap acima de 69%.

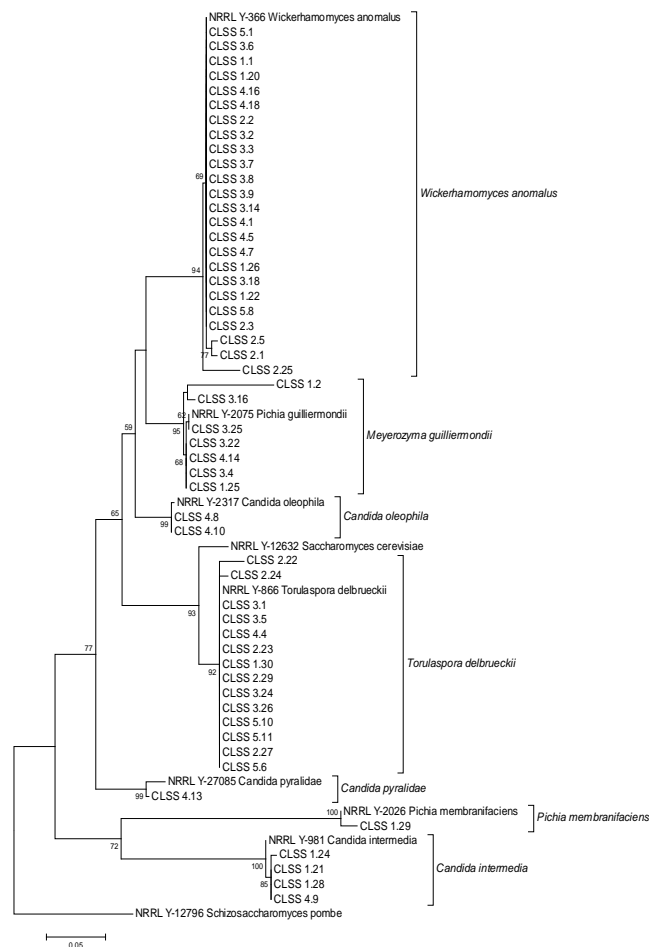


Figura 10. Árvore Filogenética, gerada a partir do sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S das leveduras isoladas de plantas de sorgo sacarino, derivada do método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e teste de bootstrap com 1000 replicatas. A espécie *Schizosaccharomyces pombe* foi usada como outgroup.

De forma geral, as sequências dos isolados que foram relacionadas às espécies *Typo* ficaram agrupadas, corroborando com sua identidade e separação taxonômica em relação a outros grupos. Entretanto, pode-se constatar divergências entre as prévias identificações nos alinhamentos entre as sequências obtidas de cada levedura e as de referência no GenBank, refletido pelas espécies de *saccharomyces cerevisiae* que foram agrupadas no clado de *Meyerozyma guilliermondii*. A análise de sequências de leveduras utilizando a ferramenta BLAST não possibilita a verificação da identidade das sequências em relação a sequências homólogas, essa é uma ferramenta prática devido à rapidez e facilidade de interpretação dos resultados. Por outro lado, a identidade das sequências depositadas no banco de dados de

sequências nucleotídicas do GenBank não é 100% confiável, devido a não existir um sistema de curadoria das sequências depositadas. Por este motivo, não se pode confiar totalmente nos resultados de identificação obtidos pela ferramenta BLAST.

A levedura *Wickerhamomyces anomalus* (anteriormente *Hansenula anomala*, *Pichia anomala*) pode ser encontrada em ambientes naturais e em diversas fontes de fermentações (Kurtzman & Fell, 2006; Kurtzman & Suzuki, 2010). Sua capacidade de suportar condições adversas, crescer em ambientes estressantes e metabolizar um grande número de fontes de carbono e nitrogênio tem explicado sua versatilidade fisiológica (Kurtzman & Fell, 1998). Esta levedura foi isolada a partir de muitos habitats diversificados e apresentou resistência fisiológica, em relação a ambientes estressantes como em pH extremos e altas temperaturas (Walker, 2010). *W.anomalus* é uma levedura altamente competitivo e pode inibir uma variedade de outros microrganismos devido principalmente à sua atividade antimicrobiana, que é tradicionalmente visto como um agente de biocontrole (Schnürer & Jonsson, 2010; Jijakli, 2011). Outras aplicações potenciais desta levedura são a produção de enzimas (exemplo fitase), biocombustíveis e biorremediação (Walker, 2010).

