

ALESSANDRA ABRÃO RESENDE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**LEVEDURAS ASSOCIADAS A FRUTOS DA MACAÚBA (*Acrocomia aculeata*  
(JAQ.) LODD. EX MART): DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO QUANTO À  
PRODUÇÃO DE EXOENZIMAS E FATORES DE CRESCIMENTO**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

2014

Alessandra Abrão Resende

**LEVEDURAS ASSOCIADAS A FRUTOS DA MACAÚBA (*Acrocomia aculeata*  
(JAQ.) LODD. EX MART): DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO QUANTO À  
PRODUÇÃO DE EXOENZIMAS E FATORES DE CRESCIMENTO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos

Belo Horizonte

2014

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas muitas oportunidades de aprendizado, e por permitir a presença de importantes pessoas na minha vida, que me auxiliam nessa caminhada:

Aos meus pais, meus primeiros e mais queridos mestres, por seus exemplos de amor, trabalho, honestidade, respeito e por todo o zelo e apoio de sempre;

A minha querida irmã, Daniela, ao meu amor, Diego, e aos meus familiares e amigos, pelo carinho, apoio e paciência diários, sem os quais eu não conseguiria ter concluído mais esta etapa;

A minha orientadora, profa. Vera Lúcia dos Santos, pela amizade e cumplicidade, por sua confiança e apoio incondicionais em todos os momentos, e por todas as oportunidades de aprendizado a mim concedidas;

Ao Heyder, meu companheiro de bancada e amigo, pela companhia e auxílio diários imprescindíveis para a conclusão deste projeto;

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada, por todo o auxílio, direto ou indireto, e pelo compartilhamento dos momentos de alegria e tristeza; e aos colegas da Pós-Graduação, pelo apoio e convívio sempre;

Aos colegas do MHNJB/UFMG, Flávia e Luiz Carlos, pela amizade, paciência e auxílio; e à Diretoria desta instituição pelo apoio na realização deste trabalho;

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite do convite e pelas contribuições que certamente serão muito importantes para a melhoria e continuidade dos nossos estudos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pela oportunidade; aos professores e funcionários, pela gentileza e pelo aprendizado proporcionado;

Aos colaboradores deste projeto:

A Débora Chaves, Dra. Fernanda Fraga, Natália, Spencer e demais colegas que atuaram na etapa de coleta dos frutos e isolamento das leveduras;

Ao MSc. Frederic Mendes Hughes, pela importante ajuda e colaboração no tratamento e discussão dos dados de diversidade e de atividades enzimáticas;

A Dra. Raquel Cadete, pelo auxílio na revisão da classificação taxonômica dos isolados;

Ao Laboratório de Enzimologia e Físico-química de Proteínas (LEFQP), pelo uso de suas instalações, e aos colegas do LEFQP, pelo auxílio na realização das análises;

A Mariana Eduarda e a Elisângela, do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisa René Rachou, MG, pela gentileza e colaboração na realização do sequenciamento das amostras de DNA;

Ao Programa para Desenvolvimento Tecnológico em Ferramentas para Saúde – PDTIS Fiocruz, pelo uso de suas instalações;

A Petrobrás S.A., pelo financiamento deste projeto.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	X
ABSTRACT .....	XI
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 A palmeira <i>Acrocomia aculeata</i> (macaúba) .....	4
2.2 Macaúba e biodiesel.....	5
2.2.1 O Biodiesel.....	5
2.2.2 A macaúba como matéria-prima para produção do biodiesel .....	7
2.3 A Macaúba e os micro-organismos associados.....	9
2.3.1 Interações micro-organismos e plantas.....	9
2.3.2 Exoenzimas hidrolíticas produzidas por micro-organismos.....	14
2.3.3 Produção de auxinas e disponibilização de fósforo livre por micro-organismos.....	20
2.3.4 Macaúba e microbiota associada.....	24
3 OBJETIVOS .....	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	27
4.1 Material biológico.....	27
4.1.1 Área de coleta e amostragem .....	27
4.1.2 Isolamento e preservação de leveduras por método de cultivo .....	28
4.1.3 Seleção dos isolados para realização dos experimentos.....	31
4.2 Estudo das comunidades de leveduras associadas aos frutos das palmeiras de macaúba .....	31
4.2.1 Identificação dos isolados de leveduras por métodos moleculares.....	31
4.2.1.1 Extração do DNA total .....	31
4.2.1.2 PCR utilizando o iniciador (GTG) <sub>5</sub> .....	32
4.2.1.3 PCR utilizando os iniciadores NL1 e NL4 .....	32
4.2.1.4 PCR utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4 .....	33
4.2.1.5 Ensaio de sequenciamento.....	34
4.2.2 Análises de ecologia .....	35
4.2.3 Avaliação do potencial de produção de enzimas hidrolíticas extracelulares .....	37

4.2.3.1	Produção do inóculo para os ensaios em meio sólido.....	37
4.2.3.2	Amilases .....	38
4.2.3.3	Celulases.....	38
4.2.3.4	Pectinases .....	38
4.2.3.5	Xilanases .....	39
4.2.3.6	Proteases .....	39
4.2.3.7	Lipases .....	40
4.2.4	Avaliação do potencial de produção de fatores promotores de crescimento .....	40
4.2.4.1	Ácido 3-indol- acético (AIA) .....	40
4.2.4.2	Habilidade de solubilização de fosfato insolúvel.....	41
4.2.4.3	Fitases .....	42
4.3	Caracterização das atividades enzimáticas e da produção de fatores de crescimento em função do tempo de deposição dos frutos no solo .....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1	Identificação dos isolados de leveduras por métodos moleculares .....	44
5.2	Análises de ecologia .....	63
5.3	Caracterização do potencial de produção de enzimas hidrolíticas .....	98
5.4	Caracterização do potencial de produção de fatores de crescimento .....	113
5.4.1	Produção de ácido indol-acético .....	113
5.4.2	Solubilização de fosfatos e produção de fitases .....	119
5.5	Atividade enzimática e produção de fatores de crescimento em função do tempo.....	129
6	CONCLUSÕES .....	134
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	139
	APÊNDICE A:.....	163
	APÊNDICE B:.....	164
	APÊNDICE C: .....	165
	APÊNDICE D .....	167
	APÊNDICE E:.....	168
	APÊNDICE F:.....	169
	APÊNDICE G: .....	171
	APÊNDICE H. ....	172

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação das leveduras representantes de cada grupo de bandeamento obtido com a técnica PCR <i>Fingerprinting</i> , utilizando duas regiões do gene codificante do rRNA, região D1/D2 do gene da subunidade 26S e região ITS1-5,8S-ITS2 .....	45
Tabela 2: Porcentagens de isolados epifíticos e endofíticos de cada uma das espécies ou gênero identificados .....	64
Tabela 3: Comparação entre as variáveis taxa de colonização, densidade e riqueza total de leveduras cultiváveis epifíticas e endofíticas. ....	65
Tabela 4: Dados da riqueza observada e riqueza estimada de leveduras e fungos epifíticos, utilizando os estimadores Jackknife 1 e Bootstrap, para cada um dos tempos de amostragem. ....	69
Tabela 5: Diversidade das comunidades de leveduras e fungos epifíticos, em função do tempo de deposição dos frutos no solo. ....	76
Tabela 6: Tabela de diversidade beta - Medida de Whittaker ( $\beta W$ )* (1960) para comunidades epifíticas .....	79
Tabela 7: Diversidade das comunidades de leveduras e fungos endofíticos, em função do tempo de deposição dos frutos no solo.....	88
Tabela 8: Tabela de diversidade beta - Medida de Whittaker ( $\beta W$ )* (1960) para comunidades endofíticas .....	89
Tabela 9: Riqueza de espécies epifíticas e endofíticas entre palmeira e tempo.....	92
Tabela 10: Abundância de todas as espécies epifíticas e endofíticas por planta e tempo.....	95
Tabela 11: Isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de avaliação do potencial de produção de amilases extracelulares.....	100
Tabela 12: Isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de avaliação do potencial de produção de celulases extracelulares.....	101
Tabela 13: Isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de avaliação do potencial de produção de pectinases extracelulares ..	102

Tabela 14: Isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de avaliação do potencial de produção de xilanases extracelulares ....	103
Tabela 15: Isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de avaliação do potencial de produção de exocarbo-hidrases, apresentando índices enzimáticos iguais a 1,0.....	104
Tabela 16: Isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de avaliação do potencial de produção de proteinases extracelulares...	106
Tabela 17: Isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de avaliação do potencial de produção de lipases extracelulares.....	107
Tabela 18: Categorização dos isolados de levedura por faixa de concentração de AIA produzido nas condições testadas: crescimento em meio Sabouraud de 5 mM suplementado com triptofano, a 28°C sob agitação, por 120 horas.....	114
Tabela 19: Isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de avaliação do potencial de solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis .....	120
Tabela 20: Isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de avaliação do potencial de solubilização de fitato.....	125

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Imagem de satélite mostrando o município de Brumadinho/MG e o povoado de Casa Branca..... 28
- Figura 2: Gel de agarose a 1%, evidenciando as bandas referentes as regiões D1/D2 do gene 26S rRNA .....58
- Figura 3: (A) Comparação entre as curva de acumulação e de extrapolação de espécies, reunindo amostras epifíticas (A) e endofíticas (B) isoladas durante todo o período de coleta (T0 a T5). .....68
- Figura 4: Curva de abundância utilizando o número total de amostras epifíticas isoladas em T0 a T5 (esquerda). Gráfico com “rank” de espécies mais abundantes (direita). ..... 71
- Figura 5: Curvas de abundância utilizando o número de amostras epifíticas coletadas em cada um dos períodos de coleta T0 – T5 (esquerda). Gráficos de abundância relativa das espécies T0-T5 (direita). ..... 72
- Figura 6: Figura esquemática da distribuição das espécies entre os tempos de coleta. Linhas pretas referem-se às leveduras epifíticas e linhas cinza, às leveduras endofíticas..... 80
- Figura 7: Gráficos de frequência relativa das espécies epifíticas por período de coleta.....82
- Figura 8: Curva de abundância utilizando o número total de amostras endofíticas isoladas em T0 a T5 (esquerda). Gráfico com rank de espécies mais abundantes (direita). ..... 84
- Figura 9: Curvas de abundância utilizando o número de amostras endofíticas coletadas em cada um dos períodos de coleta T0 – T5 (esquerda). Gráficos de abundância relativa das espécies T0-T5 (direita). ..... 85
- Figura 10: Gráficos de frequência relativa das espécies endofíticas por período de coleta. .... 91
- Figura 11: Variação da riqueza de epifíticos (A e B) e endofíticos (C e D) por palmeiras de macaúba, local de coleta dos frutos (P1 – P7) e por tempo de deposição dos frutos no solo (T0 – T5). ..... 93