O gênero *Meyerozyma* foi criado em 2010 com o intuito de recolocar as espécies de *Pichia guilliermondii* e *Pichia caribbica* em um novo gênero, pois divergiam das demais espécies as quais estavam relatadas em um gênero em comum. Atualmente são aceitas duas espécies dentro desse gênero, sendo: *Meyerozyma guilliermondii* e *Meyerozyma caribbica* (Kurtzman & Suzuki, 2010). Os resultados encontrados neste trabalho coincidem com o isolamento e identificação de outros referentes ao isolamento de *Meyerozyma guilliermondii*, em bebidas fermentadas (Papalexandratou & Vuyst, 2011; Hidalgo, 2012). Estas espécies também são citadas na literatura como produtoras de xilitol (Rao et al., 2007).

Cepas de leveduras da espécie de *Torulaspora delbrueckii* mostram uma variação considerável nas suas capacidades a fermentar e assimilar compostos de carbono, como galactose ou maltose (Kurtzman & Fell, 1998), e baixa capacidade fermentativa (Hernandez-Lopez et al., 2002). Além de tudo isso, existe uma falta de conhecimento sobre a fisiologia e biologia molecular deste organismo. Apesar da proximidade filogenética desta levedura com a de *S.cerevisiae*, as diferenças observadas entre as duas espécies demonstram que o comportamento de *T.delbrueckii* não pode ser diretamente inferida a partir de que de *S. cerevisiae*. (Milkowski et al., 2001).

O gênero *Candida* tornou-se um dos mais significativos em número de espécies, presente em quase todos os ambientes. As leveduras do gênero são abundantemente distribuídas na natureza em terra e mar, associadas com animais ou plantas e objetos inanimados. Este gênero compreende as espécies associadas com os seres humanos e outros mamíferos, com o trato gastrointestinal e genital sendo a fonte mais frequente na maioria dos animais (Frutos et al., 2004).

As leveduras apresentam vantagens sobre outros microrganismos exercendo função de biocontrole, são consideradas como agentes de controle potencialmente efetivos, devido a sua adaptação fenotípica e a habilidade de colonização e competição por nutrientes e espaço (Janisiewicz & Korsten, 2002). E, portanto, existem inúmeras espécies já identificadas e aplicadas no biocontrole de doenças pós-colheita (Shama & Singh, 2009). O microparasitismo foi observado na interação das leveduras *Wickerhamomyces anomalus* e *Meyerozyma guilliermondii* penetrando e causando perda de turgescência nas paredes celulares das hifas de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão (Lima et al., 2013). Destaca-se a importância do fenômeno *õKillerö* ou *õproteínas killerö* ou ainda *õtóxicas killerö* desenvolvido por leveduras ao produzirem e excretarem proteínas ou glicoproteínas inibidoras de células microbianas sensíveis. O fenômeno *õkillerö* foi descoberto em *Saccharomyces cerevisiae*, pouco tempo depois se tornou evidente que esse mecanismo *õkillerö* não se restringia unicamente ao gênero *Saccharomyces*, podendo sim ser encontrado, em muitos outros gêneros de leveduras. Dentre as leveduras produtoras de toxinas killer foram identificadas em *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Ustilago*, *Torulopsis*, *Williopsis* e *Zygosaccharomyces*, indicando que o fenômeno *õkillerö* é de fato generalizado entre leveduras (Castoria et al., 2003).

O gênero *Pichia* produz toxinas *õKillerö*, possuindo diferentes mecanismos de atividade. A levedura *P. membranifaciens* produz uma toxina killer (PMKT) que está ativa na deterioração de leveduras e fungos filamentosos (Santos et al., 2004).

4.3. Capacidade de Utilização de Fontes de Carbono por Biolog em Leveduras de Sorgo Sacarino

As microplacas *öBiologö* baseiam-se em testes de oxidação de 95 fontes de carbono incluindo álcoois, compostos poliméricos, açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos, presentes em microplacas com 96 poços.

De acordo com o padrão de utilização de substrato via sistema de *öbiolog GNö*, observou-se que todas as linhagens analisadas foram capazes de utilizar os substratos, L-Arabinose, D-Arabitól, D-Celobiose, D-Frutose, D-Galactose, Gentiobiose, -D-Glucose, D-Mannose, -Metil- D-Glucosídeo, D-Rafinose, Sacarose, D-Trealose, Turanose. Por outro lado, as fontes, N-Acetil-D-galactosamina, Adonitol, m-Inositol, -D-Lactose, L-Rhamnose, Ácido Cítrico, Ácido Fórmico, Ácido D-galactônico lactona, Ácido D-Glucosamínico, Ácido D-Glucurônico, Ácido -Hidroxitubúrico, Timidina, Ácido -Cetoglutárico foram pouco utilizadas.

Observaram-se padrões de utilização de fontes de carbono bem distintos entre as linhagens selecionadas. As análises de variância mostraram diferenças significativas entre os genótipos (Tabela 5).

Tabela 5. Diversidade funcional de leveduras avaliada através do índice de diversidade de Shannon (H), riqueza de substrato (S), equidade de substrato (E) para 95 fontes de carbono da microplaca GN2 Biolog. Valores médios de três repetições.

Linhagem CLSS	Espécie	Atividade Total	S	H	E
2.25	<i>M.guillermundii</i>	18.063 a	27.000 b	2.504 c	0.820 c
4.16	<i>M.guillermundii</i>	25.956 b	36.000 b	1.639 b	0.730 b
4.10	<i>C.oleophila</i>	57.706 d	47.333 c	2.372 c	0.7600 b
1.28	<i>C.intermedia</i>	34.213 b	46.666 c	2.434 c	0.746 b
5.14	<i>C.intermedia</i>	68.630 d	39.000 b	1.843 b	0.7500 b
1.26	<i>W.anomalous</i>	21.563 b	25.666 b	2.191 c	0.746 b
2.3	<i>W.anomalous</i>	38.870 c	26.666 b	2.344 c	0.750 b
3.2	<i>W.anomalous</i>	38.843 c	38.666 c	1.889 b	0.750 b
3.9	<i>W.anomalous</i>	32.020 b	31.333 b	1.498 b	0.703 b
4.6	<i>W.anomalous</i>	10.630 a	18.333 a	1.360 b	0.790 c
5.7	<i>W.anomalous</i>	18.770 a	22.666 b	1.998 c	0.736 b
3.26	<i>T.delbrueckii</i>	2.660 a	5.333 a	0.409 a	0.536 a
2.24	<i>T.delbrueckii</i>	30.543 b	30.000 b	1.623 b	0.730 b
5.6	<i>T.delbrueckii</i>	26.873 b	26.333 b	1.764 b	0.760 b
1.29	<i>P.membranifaciens</i>	41.096 c	57.666 c	3.030 c	0.750 b

As médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Os valores obtidos para atividade total variam para cada isolado testado e equivale à soma das atividades observadas em cada microplaca GN2 utilizada, que possui 95 fontes de carbono. Considerando-se para este padrão que as linhagens variaram de 2.660 a 68.630 respectivamente, e o maior valor encontrado foi para a linhagem 5.14.

O número de substratos utilizado pelas amostras pode ser descrito como Riqueza de Substrato (S) (Zak et al., 1994). Em relação a S, houve variação de 5.333 a 57.666 os isolados 1.29 e 4.10 obtiveram maior número, tendo estes utilizados mais de 40 substratos.

O valor de H varia entre 0 e 4, os resultados variaram de 0.409 a 3.030 resultando numa maior diversidade no uso das fontes de carbono pela cepa 1.29.

As linhagens que obtiveram maior uso das fontes de carbono identificadas pelo sequenciamento do gene 26S pertencem às espécies de *Pichia membranifaciens* 1.29. Ressalta-se que as metodologias empregadas em estudos convencionais e as realizadas no presente trabalho dificultam ou até mesmo impossibilitam a sua comparação. Isto se deve ao fato de que em grande parte dos estudos foram utilizados métodos microbiológicos convencionais para determinar a habilidade de utilizar fontes de carbono, enquanto neste trabalho optou-se pelas vantagens do sistema Biolog GN por ser um teste rápido e eficaz na avaliação de perfis metabólicos.

4.4. Capacidade de Produção de Etanol por Leveduras de Sorgo Sacarino

A produção de etanol pelas linhagens selecionadas apresentou diferenças significativas nas análises de variância (Tabela 6).

Tabela 6. Produtividade de etanol das 34 cepas de leveduras isoladas de sorgo sacarino, em 48 horas de fermentação, em meios YEPD, fonte Glucose.

Linhagem CLSS	Concentração ng/μl	Linhagem CLSS	Concentração ng/μl
1.24	4.403 a	3.4	3.370 a
1.25	6.003 b	3.5	4.430 a
1.26	4.613 a	3.6	5.450 b
1.28	6.140 b	3.9	3.780 a
1.29	5.690 b	3.16	6.453 b

1.30	4.370 a	3.22	4.416 a
2.3	6.253 b	3.26	6.546 b
2.8	5.173 a	4.3	6.463 b
2.10	4.396 a	4.5	4.183 a
1.21	9.166 b	4.6	5.643 b
2.22	4.010 a	4.8	4.500 a
2.24	4.913 a	4.10	6.463 b
2.25	4.623 a	4.16	6.776 b
2.27	5.176 a	5.6	5.900 b
2.29	5.926 b	5.7	5.670 b
3.1	4.046 a	5.11	5.900 b
3.2	5.230 a	5.14	6.686 b

As médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Scott-Knott a 5% de significância.