Figura 12: Variação da abundância de epifíticos (A e B) e endofíticos (C e D) por palmeiras de macaúba, local de coleta dos frutos (P1 – P7) e por tempo de deposição dos frutos no solo (T0 – T5). .....	96
Figura 13: Figuras 13: Fotografias de testes para ação de enzimas e halos evidenciando a atividade para: A – Amilase; B – Celulase; C- Pectinase; D – Xilanase; E – Lipase; F – Proteinase.....	98
Figura 14: Ensaio de dosagem de AIA, utilizando o método do reagente de Salkoswky. ....	113
Figura 15: Fotografias de placas contendo meios de culturas específicos para os ensaios de fitase (direita) e solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis (esquerda), onde é possível visualizar os halos no entorno das colônias.....	119
Figura 16: Mosaic Plot, evidenciando a distribuição das atividades enzimáticas e habilidades na produção de fatores promotores de crescimento em função do tempo de deposição dos frutos no solo. ....	130

## RESUMO

O estudo da diversidade dos micro-organismos associados às plantas e dos vários compostos orgânicos produzidos nesta interação é importante para determinar os efeitos benéficos ou prejudiciais causados no hospedeiro. Este trabalho teve como objetivos estudar a diversidade de leveduras isoladas de frutos da palmeira macaúba, promissora na produção de biodiesel no Brasil, e caracterizar estes micro-organismos quanto ao potencial de produção de enzimas extracelulares e fatores promotores de crescimento. Um total de 529 leveduras foi isolado a partir da superfície e dos tecidos internos de frutos com diferentes tempos de deposição no solo. Os isolados foram agrupados de acordo com suas características macromorfológicas e padrão de bandeamento por PCR fingerprinting, utilizando o iniciador (GTG)<sub>5</sub>, e identificados por meio do sequenciamento das regiões D1/D2 do gene rRNA 26S e ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, utilizando os iniciadores NL1/NL4 e ITS1/ITS4. Foram identificadas 39 espécies pertencentes a 19 gêneros, sendo *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida sorboxylosa*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranifaciens* e *Fellomyces polyborus* as mais frequentemente isoladas. Comunidades de epifíticas apresentaram riqueza, abundância e taxa de colonização maiores do que as de endofíticas. Entre as comunidades coletadas em tempos distintos, foi observado o aumento da abundância em função do tempo de deposição dos frutos no solo (epifíticas), bem como uma elevada taxa de substituição de espécies. Durante todo o período experimental foi observada a dominância da espécie *M. guilliermondii*. Nos ensaios qualitativos em meio sólido, 6,6% dos isolados apresentaram resultados positivos para produção de amilase; 12% para celulase; 7,9% para pectinase; 1,2% para xilanase; 6,6% para lipase; 5,4% para proteinases; 88,8% foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio; e 48,5% foram capazes de hidrolisar fitato de cálcio. Um total de 98% dos isolados foi capaz de produzir ácido indol-acético em meio suplementado com L-triptofano, em concentrações que variaram de 1,63 até 238,65 µg/mL\*DO<sub>600</sub>, dosadas pelo método do reagente de Salkoviski. As atividades enzimáticas e a produção de fitase demonstradas pelos isolados apresentaram distribuição diferenciada, quando considerados os tempos de deposição dos frutos de macaúba no solo.

Palavras-chave: *Acrocomia aculeata*, diversidade, enzimas, levedura, crescimento.

## ABSTRACT

The study of the diversity of microorganisms associated with plants and the various organic compounds produced in this interaction is important to determine the beneficial or harmful effects on the host. This work aimed to study the diversity of yeasts isolated from macaw palm fruit, a promising plant for biodiesel production in Brazil, and to characterize those microorganisms regarding the potential production of extracellular enzymes and growth promoting factors. A total of 529 yeast isolates was obtained from the surface and internal tissues of fruits with different times of deposition in the soil. The isolates were grouped according to their macro-morphology and banding pattern by PCR fingerprinting using primer (GTG)<sub>5</sub>, and identified by sequencing the D1/D2 regions of the 26S rRNA gene and ITS1 – 5.8S – ITS2 rDNA using the primers NL1/NL4 and ITS1/ITS4. A total of 39 species belonging to 19 genera was identified. The most frequent taxa identified were *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida sorboxylosa*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranifaciens* and *Fellomyces polyborus*. Epiphytic communities presented higher values of richness, abundance and colonization rate than the endophytic communities. Among the communities collected at different times, the increase in abundance as a function of the time of deposition of the fruits in the soil (only for epiphytic) was observed as well as a high rate of species substitution. The dominance of *M. guilliermondii* was observed during the experimental period. In the qualitative assays on solid medium, 6.6% of the isolates were positive for amylase production; 12 % for cellulose; 7.9% for pectinase; 1.2% for xylanase; 6.6% for lipase; 5.4% for proteinases; 88.8% were able to solubilize calcium phosphate; and 48.5% were able to hydrolyze phytate calcium. A total of 98% of the isolates was able to produce indole-3-acetic acid on liquid medium supplemented with L- tryptophan, at concentrations ranging from 1.63 to 238.65  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}^{-1}$ . AIA concentrations were obtained using the photocolorimetric method of Salkoviski reagent. Enzyme activities and the production of phytase by isolates displayed distinct distribution when considering different times of macaw palm fruit deposition in the soil.

Keywords: *Acrocomia aculeata*, diversity, enzymes, yeast, growth.

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A palmeira *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., popularmente conhecida como macaúba, é uma palmeira nativa, distribuída amplamente pelo território brasileiro. Sua madeira, folhas e frutos são comumente utilizados para diversos fins, como construção civil, consumo humano e alimentação de animais, uso medicinal e em cosméticos, produção de artesanato e paisagismo. Recentemente, grande valor econômico tem sido agregado à espécie, devido ao seu potencial de uso como matéria-prima na produção do biodiesel. Seu fruto, o coco da macaúba, apresenta alto teor de óleos, o que caracteriza esta espécie como a segunda maior em potencial produtor de biodiesel (litros de óleo por hectare), superada apenas pelo dendê (*Elaeis guineensis*). Por se tratar de uma espécie nativa, espontânea, perene e pioneira no processo de colonização, com alto potencial para utilização em sistemas agrosilvopecuários, seu uso como matéria-prima para produção de biodiesel no Brasil, no lugar de monoculturas de plantas exóticas como a soja, tem sido recomendado por alguns autores, especialmente, nas áreas de cerrado.

A exploração comercial da macaúba é realizada principalmente por agricultores familiares, que coletam os frutos a partir de populações naturais da espécie, trazendo benefícios sociais e econômicos para esta parcela da sociedade. Esta prática, entretanto, tem enfrentado dificuldades relacionadas ao manejo da espécie e à manutenção da qualidade do fruto nas etapas de coleta, armazenagem e transporte, sendo necessária a agregação de conhecimentos botânicos, ecológicos e agrônômicos, que possibilitem a elaboração de planos de manejo para o extrativismo sustentável e o desenvolvimento de tecnologias para seu plantio comercial.

Nos últimos anos, muitos estudos têm sido realizados com a macaúba, mas a maioria tem focado aspectos da ecofisiologia, etnobotânica, estrutura genética das populações naturais, manejo, técnicas de cultivo e produção, caracterização e aplicação do óleo presente no fruto. Contudo, pouca atenção tem sido dada à diversidade e ao papel da microbiota associada à palmeira.

A interação dos micro-organismos com as plantas envolve uma série de fatores, entre eles a produção de substâncias químicas diversas por ambos os

organismos. São produzidas moléculas sinalizadoras; enzimas, que podem auxiliar tanto no processo de fixação e colonização dos micro-organismos nos órgãos vegetais, quanto na disponibilização de nutrientes; substâncias antibióticas; fitohormônios, entre outras moléculas biologicamente ativas. Estes compostos podem estar envolvidos em interações positivas ou negativas entre os micro-organismos e as plantas. Nas interações positivas, os micro-organismos proporcionam uma série de benefícios para o hospedeiro, atuando como produtores de fatores de crescimento da planta, aumentando a superfície de absorção das raízes, auxiliando na solubilização de nutrientes e atuando como agentes de controle biológico. Em contrapartida, a planta pode disponibilizar nutrientes e proteção para a microbiota associada. Os micro-organismos associados podem também atuar como saprófitas ou fitopatógenos, sendo a última um caso típico de interação negativa. A compreensão deste papel é importante não só para o entendimento da ecofisiologia da macaúba, mas também para subsidiar projetos de exploração comercial e industrial sustentáveis desta palmeira.

Tendo em vista os aspectos citados acerca da importância dos micro-organismos associados à macaúba para o seu desenvolvimento e conservação e considerando a escassez de trabalhos que investiguem essa biodiversidade, este trabalho teve como objetivos estudar a diversidade de leveduras isoladas dos frutos da palmeira macaúba, coletados em diferentes tempos de deposição no solo, bem como caracterizar estes micro-organismos quanto ao potencial de produção de exoenzimas e fatores promotores de crescimento. Particularmente, o conhecimento da microbiota associada aos frutos e da sua atividade enzimática permite identificar micro-organismos com potencial de causar doenças em plantios comerciais da palmeira, estabelecer critérios de manejo adequado durante todas as fases do processamento da macaúba (desde o desprendimento do coco, prazos de coleta a partir do solo, armazenagem em local provisório, transporte, estocagem até sua industrialização), que levem a manutenção da qualidade do coco e, conseqüentemente, do óleo e demais co-produtos obtidos desses frutos. Ademais, os estudos permitem a obtenção de linhagens microbianas produtoras de enzimas extracelulares com potencial de uso industrial e de endófitos e micro-organismos da rizosfera com potencial de utilização em estratégias de controle biológico de fitopatógenos e promotores de crescimento da macaúba. No caso específico de

enzimas hidrolíticas (lípase, protease, celulase, xilanase, amilase e protease), que já apresentam grande interesse industrial, estudos recentes vêm avaliando o seu uso na extração enzimática de óleos vegetais em escala comercial.

Este trabalho faz parte de um projeto de investigação da microbiota associada à macaúba desenvolvido pela equipe do Laboratório de Microbiologia Aplicada, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, e financiado pela Petrobrás S.A. Este projeto tem como objetivo investigar outros grupos de micro-organismos, como bactérias e fungos filamentosos, contribuindo para a compreensão total da diversidade e do papel ecológico dessa microbiota na sua relação com a planta.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A palmeira *Acrocomia aculeata* (macaúba)

A palmeira *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., família Arecaceae, é uma palmeira nativa das florestas tropicais cujo estipe atinge de 10 a 15 m de altura e 20 a 30 cm de diâmetro. É popularmente conhecida no Brasil como macaúba, bocaiúva, coco-de-espinho, macacauba, macaíba, entre outros nomes populares (LORENZI, 2010). Está distribuída por vários países da América tropical além do Brasil, a citar Argentina, Bolívia, Colômbia, Venezuela, Costa Rica, Honduras, México e Haiti. No Brasil, a espécie é encontrada nos estados Amazonas, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, Pará, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo, nas mais diversas formações: Floresta Ombrófila Densa, Floresta Estacional Semidecidual, Mata Ciliar e Cerrado (ÁRVORESBRASIL, 2012).