A produção de etanol pelas cepas de leveduras analisadas variou de 3.370 ng/ μ l a 9.166 ng/ μ l (Tabela 5). Verificou-se que a produção de etanol foi superior nas linhagens 1.21 (9.166 ng/ μ l) e 4.16 (6.776 ng/ μ l). Por meio da identificação molecular estes isolados correspondem às espécies de *Candida intermedia* e *Wicherhamomyces anomalus*.

Diversos fatores afetam o rendimento da fermentação, tais como a temperatura, a concentração de nutrientes, a presença de inibidores e o microrganismo fermentador. As leveduras afetam diretamente o desempenho do processo fermentativo, seja pela concentração a ser inoculada, pela espécie, linhagem e até mesmo por sofrer contaminação bacteriana (Lima & Amorim, 2001).

Como demonstrado por Oliveira et al. (2004), o desempenho fermentativo de uma determinada linhagem é importante para que esta possa dominar o processo de fermentação.

As espécies *Candida oleophila*, *Candida intermedia*, *Meyerozyma guilliermondii*, entre outras espécies do gênero *Rhodotorula* podem ser encontradas na literatura com resultados positivos referentes à assimilação de glicose e xilose. Além disso, espécies encontradas nesse trabalho, como *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia membranifaciens* e *Candida intermedia*, são mencionadas na literatura como capazes de produzir etanol a partir de xilose (Gong et al., 1981; Kurtzman & Fell, 1998; Sreenath & Jefries, 2000; Bhadra et al., 2008).

As leveduras encontradas neste trabalho foram relatadas como iniciantes das primeiras fases do processo de fermentação em vinificação com *S.cerevisae*. (Combina et al., 2005; Zott et al., 2008).

A levedura *Pichia membranfaciens* encontrada neste trabalho também foi isolada por Oliveira-Abrão et al. (2009) no isolamento de leveduras presente em silagem de sorgo.

5. CONCLUSÃO

Há ocorrência e diversidade morfológica, genética e metabólica em leveduras associadas a plantas de sorgo sacarino cultivados no cerrado.

As características fenotípicas não foram correlacionadas aos padrões moleculares.

A técnica de fingerprinting utilizando o iniciador GTG₅ constitui uma estratégia eficiente para acessar a variabilidade intra e interespecífica de isolados de leveduras obtidas de plantas de sorgo sacarino.

A partir da identificação taxonômica realizada por sequenciamento do gene 26S do rDNA. As espécies de *Wickerhamomyces anomalus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida intermedia*, *Candida oleophila*, *Candida pyralidae*, *Torulaspota delbrueckii* e *Pichia membranifaciens*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-BANAT, B.M.A.; HOSHIDA, H.; ANO, A.; NONKLANG, S.; AKADA, R. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures

become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.85, n.4, p.861-867, Jan. 2010.

ALBUQUERQUE, C.J.B.; TARDIN, F.D.; PARRELLA, R.A. da C.; GUIMARÃES, A. de S.; OLIVEIRA, R.M. de; SILVA, K.M. de J. Sorgho sacarino em diferentes arranjos de plantas e localidades de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.11, n.1, p.69-85, 2012.

ALMODARES, A.; HADI, M.R.; AHMADPOUR, H. Sorghum stem yield and soluble carbohydrates under phenological stages and salinity levels. **African Journal of Biotechnology**, v.7, p.4051-4055, 2008.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, n.3, p.403-410, 1990.

ALVINO, F.C.G.; WANDERLEY, J.A.C.; BRITO, M.E.B.; BARRETO, C.F.; FERNANDES, P.D.; LEITE, D.T. Rendimento de fitomassa do sorgo sacarino sob sistemas de captação de água em situação. **Revista Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.8, n.2, p.54-59, 2012.

ALVIRA, P.; TOMÁS PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v.101, n.13, p.4851-4861, July 2010.

ARIAS, C.R.; BURNS, J.K.; FRIEDRICH, L.M.; GOODRICH, R.M.; PARISH, M.E. **Yeast species associated with orange juice**: evaluation of different identification methods. Gainesville: Citrus Research and Education Center, 2002.

BALEIRAS COUTO, M.M.; EIJSMA, B.; HOFSTRA, H.; HUISINTVELD, J.H.J.; VAN DER VOSSSEN, J. Evaluation of molecular typing techniques to assaying genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.41-46, 1996.

BANTILAN, M.C.S.; DEB, U.K.; GOWDA, C.L.L.; REDDY, B.V.S.; OBILANA, A.B.; EVENSON, R.E. (Ed.). **Sorghum genetic enhancement**: research process, dissemination and impacts. Andhra: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 2004. 320 p.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeast characteristics and identification**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. 1200p.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts**: characteristics and identification. London: Cambridge, 1986. 811 p.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts**: characteristics and identification. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 597 p.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts**: characteristics and identification. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 790 p.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. *Candida rugosa* Lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. **Yeast**, v.14, p.1069-1087, 1998.

BHADRA, B.; RAO, S.R.; SINGH, P.K.; SARKAR, P.K.; SHIVAJI, S. Yeasts and yeast-like fungi associated with the bark of trees: diversity of yeasts and identification of yeasts producing extracellular endo-xylanases. **Current Microbiology**, v.56, p.489-494, 2008.

BREUER, U.; HARMS, H. *Debaryomyces hansenii*: an extremophilic yeast with biotechnological potential. **Yeast**, v.23, p.415-437, 2006.

BRITO, S.K.; BASILIO, A.C.M.; RAMOS, B.T.; SIMÕES, D.A.; SILVA-FILHO, E.A. da; MORAIS JUNIOR, M.A. de. Identification of yeasts within *Saccharomyces sensu stricto* complex by PCR-fingerprinting. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, p.1613-1620, 2007.

CARUSO, M.; FIORE, C.; CONTURSI, M.; SALZANO, G.; PAPARELLA, A.; ROMANO, P. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, n.2, p.159-163, Mar. 2002.

CASALONE, E.; BARBERIO, C.; CAPPELLINI, L.; POLSINELLI, M. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* natural populations for pseudohyphal growth and colony morphology. **Research in Microbiology**, v.156, p.191-200, 2005.

BASÍLIO, A.C.M.; ARAÚJO, P.R.L. de; MORAIS, J.O.F.; SILVA FILHO, E.A. da; MORAIS JUNIOR, M.A. de; SIMÕES, D.A. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current Microbiology**, v.56, n.4, p.322-326, 2008.

CASTORIA, R.; CAPUTO, L.; CURTIS, F. Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: a possible new mechanism of action. **Phytopathology**, v.93, p.564-572, 2003.

COLWELL, R.R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. **Journal of Bacteriology**, v.104, n.1, p.410-433, 1970.

COMBINA, M.; ELÍA, A.; MERCADOA, L.; CATANIA, C.; GANGA, A.; MARTINEZ, C. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v.99, p.237-243, 2005.

CONSOLO, V.F.; MONACO, C.I.; CORDO, C.A.; SALERNO, G.L. Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.1389-1398, 2012.

DALVI, U.S.; CHAVAN, U.D.; SHINDE, M.S.; GADAKH, S.R. Effect of staggered planting on stalk yield, sugar content and ethanol yield of sweet Sorghum for increasing Harvest Window. **Sugar Tech**, v.14, n.2, p.144-147, 2012.

DEAK, T. Ecology and biodiversity of yeasts with potencial value in biotechnology. In: SATYANARAYANA, T.; KUNZE, G. (Ed.). **Yeasts biotechnology: diversity and applications**. New York: Elsevier, 2009. p.151-168.

DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F. Isolamento e identificação de leveduras. In: MOREIRA, F.M.S.; HUISING, E.J.; BIGNELL, D.E. (Ed.). **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA, 2010. p.145-148.

DONEGAN, K.K.; PALM, C.J.; FIELAND, V.J.; PORTEOUS, L.A.; GANIO, L.M.; SCHALLER, D.L.; BUCAO, L.Q.; SEIDLER, R.J. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. kurtaki endotoxin. **Applied Soil Ecology**, v.2, p.111-124, 1995.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Sorgo Sacarino: tecnologia agrônômica e industrial para alimentos e energia: leveduras para produção de etanol de sorgo sacarino. **Revista Agroenergia**, ano 2, n.3, p.29-33, ago. 2011.

FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Projeções para o agronegócio brasileiro**. São Paulo, 2015. 92p.

FELL, J.W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.1351-1371, 2000.

FERNANDEZ-ESPINAR, M.T.; MATRORELL, P.; DE LLANOS, R.; QUEROL, A. Molecular methods to identify and characterize yeasts in foods and beverages. In: QUEROL, A.; FLEET, G.H. (Ed.). **The yeast handbook-yeasts in food and beverages**. Berlin: Springer-Verlag, 2006. p.55-82.

FERREIRA, L.L. **Isolamento e caracterização de leveduras fermentadoras de D-xilose e produtoras de xilanases associadas à madeira e bagaço de cana em decomposição**. 2010. 39p. Monografia (Pós-Graduação)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FISCHER, G.; TEIXEIRA, E.; HIZNSYIK, E.T.; VELTHUZEN, H.V. Land use dynamics and sugarcane production. In: ZUUBIER, P.; VAN DE VOOREN, J. (Ed.). **Sugarcane ethanol**. Amsterdam: Wageningen Academic, 2008. p.25-35.

FLEET, G.H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast Research**, v.8, p.979-995, 2008.