*Acrocomia aculeata* possui a região dos nós do estipe coberto de espinhos escuros, pontiagudos com cerca de 10 cm de comprimento. A planta também apresenta espinhos na região central da folha, na espata. Os frutos, que compõem a dieta de muitos animais, são esféricos ou ligeiramente achatados. O epicarpo rígido envolve um mesocarpo fibroso, mucilaginoso, rico em glicerídeos, de coloração amarelo ou esbranquiçado, comestível. O endocarpo é fortemente aderido à polpa (mesocarpo), com parede enegrecida e amêndoa oleaginosa. A frutificação ocorre durante todo o ano e os frutos amadurecem, principalmente, entre setembro e janeiro (LORENZI, 2010).

Estudos etnobotânicos evidenciaram o potencial de utilização da macaúba, sua madeira, folhas e frutos, para consumo humano, na fabricação de licores, sorvetes e farinhas; na construção civil, cobertura de casa, obtenção de madeiras para a construção de estacas e mourões; na alimentação de animais; para uso medicinal e cosmético; uso paisagístico; e uso artesanal (LORENZI, 2006). O uso do óleo contido no fruto da macaúba tem sido relatado em vários trabalhos, com aplicações na indústria de cerâmica (PARADIGMA, 2012), uso como óleo doméstico comestível no lugar do óleo de soja, na fabricação de sabão, como lubrificante para máquinas e como combustível (OLIVEIRA, 2006) e para produção do biodiesel. Além da utilização do óleo extraído da polpa da macaúba, outros produtos derivados

do fruto podem ser aproveitados, como o óleo da amêndoa, com potencial uso na indústria de cosméticos, e o endocarpo, que pode também ser utilizado como combustível na forma de carvão vegetal (CIPRIANO, 2006).

## **2.2 Macaúba e biodiesel**

### **2.2.1 O Biodiesel**

O óleo diesel é o principal derivado de petróleo utilizado no Brasil, perfazendo 48% do total de derivados comercializados, justificado pela predominância do transporte rodoviário como forma de transporte no país. Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, em 2010, foram comercializados no Brasil 49 bilhões de litros de diesel, 33% a mais do que o consumido em 2001. Destes, aproximadamente 4,8 bilhões de litros de óleo diesel foram importados, totalizando um custo de 5,14 bilhões de dólares (ANP, 2014).

A maior parte do óleo diesel utilizado no mundo tem origem mineral. Obtido por meio da destilação do petróleo, apresenta problemas como o caráter limitado das reservas e, portanto, a tendência ao seu esgotamento, além da geração de muitos gases poluentes como produtos da reação de combustão. Estes gases poluentes são causadores do efeito estufa e chuvas ácidas, que afetam o clima em escala mundial e trazem uma série de prejuízos econômicos aos setores públicos e privados (RAMOS et al., 2003; BENEDETTI et al., 2006).

Como forma de minimizar os impactos ambientais causados pelo uso deste combustível, o Brasil tem implantado medidas importantes como o controle e a redução progressiva do teor de enxofre (S) no óleo diesel, na busca da melhoria da qualidade do ar (ANP, 2014). Contudo, é crescente a necessidade de investimentos em soluções alternativas de geração de energia, de caráter renovável e que sejam sustentáveis nos âmbitos social, econômico e ambiental.

Dessa forma, o Governo Brasileiro criou, em 2004, o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), um programa interministerial que objetiva a implantação de forma sustentável, tanto técnica, como econômica, da produção e uso do biodiesel, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, promovendo a geração de emprego e renda (MDA, 2011). Por meio da Lei



11.097/2005, o biodiesel foi introduzido na matriz energética brasileira, sendo fixado inicialmente em 2% (B2) e, a partir de 2013, em 5% em volume (B5), o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional (BRASIL, 2005).

O biodiesel é um éster produzido com base em óleos vegetais ou animais. Pode ser obtido por diferentes processos químicos, tais como esterificação, craqueamento térmico e transesterificação, sendo este último o processo mais difundido no Brasil e no mundo (PRATES et al., 2007). Na transesterificação, o processo inicia-se pela mistura do óleo vegetal ou gordura animal com um álcool (metílico ou etílico) e ainda um catalisador (hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio) para acelerar o processo. Após a reação, obtêm-se a glicerina e o éster (biodiesel). A glicerina é um produto de alto valor agregado quando utilizado na indústria farmacêutica, de cosméticos, alimentos e bebidas, entre outros. Outros co-produtos gerados são a torta e o farelo (PRATES et al., 2007).

São matérias-primas potenciais para produção do biodiesel: soja, palma, algodão, macaúba, girassol, sésamo, amendoim, nabo forrageiro, sebo animal, óleo de fritura usado, tungue, pequi, buriti, mamona, dendê, pinhão manso, babaçu, milho, canola e outros materiais graxos (VIEIRA et al., 2007), com destaque para soja e sebo bovino que, em 2013, foram responsáveis por 70,9% e 24,8% da produção de biodiesel no país, respectivamente (ANP, 2014). A produção de biodiesel (B100) em unidades brasileiras em 2013 foi de aproximadamente 3,0 bilhões de litros, com potencial instalado para 8,0 bilhões de litros (ANP, 2014).

A produção do biodiesel traz benefícios sociais, econômicos e ambientais. O estímulo a sua produção promove a criação de empregos e renda, especialmente no campo, por meio do estímulo aos programas de agricultura familiar, mas também na agricultura empresarial, por meio dos segmentos de transporte, processamento e distribuição (MDA, 2011). Em termos ambientais, o biodiesel constitui uma forma de energia de origem renovável, tendo um melhor balanço de emissão de CO<sub>2</sub>, uma vez que os gases emitidos no processo de combustão podem ser compensados pelo que é absorvido no ciclo da cultura, como biomassa energética, por meio da fotossíntese. Além disso, o produto da combustão do biodiesel apresenta menor concentração de gases geradores de efeito estufa, menor concentração de enxofre, de material particulado e de demais produtos nocivos à saúde, como moléculas

aromáticas, quando comparado ao diesel de origem mineral. Ainda como vantagem, o biodiesel é um produto biodegradável (VIEIRA et al., 2007).

### **2.2.2 A macaúba como matéria-prima para produção do biodiesel**

A macaúba, devido ao seu potencial para a produção de grandes quantidades de óleo por unidade de área, tem sido estudada como uma das espécies vegetais brasileiras promissoras para a produção de biodiesel (LIMA, 2011).

Estudos em formações nativas de macaúbas relatam produção aproximada de 100 kg de frutos por árvore por ano (OLIVEIRA, 2006), e concluem que, em plantios racionais com espaçamento 7 m x 7 m, pode se esperar uma produtividade mínima de 20.000 kg/ha/ano de frutos, capacidade passível de aumento por meio da implantação de planos de manejo adequados e programas de melhoramento da espécie. Com uma produção potencial de 4.000 litros de óleo vegetal por hectare, 1.200 quilos de carvão vegetal, e 5.300 quilos de farelos para rações, grande valor econômico tem sido agregado à espécie, o que é potencializado pela possibilidade de utilização na produção do biodiesel (OLIVEIRA, 2006). Tal produção de óleo só é superada pelo dendê (*Elaeis guineensis*), que pode atingir cerca de 5.550 litros por hectare (ASTÚRIAS, 2004).

A utilização do óleo extraído da macaúba como matéria-prima para produção do biodiesel brasileiro, em substituição a outras culturas como a soja, tem sido sugerida em alguns trabalhos (ASTÚRIAS, 2004; LIMA, 2011). A produtividade de óleo pela macaúba pode superar em até dez vezes a produtividade de óleo pela soja (ASTÚRIAS, 2004). Além disso, o plantio da macaúba apresenta maiores benefícios ambientais, já que se trata de uma espécie nativa e perene, que pode ser cultivada em associação com outras espécies de plantas e em consórcio com atividades pecuárias, denominados sistemas agrosilvopastorais, em contraste com a soja, espécie exótica, de ciclo anual e cultivada em sistema de monocultura (LIMA, 2011).

Outros benefícios ambientais associados ao cultivo da macaúba estão relacionados com a conservação dos recursos hídricos, conservação dos recursos nutricionais do solo e conservação da biodiversidade. A macaúba é considerada uma espécie pioneira, capaz de povoar regiões onde há restrição hídrica e degradação do solo (ARKCOLL, 1990). Suas raízes são mais alongadas e

concentradas do que de outras palmeiras, permitindo a absorção de água em profundidades maiores do solo, enquanto sua copa é relativamente restrita, o que permite a difusão de luz para as espécies vegetais em estratos inferiores (SILVA, 2007). Tais características estimulam o uso da palmeira também nos processos de recomposição de reservas, em especial aquelas de uso sustentável, favorecendo sua conservação (ARKCOLL, 1990).

Atualmente, a exploração da macaúba ocorre principalmente através da coleta dos frutos em grandes populações naturais, realizada muitas vezes por comunidades locais. Tal exploração, assim como a de frutos e produtos de outras palmeiras, como o coco-da-bahia, açaí e dendê, apresenta grande relevância social e econômica para muitos brasileiros que retiram desta atividade sua renda mensal e, muitas vezes, sua subsistência (LORENZI, 2006; GALVANI & FERNANDES, 2010).

Contudo, esta prática pode apresentar baixa produtividade. Isso se deve à relativa pequena produção dos cocais nativos, associada aos métodos tradicionais de coleta, que usam muita mão de obra e têm logística deficiente. A maior parte dos frutos é coletada no solo, sem equipamentos e ferramentas específicos para a atividade, sem periodicidade padronizada ou sincronização da coleta com o transporte (OLIVEIRA, 2009; LIMA, 2011). A coleta tardia e o armazenamento em condições inadequadas levam à degradação do fruto da macaúba por micro-organismos associados à planta e presentes no solo (SILVA, 2007). Eles produzem enzimas extracelulares, responsáveis pela redução da firmeza da polpa do fruto, devido à degradação de celulose, hemicelulose e pectina (LYND et al., 2002), e pela hidrólise do óleo e o conseqüente aumento da sua acidez, indesejável para a produção do biodiesel (SILVA, 2007).

Outra questão relevante está relacionada ao desconhecimento de técnicas sustentáveis de extrativismo vegetal que, em geral, podem apresentar impactos ecológicos negativos, como redução no vigor das plantas, decréscimo na taxa de produção de sementes, germinação e estabelecimento de plântulas; ruptura no processo de interação planta-animal e no ciclo de reposição de nutrientes no solo (PINHEIRO, 2002; RIBAS & MIGUEL, 2004; LORENZI, 2006; HOMMA, 2012).

Plantações de macaúba no Brasil e em muitos outros lugares do mundo ainda estão em fase primária (LIMA, 2011). A instalação das lavouras comerciais enfrenta dificuldades como a quebra de dormência da semente, que pode demorar de um a

dois anos para germinar (LORENZI, 2006), baixo crescimento inicial, dificuldades na propagação vegetativa da espécie por meio de técnicas convencionais, já que a espécie não tem meristema axilar (SOARES et al., 2011), e, pouco se conhece a respeito das suas exigências ecológicas (MOTTA et al, 2002).