FONTES, M.M.; SILVA, B.A.; DANTAS, J.P.; SILVEIRA, D.C.; CAVALCANTI, M.T. Caracterização físico-química do melado de sorgo granífero sacarino [Sorghumbiolor (L) Moench]. **Revista Verde**, v.6, n.1, p.216-219, 2011.

FRUTOS, R.L.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, T.M.; QUEROL, A. Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.85, p.175-185, 2004.

FURTADO, A.T.; SCANDIFFIO, M.I.G. A promessa do etanol no Brasil. **Visages de l'Amérique Latine**, v.5, p.95-106, 2007.

GADANHO, M.; ALMEIDA, J.M.G.C.F.; 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, p.217-227, 2003.

GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.2351-2359, 1991.

GELLISSEN, G.; KUNZE, G.; GAILLARDIN, C.; CREGG, J.M.; BERARDI, E.; VEENHUIS, M.; VAN DER KLEI, I. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica*: a comparison. **FEMS Yeast Research**, v.5, p.1079-1096, 2005.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v.315, p.808-810, 2007.

GONÇALVES, R.C.; SIQUEIRA, F.L.T.; MATA, J.F. da; VIERA, G.E.G. Desafios e perspectivas da produção de etanol no Brasil: uma revisão. **Revista Liberato**, v.12, n.18, p.107-206, jul./dez. 2011.

GONG, C.S.; CHEN, L.F.; FLINCKINGER, M.C.; CHIANG, L.C.; TSAO, G.T. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.41, n.2, p.430-436, 1981.

GRIFFITHS, B.S.; GEOGHEGAN, I.; ROBERTSON, W.M. Testing genetically engineered potato, producing the lectins GNA and ConA, on non-target soil organisms and processes. **Journal of Applied Ecology**, v.37, p.159-170, 2000.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v.4, n.1, 2001. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em: 20 dez. 2015.

HERNANDEZ-LOPES, M.J.; PIETRO, J.Á.; RANDEZ-GIL, F. Isolation and characterization of the gene URA3 encoding the orotidine-5-phosphate decarboxylase from *Torulaspora delbrueckii*. **Yeast**, v.19, p.113-114, 2002.

HESHAM, A.E.L.; WAMBUI, V.; OGOLA, J.O.H.; MAINA, J.M. Phylogenetic analysis of isolated biofuel yeasts based on 5.8S-ITS rDNA and D1/D2 26S rDNA sequences. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.12, p.37-43, 2014.

HIDALGO, C. Identification of yeast and acetic acid bacteria isolated from the fermentation and acetification of persimmon (*Diospyros kaki*). **Food Microbiology**, v.30, n.1, p.98-104, May 2012.

JANISIEWICZ, W.J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review of Phytopathology**, v.40, p.411-444, 2002.

JARDINE, J.G.; PERES, M.R.; DISPATO, I. **Indicações de aspecto tecnológico sobre o bioetanol de matéria-prima amilácea**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2009. 23p.

JIJAKLI, M.H. *Pichia anomala* in biocontrol for fruits: 20 years of fundamental and practical research. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.99, p.93-105, 2011.

JOHNSON, E.A.; ECHAVARRI-ERASUN, C. Yeast biotechnology. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. (Ed.). **The yeasts: a taxonomic study**. 5th ed. New York: Elsevier, 2011. p.626-627.

KAHAR, P.; TANAKA, S. A xylose-fermenting yeast hybridized by intergeneric fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida intermedia* mutants for ethanol production. **Kahar and Tanaka Sustainable Chemical Processes**, v.2, p.17, 2014.

KIM, J.S.; PARK, S.C.; KIM, J.W.; PARK, J.C.; PARK, S.M.; LEE, J.S. Production of bioethanol from lignocellulose: status and perspectives in Korea. **Bioresource Technology**, v.101, p.4801-4805, 2010.

KIRSOP, B.E.; KURTZMAN, C.P. **Yeast**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 233p.

KOLLING, D.F. **Determinação da localização de uma planta multi-produto no Estado do Mato Grosso com base na eficiência da produção de etanol**. 2012. 74f. Dissertação (Mestrado)-Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócios, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KURTZMAN, C.P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of *Saccharomycetaceae* and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Naumovia*, *Vanderwaltzzyma* and *Zygotoruspora*. **FEMS Yeast Research**, v.4, p.233-245, 2003.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **Yeast systematics and phylogeny: implications of molecular identification methods for studies in ecology**. New York: Springer, 2006. 695p.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The yeasts, a taxonomic study**. 4th ed. New York: Elsevier, 1998. 695p.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts, a taxonomic study**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2011. v.2, 1062p.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.73, p.331-371, 1998.