Sendo assim, a exploração comercial da macaúba depende da agregação de conhecimentos botânicos, ecológicos e agrônômicos relacionados à espécie, permitindo a elaboração de planos de manejo para o extrativismo sustentável, bem como do desenvolvimento de tecnologias, que permitam seu plantio comercial. Técnicas de superação da dormência da semente têm sido estudadas (RIBEIRO et al., 2011b; RUBIO NETO et al., 2012). A cultura de embriões como ferramenta alternativa na produção de mudas de macaúba, com objetivo de proporcionar a propagação de clones elite, contribuindo para a aceleração dos programas de melhoramento, e a produção de plantas livres de patógenos apresentam resultados positivos (MOURA et al, 2007a, 2007b; SOARES et al., 2011), bem como o transplântio de brotos nativos (OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2007).

Iniciativas governamentais e privadas têm estimulado o desenvolvimento de projetos com objetivos de estudar tecnologias agrônômicas, tais como, os sistemas de produção e o melhoramento genético de espécies oleaginosas, entre elas a macaúba, e analisar a qualidade das matérias-primas oriundas dessas pesquisas agrônômicas, estabelecendo especificações técnicas e desenvolvendo os processos industriais de conversão de biomassa em biocombustíveis e outras formas de energia (PETROBRÁS, 2009; CASTELÕES, 2011).

## **2.3 A Macaúba e os micro-organismos associados**

### **2.3.1 Interações micro-organismos e plantas**

Os micro-organismos podem ser encontrados associados às plantas, interagindo não apenas com os vários tecidos vegetais em que habitam, mas também entre si e com indivíduos de outros grupos biológicos residentes no mesmo local (BONFANTE & ANCA, 2009). Essas interações podem ser classificadas como positivas, neutras ou negativas, dependendo do modo de interação entre os organismos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). O neutralismo é considerado a

ausência de interação, o que é raro nos ambientes naturais. Nas interações positivas (comensalismo, protocooperação e mutualismo) podem ser observadas vantagens seletivas para um dos envolvidos ou para ambos. Já nas interações negativas (competição, amensalismo, parasitismo e predação), pelo menos um dos organismos envolvidos é prejudicado (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Em sua associação com a planta, micro-organismos podem colonizar os tecidos internos (endofíticos) ou apenas a superfície dos órgãos vegetais (epifíticos) (SAIKONNEN et al., 2004). Nos últimos anos, o termo endófito tem sido utilizado para descrever micro-organismos que se desenvolvem nos tecidos internos da planta, de forma assintomática e sem produção de alterações anormais, em pelo menos uma fase da vida do organismo (SAIKONNEN et al., 2004), diferenciando-os dos fitopatógenos. Contudo, os tipos de interação que estes micro-organismos estabelecem entre si e com a planta hospedeira podem variar, durante sua história de vida, de positivas a negativas e vice versa, dependendo da disposição e do estágio de desenvolvimento dos organismos envolvidos, bem como dos fatores ambientais (SAIKONNEN et al., 2004; SCHULZ e BOYLE, 2005).

A colonização dos órgãos vegetais envolve diversas etapas, entre liberação de moléculas sinalizadoras, reconhecimento e adesão na superfície, rompimento de barreiras de proteção da planta, invasão dos tecidos (no caso dos endofíticos) e colonização (DE BOER et al., 2005). Em cada etapa deste processo são utilizadas estratégias diferentes.

Antes da colonização acontece uma intensa troca de sinais entre planta e micro-organismo. No solo, por exemplo, estrigolactonas exsudadas pelas raízes de algumas plantas atuam na atração e influenciam na ramificação das hifas de micorrizas arbusculares (AKIYAMA et al., 2005). Já compostos fenólicos produzidos pelas plantas, em especial os flavonóides, influenciam no processo de colonização das raízes tanto por micorrizas arbusculares (STEINKELLNER et al., 2007) como por rizobactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas, que por sua vez emitem outras respostas químicas, como a produção de fatores Nod (fatores de nodulação), que desencadeiam a expressão de várias outras vias biossintéticas da planta (BADRI et al., 2009).

O processo de colonização de tecidos vegetais por micro-organismos endofíticos pode ocorrer de forma passiva ou ativa. Estruturas como estômatos,

hidatódios (aberturas semelhantes a estômatos que permitem a eliminação de água), tricomas ou pequenas feridas (COMPANT et al., 2010) podem ser utilizados para entrada dos micro-organismos. Contudo, este processo pode ocorrer de forma ativa, envolvendo a produção de estruturas de fixação e invasão como apressórios e arbúsculos, estes últimos típicos de fungos micorrízicos arbusculares (SMITH & SMITH, 2011). Outra estratégia envolve a produção de enzimas extracelulares, que degradam estruturas de barreira como a cutícula e as paredes das células vegetais (HÉMATY et al., 2009; GIBSON et al., 2011).

Os micro-organismos podem ser encontrados associados às partes aéreas das plantas (filoplano), como folhas, caules, flores e frutos ou em associação com as partes subterrâneas, as raízes (LINDOW & BRANDL, 2003). Em associação com os órgãos vegetais aéreos, podem ser encontrados micro-organismos endofíticos e epifíticos, sendo os últimos predominantes (LINDOW & BRANDL, 2003). Os micro-organismos endofíticos podem iniciar sua colonização como epifíticos e posteriormente penetrar nos tecidos (BEATTIE & LINDOW, 1999) ou penetrar nos tecidos da raiz e atingir o filoplano por meio do sistema vascular da planta (WULFF et al. 2003).

No caso dos micro-organismos epifíticos, devido às condições físicas e ambientais (umidade, temperatura, luminosidade) do filoplano serem bastante variáveis, o processo de colonização é garantido por uma série de fatores específicos. Nas folhas, por exemplo, fatores importantes são a fina camada de ar que cobre a superfície das folhas e que retém vapores de água emitidos do estômato e das nervuras (AXTELL & BEATTIE, 2002), liberação de açúcares simples “lixiviados” a partir do interior da planta por meio de pequenas lesões ou tricomas glandulares (MERCIER & LINDOW, 2000; LINDOW & BRANDL, 2003), sem contar a deposição de nutrientes exógenos como pólen e secreções de insetos (WARREN, 1972; FOKKEMA et al., 1983). Alguns micro-organismos epifíticos são capazes de alterar a superfície dos órgãos vegetais aéreos, com o objetivo de torná-lo menos adverso ao seu desenvolvimento. A produção de agentes tensoativos por alguns micro-organismos reduzem os efeitos negativos da cutícula hidrofóbica das plantas no espalhamento da água (molhabilidade) e na difusão de substratos (BUNSTER et al., 1989; HUTCHISON et al., 1995). Outros micro-organismos são

produtores de substâncias que afetam o transporte de íons nas membranas celulares vegetais (HUTCHISON et al., 1995).

Já na associação com as raízes, podem ser encontrados micro-organismos epifíticos, endofíticos e colonizadores da rizosfera. A rizosfera é definida como uma fina camada de solo diretamente influenciada pelas raízes das plantas, que pode variar de 1 a 3 mm de distância da raiz (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Uma grande densidade de micro-organismos encontra-se presente na rizosfera, devido à liberação de exsudatos ricos em compostos orgânicos como aminoácidos e proteínas, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, açúcares simples e polissacarídeos complexos, entre outros. Também estão presentes polímeros como celulose, hemicelulose e lignina, provenientes de células vegetais mortas (DE BOER et al., 2005). Estes compostos são utilizados como nutrientes pela microbiota residente no local, incluindo também os micro-organismos endofíticos e epifíticos de raiz, que por sua vez, disponibilizam elementos como nitrogênio e fósforo nas suas formas inorgânicas, capazes de serem absorvidas pela planta e por outros organismos (DE BOER et al., 2005).

A capacidade de disponibilizar nutrientes minerais para a planta e demais organismos residentes pode ser realizada por meio de vários mecanismos. Os micro-organismos são produtores de enzimas hidrolíticas, como celulases, xilanasas, amilases, pectinases, lipases e proteases, que clivam polímeros complexos em moléculas mais simples capazes de serem metabolizadas ou absorvidas pelos organismos (BADRI et al., 2009). Eles também são produtores de ácidos orgânicos e enzimas fosfatases, entre elas as fitases, que atuam na solubilização de fósforo a partir de compostos inorgânicos insolúveis e compostos orgânicos (GYANESHWAR et al., 2002). Alguns fungos, como por exemplo, os micorrízicos, além de aumentar consideravelmente a superfície de absorção das raízes, possuem transportadores específicos de fósforo e nitrogênio, capazes de captá-los do solo e liberá-los diretamente para a planta (MALDONADO-MENDOZA et al., 2001; CAPPELLAZZO et al., 2008; YADAV et al., 2010; PÉREZ-TIENDA et al., 2012). Finalmente, bactérias fixadoras de nitrogênio absorvem este elemento na sua forma molecular a partir da atmosfera e disponibilizam para a planta como nutrientes inorgânicos capazes de serem absorvidos (MIYAMOTO et al., 2004; THUITA et al., 2012).

Além da disponibilização de nutrientes para as plantas, os micro-organismos produzem vários metabólitos secundários que apresentam atividade biológica. A produção de fitohormônios como as auxinas, citocinas e giberelinas estimulam o crescimento da planta, aumentando a densidade de raízes e folhas, por exemplo (TSAVKELOVA et al., 2006). Estas substâncias podem exercer papel nos processos de sinalização entre plantas e micro-organismos (KEFFORD et al., 1960; NAVARRO et al., 2006), estimular a produção e a liberação de nutrientes pelas plantas, aumentando a sua disponibilidade para a microbiota residente (KÖRBER et al., 1991) e promover o aumento da população do micro-organismo produtor do fitohormônio (BRANDL & LINDOW, 1998).

Outros metabólitos secundários produzidos por micro-organismos associados às plantas consistem em sideróforos quelantes de íons (KATIYAR & GOEL, 2004; AHMAD et al., 2008) e substâncias antagonistas de crescimento, como ácido cianídrico e derivados (HCN), antibióticos e compostos orgânicos voláteis (AHMAD et al., 2008; VINALE et al., 2008), utilizados pelos micro-organismos que co-habitam a rizosfera especialmente como estratégias de competição (BERG & SMALLA, 2009; COMPANT et al., 2010; ALY et al., 2011).

A atividade biológica apresentada por metabólitos secundários produzidos pelos micro-organismos associados às plantas tem sido explorada na agricultura e na indústria química e farmacêutica (ZHANG et al., 2006). Micro-organismos produtores de fitohormônios e outros fatores de promoção de crescimento na planta têm sido utilizados como biofertilizantes (TSAVKELOVA et al., 2006). Já aqueles produtores de substâncias antagonistas são utilizados como agentes de biocontrole, protegendo as culturas como fitopatógenos (BERG, 2009). Por fim, outras atividades apresentadas por metabólitos secundários descritas incluem imunossupressores, antioxidantes, anticancerígenos (STIERLE et al. 1993; GANGADEVI & MUTHUMARY, 2008), antibióticos (CASTILLO et al., 2002) e citotoxinas (DEBBAB et al., 2009).

A relação entre a diversidade microbiana associada às plantas e sua grande diversidade funcional ainda é bastante desconhecida, mas parece assumir papéis importantes na estabilidade do ecossistema em que estão inseridos, na produtividade e na resiliência para estresses e distúrbios (TORSVIK & OVREAS, 2002; SALEEM et al., 2007). Neste sentido, estudos visando compreender a



dimensão da diversidade microbiana associada às plantas e elucidar seu papel nesta interação podem contribuir tanto para a manutenção e conservação das espécies vegetais, quanto para o desenvolvimento de tecnologias agrícolas e industriais.

### **2.3.2 Exoenzimas hidrolíticas produzidas por micro-organismos**

As enzimas hidrolíticas produzidas por micro-organismos associados a plantas assumem duas principais funções ecológicas: degradação de componentes celulares durante invasão e colonização de tecidos da planta e disponibilização de nutrientes. Para a invasão dos tecidos da planta, a cutícula e a parede das células vegetais constituem as principais barreiras que muitos agentes endofíticos precisam superar (HÉMATY et al., 2009).

A cutícula é produzida pelas células epidérmicas das folhas, brotos jovens e outros tipos de órgãos das plantas. Ela é constituída predominantemente por cutina, um poliéster de cadeia longa com 16 a 18 carbonos (SHAH, 2005). Esta estrutura constitui uma camada lipídica, de espessura variável conforme a espécie vegetal, cujas funções são proteger a planta contra a desidratação e fitopatógenos (SHAH, 2005). Existem algumas evidências que sugerem que enzimas lipases, cutinases e oxidases produzidas por micro-organismos possam apresentar papel na adesão e penetração dessa barreira lipídica das plantas (VAN KAN et al., 1997; CÔMMENIL et al., 1998; TENBERGE et al., 2002; REIS et al., 2005; CHASSOT et al., 2008; FENG et al., 2009), mas os mecanismos específicos ainda não foram elucidados.

A parede vegetal, por sua vez, é predominantemente composta dos polissacarídeos celulose (35-50%) e hemicelulose (30-35%) e de lignina (10-25%), um polímero fenilpropanóide (SARKAR et al., 2009). A celulose é uma macromolécula complexa, formada de cadeias lineares de glicano, que se agregam na forma de microfibrilas, por meio de fortes interações intermoleculares, constituindo a estrutura primária da parede celular. Estas microfibrilas se organizam na forma de lamelas, intercaladas por moléculas de hemicelulose e pectina, que controlam a porosidade e elasticidade da parede (LEUROXEL et al., 2006).

As hemiceluloses são complexos heteropolissacarídeos, entre os quais está o grupo das xilanas, compostas de um esqueleto de D-xilose e arabinose, ácido

urônico, cadeias laterais acetiladas, além dos grupos dos mananos, xiloglucanos e outros glucanos. Já as pectinas são polissacarídeos complexos, compostos de domínios homogalacturônicos e ramnogalacturônicos, parcialmente esterificados com grupos metoxila (LEUROXEL et al., 2006).

Para transposição desta barreira, enzimas atuam diretamente na interface sólido-líquido catalisando a despolimerização de cadeias de celulose e hemicelulose por hidrólise dos polímeros em hidratos de carbono (GIBSON et al., 2011). Entre as enzimas envolvidas na degradação da parede celular estão incluídas as celulasas, xilanases e pectinases (GIBSON et al., 2011).

Celuloses e lignina constituem as moléculas mais recalcitrantes em resíduos vegetais. A capacidade de produzir enzimas que possam atuar na sua degradação é uma característica extremamente importante para o sucesso na colonização dos micro-organismos, possibilitando o uso deste material para sua nutrição e sobrevivência (GIBSON et al., 2011). Além destes compostos, várias outras moléculas complexas encontram-se disponíveis no solo, em superfícies e tecidos das plantas. Polímeros como amido, entre outros polissacarídeos, proteínas e acilsteróis fazem parte da constituição das células vegetais, bem como dos exsudados das plantas (BADRI et al., 2009). Neste sentido, enzimas hidrolíticas como amilases, proteases e lipases também são importantes na disponibilização dos nutrientes na sua forma simples, como monossacarídeos e aminoácidos, passíveis de utilização como fontes de carbono e energia pela planta e pelos demais organismos associados a ela (BOTHA, 2010). A seguir, uma breve descrição das enzimas hidrolíticas envolvidas nos processos de colonização e disponibilização dos nutrientes.

As lipases (E.C.3.1.1.3) são carboxil-esterases que possuem como substrato natural os triacilgliceróis. Estas enzimas catalisam a hidrólise ou formação de ligações éster dos triacilgliceróis de cadeia longa (mais de dez carbonos), produzindo glicerol e ácidos graxos livres (BORNSCHEUER, 2002). Baseado em sua estrutura tridimensional, estas enzimas tem sido classificadas como serina hidrolases, pois seu sítio ativo é composto pelo grupo catalítico Ser-Asp (Glu)-His (BORNSCHEUER, 2002).

As proteases (E.C.3.4) são enzimas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas nas proteínas. De acordo com a faixa de pH em que a enzima apresenta

atividade, as proteases microbianas podem ser divididas em ácidas (pH entre 2 e 5), neutras (pH entre 5 e 8) e alcalinas (pH superior a 8), sendo que bactérias, em geral produzem proteases neutras ou alcalinas, enquanto os fungos produzem os três tipos de proteases (RAO et al., 1998). Baseado no tipo de reação catalisada, as proteases podem ser classificadas em exopeptidases, enzimas que clivam os peptídeos nas suas porções amino ou carboxi-terminal, e endopeptidases, enzimas que clivam ligações interiores nas moléculas dos peptídeos (RAO et al., 1998). De acordo com o tipo de natureza química do sítio catalítico, as proteases são divididas em serino proteases (S), aspártico proteases (A), cisteína proteases (C) e metaloproteases (M) (HARTLEY, 1960). Finalmente, um último critério de classificação é a relação evolutiva entre as enzimas, baseada na sua sequência de aminoácidos (RAWLINGS & BARRETT, 1993).

As celulases, amilases, xilanases e pectinases são carboxi-hidrases, cujos substratos diferenciam-se pelo tipo de monossacarídeos presentes, bem como pelo tipo de ligação entre eles. As celulases são enzimas capazes de promover a hidrólise de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 na celulose (BAYER et al., 1998). Elas podem ser divididas em três grupos de enzimas endo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanase (EC 3.2.1.4), exo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanase (EC 3.2.1.91), e  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21). As exoglucanases atuam nas extremidades da cadeia de celulose e liberam como produto  $\beta$ -celobiose, enquanto as endoglucanases atacam randomicamente ligações O-glicosídicas, resultando em cadeias de diferentes comprimentos. Finalmente, as  $\beta$ -glicosidases agem especificamente nos dissacarídeos da  $\beta$ -celobiose, produzindo glicose (KUHAD et al., 2011). As celulases podem ser encontradas na sua forma livre, apresentando um domínio de ligação à celulose e um domínio de ligação catalítico, ou ser encontradas em grandes complexos enzimáticos denominados celulosomas (BEGUIN & LEMAIRE, 1996; BAYER et al., 1998).

Amilases são carboxi-hidrases que realizam a hidrólise da molécula de amido. Elas podem ser classificadas como  $\alpha$ -amilases ou  $\beta$ -amilases, de acordo com o tipo anomérico do açúcar produzido pela reação enzimática (GUPTA et al., 2003). As  $\alpha$ -amilases (1,4- $\alpha$ -D-glicano glicano-hidrolase, EC 3.2.1.1), possuem atividade endo-hidrolítica e atuam aleatoriamente sobre ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, produzindo uma mistura de glicose, maltose e dextrinas. Elas podem ser encontradas em animais, plantas, fungos e bactérias, sendo muito importantes no processo de hidrólise do

amido, pois promovem o ataque inicial aos grânulos de amido, possibilitando a ação de outras enzimas degradativas (GUPTA et al., 2003). Já as  $\beta$ -amilases (1,4- $\alpha$ -D-glicano malto-hidrolase, EC 3.2.1.2) possuem atividade exo-hidrolítica e atuam na penúltima ligação  $\alpha$ -1,4-glicosídica do amido removendo, a partir da extremidade não redutora da cadeia, sucessivas unidades de  $\beta$ -maltose, com inversão da configuração do carbono anomérico inicial do açúcar liberado. Estas enzimas podem ser encontradas em vegetais superiores e em algumas bactérias Gram-positivas (PUJADAS et al., 1996).

Xilanases são carbohidrases que catalisam a hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4 da xilana, um heteropolímero composto principalmente por D-xilose e, em menor quantidade, por L-arabinose (BEG et al., 2001). Existem diferentes tipos de xilanase, contudo, elas atuam sinergicamente no processo de hidrólise da xilana. Endo- $\beta$ -1,4-xilanases ( $\beta$ -1,4-D-xilano xilano-hidrolases, EC 3.2.1.8),  $\beta$ -1,4 xilosidases ( $\beta$ -1,4-D-xiloside xilo-hidrolases, EC 3.2.1.37) e exoxilanases ( $\beta$ -1,4-D-xilan xilo-hidrolases) são enzimas capazes de clivar ligações glicosídicas da cadeia principal do xilano, formada predominantemente por  $\beta$ -xilopiranosídeos (SÁ-PEREIRA, 2003). Assim como nas celulases, as endoxilanases hidrolisam randomicamente ligações no interior da cadeia de xilana e exoxilanases hidrolisam ligações na extremidade da cadeia. Por fim, as xilosidases hidrolisam xilo-oligossacarídeos em monômeros de xilose (BEG et al., 2001).

Pectinases são enzimas que auxiliam na clivagem das pectinas. A classificação destas enzimas é baseada no seu modo de ação sobre o esqueleto de galacturonano das pectinas, incluindo o tipo de ataque (randômico ou terminal) (ALIMARDANI-THEUIL et al., 2011). Dessa forma, essas enzimas são separadas em três principais grupos: as enzimas de-esterificantes - pectinesterase (3.1.1.11) e pectina-acetil esterase (3.1.1.6); enzimas depolimerizantes, responsáveis pela clivagem de ligações  $\alpha$ -(1,4)-glicosídicas, por meio da hidrólise - endopoligalacturonases (3.2.1.15), exopoligalacturonases (3.2.1.67) e exo-poli- $\alpha$ -galacturonases (3.2.1.82), ou por meio de reações de eliminação - endopectateliases (4.2.2.2), exopectateliases (4.2.2.9) e endopectinaliases (4.2.2.10); e as enzimas protopectinases, que solubilizam a protopectina, forma nativa unida com outros constituintes das células vegetais (ALIMARDANI-THEUIL et al., 2011).