KURTZMAN, C.P.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera Babjeviella, Meyerozyma, Millerozyma, Priceomyces, and Scheffersomyces. **Mycoscience**, v.51, p.2-14, 2010.

LAOPAIBOON, P.; LAOPAIBOON, L.; KHONGSAY, N. Growth and batch ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on sweet sorghum stem juice under normal and very high gravity conditions. **Biotechnology**, v.9, n.1, p.9-16, 2010.

LASKER, B.A.; RAN, Y. Analysis of polymorphic microsatellite markers for typing *Penicillium marneffei* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.1483-1490, 2004.

LIBKIND, D. Evaluación de la técnica de MSP-PCR para la caracterización molecular de aislamientos de *Rhodotorula mucilaginosa* provenientes de la Patagonia noroccidental. **Revista Argentina de Microbiología**, v.39, p.133-137, 2007.

LIBKIND, D.; BRIZZIO, S.; RUFFINI, A.; GADANHO, M.; VAN BROOCK, M.R.; SAMPAIO, J.P. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.84, p.313-322, 2003.

LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BÖNER, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. **Journal of Basic Microbiology**, v.33, p.413-426, 1993.

LIMA, J.R.; GONDIM, D.M.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; OLIVEIRA, L.R.B.; GONÇALVES, L.R.B.; VIANA, F.M.P. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, v.83, p.58-64, 2013.

LIMA, U.A.B.; AMORIM, H.V. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v.3.

LIU, B.; WENDEL, J.F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, v.1, p.205-208, 2001.

LIU, P.; LUO, L.; LONG, C.A. Characterization of competition for nutrients in the biocontrol of *Penicillium italicum* by *Kloeckera apiculata*. **Biological Control**, v.67, p.157-162, 2013.

- LIU, R.; SHEN, F. Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308). **Bioresource Technology**, v.99, n.4, p.847-854, 2008.
- MEYER, W.; LATOUCHE, G.N.; DANIEL, M.H.; THANOS, T.G.; MITCHELL, D.; YARROW, G.; SORRELL, T.C. Identification of pathogenic yeasts of the imperfect genus *Candida* by PCR-fingerprinting. **Electrophoresis**, v.18, p.1548-1559, 1997.
- MEYER, W.; MITCHELL, T.G. Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. **Electrophoresis**, v.16, n.9, p.1648-1656, 1995.
- MILKOWSKI, C.; KRAMPE, S.; WEIRICH, J. Feedback regulation of glucose transporter gene transcription in *Kluyveromyces lactis* by glucose uptake. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.5223-5229, 2001.
- MORAIS, G.C.; CADETE, R.M.; UETANABARO, A.P.T.; ROSA, L.H.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. **Fungal Genetics and Biology**, v.60, p.9-28, 2013.
- MOREIRA, J.R.; FÁVARO, C. de L. Leveduras para produção de etanol de sorgo sacarino. **Agroenergia em Revista**, ano 2, n.3, p.29-48, ago. 2011.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **BLASTN**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 10 nov. 2015.
- NAUMOVA, E.S.; KORSHUNOVA, I.V.; JESPERSEN, L.; NAUMOV, G.I. Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. **FEMS Yeast Research**, n.1531, p.1-8, 2003.
- OLIVEIRA, E.S.; ROSA, C.A.; MORGANO, M.A.; SERRA, G.E. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, n.1, p.19-24, Feb. 2004.
- OLIVEIRA-ABRÃO, F.; FREITAS, C.E.S.; SILVA, K.L.; OLIVEIRA, L.N.; ALMEIDA, P.N.M.; GERASEEV, L.C.; DUARTE, R.B.; MEDEIROS, A.O. Quantificação e isolamento de leveduras presentes em silagem de sorgo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2009, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, 2009. p.1-2.
- PAN, Y.; BODROSSY, L.; FRENZEL, P.; HESTNES, A.G.; KRAUSE, S.; LÜKE, C.; MEIMA-FRANKE, M.; SILJANEN, H.; SVENNING, M.M.; BODELIER, P.L. Impacts of inter- and intralaboratory variations on the reproducibility of microbial community analyses. **Applied Environmental Microbiology**, v.76, n.22, p.7451-7458, 2010.

PAPALEXANDRATOU, Z.; VUYST, L. Assessment of the yeast species composition of Cocoa bean fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis. **FEMS Yeast Research**, v.11, n.7, p.564-574, Nov. 2011.

PARRELLA, R.A.C. Melhoramento genético do sorgo sacarino. **Agroenergia em Revista**, v.3, p.8-9, 2011.