Vários trabalhos investigam o potencial de produção das exoenzimas (enzimas secretadas) descritas por micro-organismos associados às plantas. Em associação com azeitonas verdes, foram obtidos 85 isolados de 14 espécies diferentes de leveduras, das quais as três espécies *Pichia membranifaciens*, *Pichia galeiformis*, *Candida thaimueangensis* e as três espécies *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida boidinii* e *Candida sorbosivorans* apresentaram, respectivamente, atividades proteolíticas e lipolíticas expressivas (BAUTISTA-GALLEGO et al., 2011). Atividade proteolítica também foi verificada em isolados dos gêneros *Candida* e *Pichia*, obtidos a partir de frutos de *Parahancornia amapa* amazônico (BRAGA et al., 1998). Associadas às frutas tropicais acerola, mangaba e maracujá, foram isoladas 300 leveduras, entre as quais, aproximadamente 21 isolados apresentaram produção de pectinases, incluindo os gêneros *Kluyveromyces*, *Stephanoascus*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Candida* e *Debaryomyces* (SILVA et al., 2005).

Um estudo em que foram obtidos fungos endofíticos não-micorrízicos de raízes de plantas medicinais mostrou que cinco isolados identificados como *Talaromyces flavus*, *Paecilomyces variabilis*, *Mortierella hyalina* e *Penicillium* sp.(2) apresentaram atividade enzimática variada para amilase (apenas *P. variabilis*), celulase, lipase, protease e xilanase (BHAGOBATY & JOSHI, 2012). De 191 leveduras e fungos leveduriformes endofíticos e epifíticos isolados do filoplano de bromélia, 40 a 60% apresentaram potencial amilolítico, celulolítico e proteolítico, destacando-se como produtores das exoenzimas espécies de *Candida*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Cryptococcus*, *Fellomyces*, *Kockovaella*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Tremella*, *Aureobasidium*, *Itersonilia* e *Tilletiopsis* (LANDELL, 2006).

A produção de exoenzimas também tem sido relatada e caracterizada em fitopatógenos. Em *Blumeria graminis*, um fungo oídio causador de doenças foliares em cereais, foi relatada e caracterizada a secreção de lipases (Lip1) na superfície do hospedeiro durante o processo de infecção (FENG et al., 2009). Em *Botrytis cinerea*, fitopatógeno ubíquo, também tem sido observada a secreção de exoenzimas, como cutinases e esterases, durante a infecção de plantas (VAN KAN et al., 1997).

Enzimas hidrolíticas produzidas pelos micro-organismos associados às plantas tem grande importância na interação entre esses organismos. Se por um

lado as enzimas são necessárias para a ciclagem dos nutrientes, por outro lado elas podem estar envolvidas em processos fitopatológicos, como já foi relatado, causando uma série de prejuízos às plantas. Estes prejuízos muitas vezes são refletidos nas atividades agrícolas. O desenvolvimento de doenças nas plantas cultivadas leva a quedas de produção consideráveis e muitas são as perdas com o apodrecimento pós-colheita. Estudos envolvendo o controle biológico ou químico destes micro-organismos ou mesmo a inativação dessas enzimas são importantes para redução dos prejuízos causados neste setor.

Uma forma positiva de exploração das enzimas microbianas nas atividades humanas é seu uso em processos industriais. Entre as enzimas hidrolíticas comercializadas, a maioria de origem microbiana, as proteases, carboxi-hidrases e lipases estão entre as classes de enzimas mais importantes (ANDUALEMA et al., 2012). Apesar destas enzimas também serem produzidas por plantas e animais, as enzimas de origem microbiana apresentam vantagens como a alta especificidade, com alta variedade de atividades catalíticas, alta produtividade e facilidade para manipulações por engenharia genética, e menores impactos ambientais (ANDUALEMA et al., 2012).

Vários trabalhos reúnem informações acerca de características bioquímicas, fontes produtoras e aplicações industriais das carboxi-hidrases, entre amilases, celulases, xilanases e pectinases (BEG et al, 2001; KASHYAP et al., 2001; GUPTA et al., 2003; JAYANI et al., 2005; KUHAD et al., 2011), lipases (BORNSCHEUER, 2002; ANDUALEMA et al., 2012) e proteases (KUMAR & TAKAGI, 1999). Entre as indústrias com maior potencial de aplicação citadas estão as indústrias alimentícia, química e farmacêutica, têxtil e de couro, produção de papel, na agricultura, produção de detergentes, alimentação de animais e produção de biocombustíveis, como o etanol e o biodiesel.

Apesar de sua produção ser econômica, rápida, fácil e eficiente, um grande limitador para o uso comercial das enzimas extracelulares é a tecnologia para sua purificação, que atualmente apresenta um custo superior ao da produção. Outras dificuldades estão relacionadas com a capacidade de catálise das enzimas, suscetibilidade a proteases e outros agentes químicos, bem como a adequação das condições ótimas de atividade, como pH, temperatura, grau de saturação, entre outros. Formas de contornar os problemas citados são a utilização de células

imobilizadas dos micro-organismos produtores, que reduz os custos com purificação das enzimas, e engenharia genética de proteínas (KUHAD et al., 2011; ANDUALEMA et al., 2012).

### **2.3.3 Produção de auxinas e disponibilização de fósforo livre por micro-organismos**

Auxinas são fitohormônios responsáveis pela extensão, divisão e diferenciação de células e tecidos vegetais, podendo estimular a germinação de sementes e tubérculos, promover a produção de xilema e formação de raízes, controlar processos de crescimento vegetativo, tropismo, florescência e frutificação das plantas, podendo afetar também a fotossíntese, biossíntese de vários metabolitos e produção de fatores de resistência a estresses ambientais (ZHAO, 2010).

Muitos micro-organismos associados às plantas são capazes de produzir auxina, entre outros fitohormônios, incluindo bactérias (KHALID et al, 2004; TSAVKELOVA et al., 2007; AHMAD et al., 2008; BHATTACHARYYA & JHA, 2012), leveduras (NASSAR et al., 2005; XIN et al., 2009; LIMTONG & KOOWADJANAKUL, 2012) e fungos filamentosos (RINCÓN et al., 2003; MAOR et al., 2004).

O ácido indol-3-acético (AIA) é a principal auxina de ocorrência natural nas plantas (TSAVKELOVA et al., 2006). Células vegetais e micro-organismos compartilham algumas vias de biossíntese de AIA. Nas plantas, as vias de biossíntese de AIA podem ser dependentes ou independentes de triptofano, enquanto nos micro-organismos, elas são predominantemente dependentes deste aminoácido (ZHAO, 2010). Nas vias dependentes de triptofano, AIA pode ser formado por uma reação de desaminação oxidativa (através da formação de ácido indol-3-pirúvico) ou de descarboxilação (através da formação de triptamina, tendo o aldeído indol-3-acético como um intermediário) deste aminoácido (ZHAO, 2010). Entretanto, a via de biossíntese utilizada por micro-organismos melhor compreendida utiliza o triptofano, gerando como produto intermediário indol-3-acetamida (CAMILLERI & JOUANIN, 1991).

O papel ecológico dos micro-organismos produtores de auxinas, nas interações com as plantas, é diverso. Alguns fitopatógenos, como *Agrobacterium*,

produzem auxina para induzir as células vegetais a produzir mais nutrientes (KÖRBER et al., 1991). Já em bactérias fixadoras de nitrogênio, como *Rhizobium*, a produção de auxinas está relacionada com a formação dos nódulos nas raízes de leguminosas (KEFFORD et al., 1960). Sendo assim, a produção de auxinas parece ser um importante fator nos processos de sinalização planta-micro-organismo, adesão e colonização. Outros trabalhos recentes que demonstram isto envolvem os gêneros *Trichoderma* (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009), e as espécies *Pseudomonas syringae* (NAVARRO et al., 2006) e *Sacharomyces cerevisiae* (PRUSTY et al., 2004).

Independentemente da função ecológica das auxinas produzidas pelos micro-organismos associados, seu efeito benéfico nas plantas é importante, pois este hormônio contribui para promoção do seu crescimento (BERG, 2009). Por este motivo, muitos estudos têm sido realizados com o intuito de isolar micro-organismos a partir de seus hospedeiros vegetais e caracterizá-los quanto à produção de auxinas e ao potencial de promoção de crescimento nas plantas.

Estudos mostraram que bactérias não identificadas isoladas de tecidos da raiz de beterrabas (endofíticas) e da rizosfera de trigo, selecionadas quanto ao potencial de produção de auxinas e inoculadas em condições axênicas em mudas e sementes de suas plantas de origem, promoveram uma aceleração no processo de germinação das sementes, bem como o crescimento de raízes e partes aéreas, quando comparado com os grupos controle (KHALID et al., 2004; SHI et al., 2009). Cianobactérias do gênero *Anabaena* isoladas de rizosfera de arroz e trigo e selecionadas quanto à produção de AIA *in vitro* promoveram a aceleração do processo de germinação quando inoculadas em sementes de trigo desinfetadas, bem como promoveram o crescimento das plântulas em relação ao controle (PRASANNA et al., 2010).

Foi demonstrado que a levedura ascomicética *Cyberlindnera (Williopsis) saturnus*, isolada a partir de tecidos da raiz de milho, apresentou potencial de produção de AIA *in vitro* e foi capaz de promover o crescimento das raízes e brotos das plântulas, ao ser inoculada em sementes desinfetadas de milho (NASSAR et al., 2005). De nosso conhecimento, este foi o primeiro relato de levedura endofítica de raiz produtora de auxinas capaz de promover o crescimento de plantas. Três isolados de leveduras endofíticas das espécies *Rhodotorula graminis* e *Rhodotorula*



*mucilaginosas*, obtidas de caules de álamos do gênero *Populus*, também apresentaram potencial de produção de auxinas *in vitro* (XIN et al., 2009).

O potencial de uso dessas linhagens microbianas produtoras de auxina como inoculantes agrícolas possui muitas vantagens em relação aos fitohormônios sintéticos de alto custo, entre elas o amplo espectro de atividade, níveis ótimos de produção e presença de outros compostos biologicamente ativos, como as vitaminas, necessários para o desenvolvimento normal da planta (TSAVKELOVA et al., 2006).

Outro grupo de micro-organismos que apresenta relevante papel como promotor de crescimento das plantas são os solubilizadores de fosfato (GYANESHWAR et al., 2002). O fósforo (P) é um elemento importante a todas as formas de vida por fazer parte de biomoléculas como ácidos nucleicos e ATP. Apesar de ser um elemento largamente distribuído na natureza, o fósforo encontra-se predominantemente presente nos solos na sua forma inorgânica insolúvel, associado com íons de alumínio, cálcio ou ferro, ou na sua forma orgânica (mais de 50%), principalmente como fitato, um sal hexafosfato de inositol. A forma solúvel do fósforo, capaz de ser absorvida pelos organismos, encontra-se em concentrações muito baixas, da ordem de micromolares (RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999; GYANESHWAR et al., 2002).

Alguns micro-organismos são capazes de disponibilizar este elemento em sua forma livre, capaz de ser absorvida e utilizada pelos demais organismos, desempenhando um importante papel na ciclagem deste elemento (BERG, 2009). Os micro-organismos podem usar vários mecanismos para promover a solubilização e/ou disponibilização do fósforo livre. Entre os mecanismos de solubilização de fosfato inorgânico, estão a redução do pH do ambiente por produção de ácidos orgânicos ou liberação de prótons, sequestro de íons e trocas iônicas no ambiente de crescimento, mecanismos de acúmulo de fósforo no interior das células microbianas (BHATTACHARYYA & JHA, 2012).

Já a solubilização do fósforo presente em moléculas orgânicas é realizada principalmente por meio de enzimas fosfatases (RODRÍGUEZ et al., 2006). As fosfatases realizam uma reação de desfosforilação, clivando ligações fosfoéster ou fosfoanidridos, em moléculas orgânicas. As fosfatases são classificadas como ácidas, neutras ou alcalinas, dependendo das condições ótimas de pH da catálise

(RODRÍGUEZ et al, 2006). Entre as fosfatases estão as fitases (EC 3.1.3.8), umas das enzimas responsáveis pela hidrólise do fitato em derivados de fosfato mioinositol e fosfato inorgânico (SINGH & SATYANARAYANA, 2011). As plantas produzem fitato em concentrações muito baixas, entretanto, as fitases podem ser produzidas por micro-organismos associados à rizosfera e sua presença no solo aumenta o crescimento da planta (SINGH & SATYANARAYANA, 2011).

Trabalhos recentes demonstraram a habilidade de solubilização de fosfatos por bactérias, leveduras e fungos associados a plantas. Em bactérias, a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico insolúvel foi demonstrada em *Bacillus* sp. (RYU et al. 2005), *Pantoea agglomerans* P5, *Microbacterium laevaniformans* P7 e *Pseudomonas putida* P1A (MALBOOBI et al., 2009), bem como a produção de fitases extracelulares foi demonstrada em actinomicetos do gênero *Streptomyces* (GHORBANI et al, 2012). Leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces* (NARSIAN et al., 2010; HESHAM e MOHAMED, 2011), *Candida* (TSANG, 2011), *Pichia* (KAUR, 2010) e *Blastobotrys* (SANO et al., 1999) e fungos filamentosos dos gêneros *Absidia* (NENWANI et al., 2010), *Penicillium*, *Aspergillus* (PRADHAN e SUKLA, 2006; SINGH e REDDY, 2011), *Trichoderma* (VINALE et al., 2008), *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* (LEELAHAWONGE & PONGSILP, 2009) e da espécie *Glomus intraradices* (PRASAD et al., 2012), isolados de plantas, também foram caracterizados como solubilizadores de fosfatos orgânicos e inorgânicos.

Como o fósforo é o segundo mais importante nutriente limitante do crescimento das plantas (sendo o nitrogênio o principal), os micro-organismos capazes de disponibilizar este elemento em sua forma livre têm sido considerados importantes promotores do crescimento vegetal. Sua utilização na agricultura tem sido amplamente estudada, pois reduz a necessidade de uso excessivo de fertilizantes (GYANESHWAR et al., 2002; RICHARDSON et al., 2009; HINSINGER et al., 2011; SINGH & SATYANARAYANA, 2011). Estes bioinoculantes têm como objetivo melhorar a saúde da planta e aumentar sua produtividade, em detrimento do uso dos agentes químicos sintéticos e ampliação das áreas cultiváveis, garantindo o abastecimento da crescente população e promovendo segurança para o consumo humano e para o meio ambiente (BERG, 2009).

### 2.3.4 Macaúba e microbiota associada

Os trabalhos na literatura que investigam a diversidade e o papel dos micro-organismos associados à palmeira macaúba são escassos. O potencial para controle biológico utilizando um isolado de levedura da espécie *Saccharomycopsis crataegensis* UFMG-DC 19.2, obtido a partir do fruto da macaúba, foi demonstrado contra o fitopatógeno de laranjas *Penicillium digitatum* LCP 4354 (PIMENTA et al., 2010). Neste trabalho, entretanto, não foi realizado nenhum estudo acerca da diversidade de micro-organismos associados à palmeira.

A diversidade de leveduras associadas aos frutos de uma população de palmeiras macaúba na região da Serra do Cipó, MG, em três diferentes períodos da coleta (fruto no cacho e após contato com o solo), foi caracterizada em um estudo pioneiro recente (FARIA, 2012). Neste trabalho, foram obtidos 112 isolados, pertencentes a 13 espécies diferentes, entre elas: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida silvae*, *Clavispora lusitaniae*, *Pichia kudriavzevii*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia galeiformis*, *Pichia kluyveri*, *Pichia manshurica*, *Pichia membranifaciens*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Galactomyces geotrichum* e *Trichosporon asahii*, que colonizaram os frutos durante diferentes períodos de deposição no solo. Ainda neste trabalho, os potenciais de produção das exoenzimas protease, lipase, amilase, celulase, xilanase e pectinase pelas leveduras isoladas foram investigados, destacando-se como versáteis produtoras as espécies *Pichia kudriavzevii*, *Clavispora lusitaneae*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Pichia galeiformis* (FARIA, 2012).

O estudo da diversidade de leveduras, bem como de outros micro-organismos, associados a populações de macaúbas de outras localidades, assim como o aprofundamento desses estudos, podem fornecer informações importantes sobre a ecologia dessa palmeira. Além disso, ainda não há relatos do potencial de produção de fatores de crescimento como auxinas e solubilizadores de fosfato pela microbiota associada à palmeira. Em geral, estudos que envolvem fungos associados a palmeiras no Brasil são escassos, tendo sido relatados isolamentos de tecidos de plantas de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) (RODRIGUES, 1994) e de coco (*Cocos nucifera* L.) (MARIANO et al., 1997).

O estudo da biodiversidade, bem como do papel dos micro-organismos associados à macaúba é relevante para o entendimento da ecofisiologia da palmeira, importante para a conservação da espécie e também para sua domesticação. Através destes estudos é possível identificar micro-organismos com potencial de produção de fatores de crescimento, em populações naturais ou em plantios comerciais, e com isso estabelecer critérios de manejo e conservação. Finalmente, o conhecimento do potencial de produção de metabólitos secundários e enzimas por esta microbiota associada pode ser utilizado tanto para determinação dos fatores que afetam a qualidade do fruto durante o período de pós-colheita, quanto para obtenção de enzimas de uso industrial e de bioinoculantes agrícolas.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a diversidade de leveduras associadas aos frutos de uma população de palmeira macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jaq.) Lodd. ex Mart), de ocorrência natural em Casa Branca, Brumadinho/MG, e caracterizar os isolados quanto à produção de exoenzimas e fatores de crescimento.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Agrupar e identificar as leveduras isoladas de frutos de uma população de palmeiras macaúba (*Acrocomia aculeata*), por meio de sua macromorfologia e de técnicas moleculares: PCR *fingerprinting* e sequenciamento;
- Avaliar a similaridade, riqueza, abundância e diversidade das populações de leveduras associadas aos frutos, por período de coleta;
- Avaliar o potencial das leveduras isoladas quanto à produção das exoenzimas hidrolíticas lipase, protease, celulase, amilase, pectinase e xilanase;
- Avaliar o potencial das leveduras isoladas quanto à produção da auxina ácido indol-3-acético (AIA) e quanto ao potencial de solubilização de fosfatos;
- Verificar associação entre as atividades enzimáticas e habilidades de produção de fatores de crescimento apresentadas pelos isolados com os períodos de coleta.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material biológico**

Para realização deste trabalho foram utilizados 529 isolados de levedura, obtidos a partir de frutos de palmeiras macaúba, localizadas na região de Casa Branca, Brumadinho, MG. Os isolados estão depositados na Coleção de Microorganismos e Células do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Tratam-se de 3 isolados originados do epicarpo (ENC), 50 isolados do mesocarpo (ENDO) e 476 isolados da superfície do fruto da macaúba (345 + 131 replicatas de um mesmo morfotipo, item 4.1.2). Os procedimentos de amostragem dos frutos e isolamento das leveduras foram realizados pela equipe do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, e encontram-se descritos nos itens 4.1.1 e 4.1.2.

#### **4.1.1 Área de coleta e amostragem**

A área de coleta do material biológico é a região de Casa Branca, um povoado situado em um vale na região serrana (sul) da grande Belo Horizonte, no entorno do Parque Estadual da Serra do Rola-Moça, município de Brumadinho, no estado de Minas Gerais (Figura 1).

Neste local, a equipe do LMA realizou, nos meses de abril e maio de 2011, uma coleta de frutos de macaúba, que foram utilizados para o isolamento das leveduras a serem estudadas neste projeto. A área de coleta e amostragem foi definida observando fatores como a presença de endemia de indivíduos na área de amostragem, presença de frutos maduros nas palmeiras, o acesso a estas palmeiras, presença de animais na região e características do solo.

A coleta dos frutos utilizados no isolamento foi feita a partir de 7 palmeiras de macaúbas, provenientes de formações nativas de diversas áreas na região (Figura 1). Os frutos foram coletados de palmeiras selecionadas ao acaso, totalizando 24 cocos por indivíduo, dos quais 4 foram levados para o laboratório. Os demais cocos ficaram no campo, acondicionados em sacos plásticos tipo engrazamento de nylon, mantidos sobre o solo, embaixo da palmeira de origem, protegidos com uma tela de

viveiro. Foram feitas coletas a cada sete dias, sendo os frutos coletados nos tempos 0 (a partir da palmeira) 7, 14, 21, 28 e 35 dias (frutos já depositados no solo) (Apêndice A). Após a coleta em campo, os frutos foram levados ao laboratório, onde foi realizado o isolamento dos micro-organismos epifíticos e endofíticos.