PARRELLA, R.A.C.; MENEGUCI, J.L.P.; RIBEIRO, A.; SILVA, A.R.; PARRELLA, N.N.L.D.; RODRIGUES, J.A. dos S.; TARDIN, F.D.; SCHAFFERT, R. E. Desempenho de cultivares de sorgo sacarino em diferentes ambientes visando a produção de etanol. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010, Goiânia. **Anais** Goiânia: UFG, 2010. 1 CD-ROM.

PRETORIUS, I.S.; TOIT, M.; VAN RENSBURG, P. Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century. **Food Technology and Biotechnology**, v.41, p.3-10, 2003.

PRETORIUS, I.S.; VAN DER WESTHUIZEN, T.J.; AUGUSTYN, O.P.H. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v.20, p.61-74, 1999.

RAO, R.S.; BHADRA, B.; SHIVAJI, S. Isolation and characterization of xylitol-producing yeasts from the gut of colleopteran insects. **Current Microbiology**, v.55, n.5, p.441-446, Nov. 2007.

REDDY, B.V.; RAMESH, S.; REDDY, P.S.; RAMAIAH, B.; SALIMATH, M.; KACHAPUR, R. Sweet sorghum: a potential alternate raw material for bio-ethanol and bio-energy. **Sorghum Millets Newsletter**, v.46, p.79-86, 2005.

RIBAS, P.M. **Importância econômica: cultivo do sorgo**. 4.ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 4p.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÉCHE, B.; LONVAUD-FUNEL, A. **Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications**. 2nd ed. London: J. Wiley, 2006. v.1, 497p.

RICHARD, G.F.; KERREST, A.; DUJON, B. Comparative genome and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.72, n.4, p.686-727, 2008.

SALLES, G.; BUSO, C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S. **Desenvolvimento e aplicação de marcadores microssatélites em Maçaranduba**. Brasília, DF: Embrapa, 2003. 25p. (Circular Técnica Embrapa, 20).

SANTOS, A.; SANCHEZ, A.; MARQUINA, D. Yeasts as biological agents to control Botrytis cinerea. **Microbiological Research**, v.159, n.4, p.1879-1892, 2004.

SCHNÜRER, J.; JONSSON, A. *Pichia anomala* J121: a 30-year overnight near success biopreservation story. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.99, n.1, p.5-12, Jan. 2010.

SCHULLER, D.; VALERO, E.; DEQUIN, S.; CASAL, M. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. **FEMS Microbiology Letters**, v.231, p.19-26, 2004.

SHAMA, R.R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. **Biology Control**, v.50, p.205-221, 2009.

SILVA-FILHO, E.A.; SANTOS, B.S.K.; RESENDE, A.M.; MORAIS, J.O.; MA, J.R.; SIMÕES, A.D. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, n.88, p.13-23, 2005.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MEDEIROS, A.B.P. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v.101, n.13, p.4820-4825, July 2010.

SPERANDIO, E.M. **Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a plantas do Cerrado**. 2012. 93p. Dissertação (Mestrado)-Universidade de Brasília, Brasília.

SREENATH, H.K.; JEFFRIES, T.W. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. **Bioresource Technology**, v.72, p.253-260, 2000.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.2731-2739, May 2011.

TESFAYEA, M.; DUFAULT, N.S.; DORNBUSCH, M.R.; ALLAN, D.L.; VANCE, C.P.; SAMAC, D.A. Influence of enhanced malate dehydrogenase expression by alfalfa on diversity of rhizobacteria and soil nutrient availability. **Soil Biology and Biochemistry**, v.35, p.1103-1113, 2003.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.22, p.4673-4680, Nov. 1994.

TORRIANI, S.; ZAPPAROLI, G.; SUZZI, G. Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.75, p.207-215, 1999.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 964p.

UILENBERG, G.; GOFF, W.L. Polyphasic taxonomy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1081, n.1, p.492-497, 2006.

VALENTE, P.; RAMOS, J.P.; LEONCINI, O. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. **Canadian Journal of Microbiology**, v.45, p.949-958, 1999.

WALKER, G. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.99, n.1, p.25-34, Jan. 2010.

WUCZKOWSKI, M.; PRILLINGER, H. Molecular identification of yeast from soils of the aluvial forest national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria. **Microbiology Research**, v.159, n.3, p.263-275, 2004.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (Ed.). **The yeasts, a taxonomic study**. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. p.77-100.

ZAK, J.C.; WILLIG, M.R.; MOORHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.1101-1108, 1994.

ZONG, Y.; LIU, J.; LI, B.; QIN, G.; TIAN, S. Effects of yeast antagonists in combination with hot water treatment on postharvest diseases of tomato fruit. **Biological control**, v.54, p.316-321, 2010.

ZOTT, K.; MIOT-SERTIER, C.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A.; MASNEUF-POMAREDE, I. Dynamics and diversity of non-Saccharomyces yeasts during the early stages in winemaking. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.197-203, 2008.