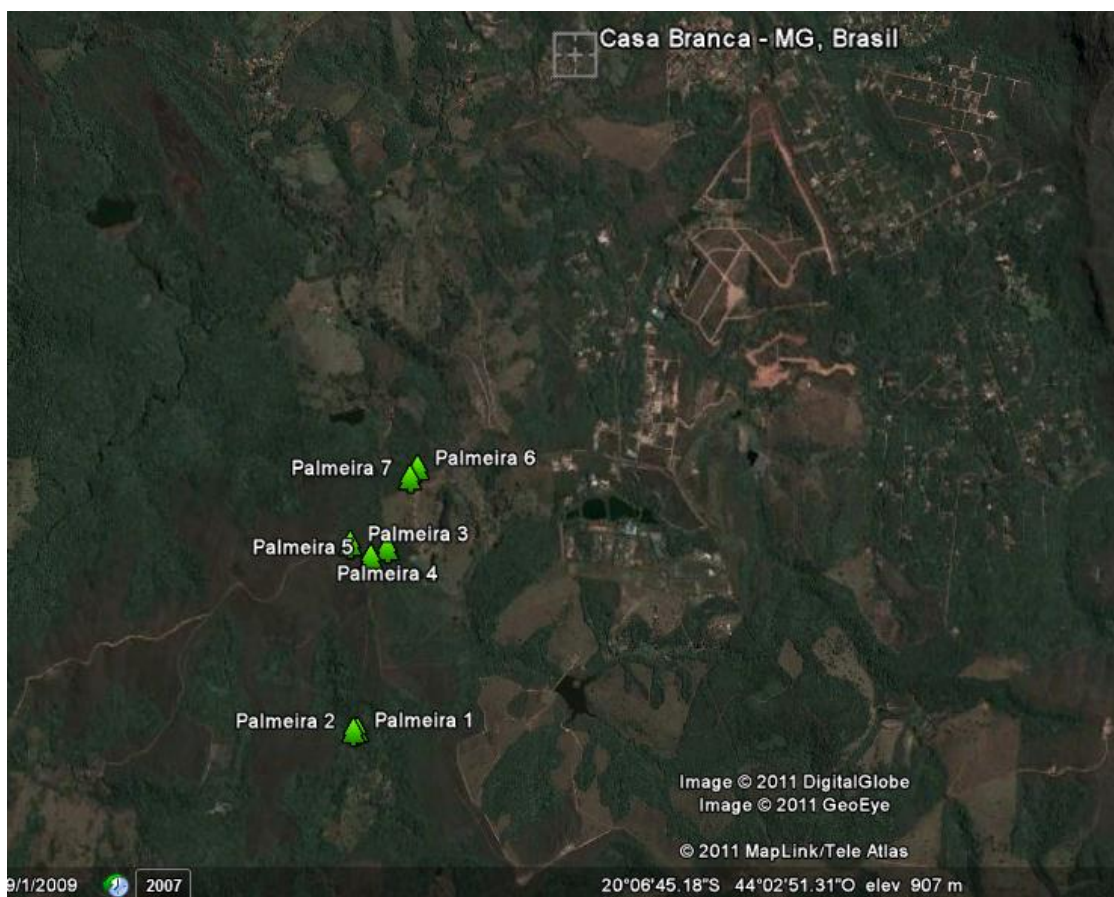


Figura 1. Imagem de satélite mostrando o município de Brumadinho/MG e o povoado de Casa Branca. Os pontos em verde referem-se à localização aproximada das palmeiras onde foram coletados os frutos.

#### 4.1.2 Isolamento e preservação de leveduras por método de cultivo

A metodologia de isolamento das leveduras associadas ao fruto foi realizada diferentemente, com o objetivo de obter micro-organismos colonizadores da superfície do fruto (epifíticos) e dos tecidos internos do epicarpo e do mesocarpo (endofíticos), segundo metodologia descrita por Faria (2012).

### *Isolamento de leveduras epifíticas*

Para o isolamento das leveduras epifíticas, foram adicionados 100 mL de solução salina 0,85% em sacos plásticos de primeiro uso contendo o fruto coletado. Estes sacos foram colocados em banho de ultrassom por 30 minutos para ajudar no desprendimento dos micro-organismos da superfície do fruto. A seguir, alíquotas de 1 ml da suspensão de micro-organismos foram diluídas serialmente em salina. De cada uma das diluições, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram plaqueadas em meio Ágar Extrato de Malte e Levedura (YM/Difco) suplementado com 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de cloranfenicol (Sigma/EUA) para inibir o crescimento de bactérias. As placas foram incubadas a 25 - 28°C por um período de até 60 dias, e os diferentes morfotipos de leveduras foram enumerados (UFCg<sup>-1</sup>) e purificados em novas placas de Petri contendo ágar YM. Foi amostrado pelo menos um isolado de cada morfotipo apresentado por fruto (345). Ademais, foram amostradas ao acaso 2 colônias com as mesmas características macromorfológicas (morfotipo), as quais foram chamados de replicata (131). Algumas replicatas foram submetidas à tipagem molecular, PCR *fingerprinting* (GTG)<sub>5</sub>, para verificar se a caracterização macromorfológica foi suficiente para correta seleção/definição de morfotipo. Tipagens idênticas entre as replicatas validaram a estratégia de seleção e enumeração dos isolados utilizada.

As leveduras isoladas foram mantidas em Ágar Sabouraud (peptona 1%, dextrose 4% e ágar 2%) e conservadas em caldo GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2%) com 20% de glicerol a - 80°C. Todos os isolados obtidos durante o estudo foram depositados na Coleção de Micro-organismos e Células do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

### *Isolamento de leveduras endofíticas*

Para o isolamento das leveduras endofíticas, os frutos coletados foram limpos superficialmente com detergente neutro e enxaguados com água destilada esterilizada em abundância. Os fragmentos do epicarpo (casca) dos frutos foram cortados em tamanhos semelhantes (aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>) com auxílio de micro retífica adaptada com uma lixa de cilindro. Três fragmentos do epicarpo de cada fruto foram desinfetados com álcool a 70% (v/v) por 1 min, água destilada estéril por 1 minuto, e, subsequentemente, com hipoclorito a 2% (v/v) por 3 min e água destilada esterilizada por 3 minutos. Após desinfecção superficial, os fragmentos



foram transferidos para placas de Petri contendo YM suplementado com  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  cloranfenicol (Sigma/EUA). Alíquotas da água destilada esterilizada utilizada ao final do processo de desinfecção foram também plaqueadas em meio YM para assegurar que somente micro-organismos endofíticos foram isolados (controle negativo). Os isolados de foram preservados conforme descrito no item anterior.

Para o isolamento das leveduras endofíticas do mesocarpo (polpa), 1 g da polpa de cada fruto foi triturado em homogeneizador Ultra Turrax com 9 mL de solução salina (0,85%) estéril. A seguir, alíquotas de 1 ml da suspensão foram diluídas serialmente. De cada uma das diluições, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram plaqueadas em meio YM suplementado com  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cloranfenicol (Sigma/EUA). As placas foram incubadas a 25 - 28°C por um período de até 60 dias, e os diferentes morfotipos de leveduras obtidos foram enumerados (UFCg<sup>-1</sup>) e purificados em novas placas de Petri contendo meio YM, como descrito para os micro-organismos isolados da superfície do epicarpo. Os isolados foram preservados conforme descrito no item anterior.

#### *Identificação dos isolados*

A identificação dos isolados obedece aos seguintes critérios: o número cardinal refere-se ao fruto do qual o micro-organismo foi isolado; o número romano refere-se ao morfotipo ao qual o micro-organismo foi associado durante a contagem; e as letras a e b identificam as replicatas desses morfotipos. Caso o micro-organismo tenha sido isolado do mesocarpo do fruto, a identificação é precedida pela sigla "EN", enquanto micro-organismos isolados de fragmentos do epicarpo tem sua identificação precedida por "ENC". Dessa forma, pode-se dizer que o isolado EN164IIa foi obtido a partir do mesocarpo do fruto 164, tratando-se de uma das replicatas do morfotipo II. A correlação do fruto com sua palmeira de origem pode ser consultada no Apêndice A.

#### *Descrição posterior dos isolados*

Após purificação dos isolados obtidos durante a enumeração dos morfotipos, as características macromorfológicas (tamanho, cor e textura da colônia e aspectos das bordas) dos mesmos foram descritas detalhadamente, e os isolados foram enquadrados em 20 morfotipos diferentes (Apêndice B).

### **4.1.3 Seleção dos isolados para realização dos experimentos**

Devido ao grande número de isolados, foram selecionadas inicialmente 290 amostras dos 529 isolados de leveduras obtidos a partir do fruto de macaúba, sendo 257 isolados epifíticos e 29 endofíticos do mesocarpo e 3 endofíticos do epicarpo. Como critério de seleção foram utilizadas as características macro morfológicas das colônias (Apêndice B), sendo selecionado um isolado de cada morfotipo, por palmeira, por período de coleta. Como mencionado, entre os isolados, foram selecionadas também replicatas para condução dos ensaios de PCR *fingerprinting*. A partir desta etapa, nova seleção foi realizada, excluindo as replicatas dos isolados. O número de amostras foi reduzido para 241 isolados, sendo 3 endofíticos do epicarpo, 28 endofíticos do mesocarpo e 210 epifíticos, que foram submetidos às análises de prospecção enzimática e de produção de fatores de crescimento.

## **4.2 Estudo das comunidades de leveduras associadas aos frutos das palmeiras de macaúba**

### **4.2.1 Identificação dos isolados de leveduras por métodos moleculares**

#### **4.2.1.1 Extração do DNA total**

A extração de DNA genômico total das leveduras foi realizada com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). As leveduras foram crescidas em ágar Sabourraud (Sb) a 28°C por 48 horas. Uma alçada das colônias isoladas foi ressuspensa em 100 µL de tampão de lise (SDS 10%; NaCl 5 M; Tris-HCl 1 M; EDTA 0,5 M pH 8,0) e a solução incubada em banho-maria a 65°C por 30-60 minutos. Após esse período foram acrescentados aos tubos 100 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico e estes levados ao vórtex por três minutos. Os tubos com essa suspensão foram centrifugados por 15 minutos a 9000 g e, posteriormente, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo, onde foi acrescido de igual volume de isopropanol. Após 60 minutos à temperatura ambiente, os tubos foram novamente centrifugados por 10 minutos e o sobrenadante descartado por inversão. Foram adicionados 100 µL de etanol 70% gelado,

homogeneizado por inversão e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o etanol residual foi evaporado à temperatura ambiente por 12 horas. Concluída essa etapa, o DNA foi ressuspenso em 50 µL de água destilada esterilizada e armazenado em freezer a -20°C. A qualidade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% e a concentração foi estimada por espectrofotometria, a 260 e 280 nm, em espectrofotômetro Nanodrop™ 1000.

#### **4.2.1.2 PCR utilizando o iniciador (GTG)<sub>5</sub>**

Os grupos de leveduras formados com base nas características macro morfológicas (Apêndice B) foram submetidos a PCR *fingerprinting* para agrupamento por perfil de bandeamento utilizando o iniciador (GTG)<sub>5</sub> (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') (SILVA-FILHO et al., 2005). Cada reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL de uma mistura contendo: 200ng de DNA, 2,0 µL do iniciador (GTG)<sub>5</sub> a 10 pmolµl<sup>-1</sup> (Invitrogen, EUA), 2,5 µL de tampão de PCR 10X, 1 µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1,0 µL de dNTP a 10mM (cada) , 0,2µL de Taq DNA polimerase 5UµL<sup>-1</sup> e o volume final completado com água destilada esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Veriti (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 93°C por 45 segundos, anelamento a 50 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguida por extensão final a 72 °C por 6 minutos. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5% (TBE – 54g de Tris base, 27,5g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8), submetidos à migração durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos a 100 Volts. Os géis contendo brometo de etídio (0,006%) foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação de gel (Vilber Lourmat, França).

#### **4.2.1.3 PCR utilizando os iniciadores NL1 e NL4**

A partir da confirmação dos perfis de similaridade obtidos por meio da PCR com o iniciador (GTG)<sub>5</sub>, um isolado de cada grupo foi submetido a PCR com os

iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), para obter a amplificação da região D1/D2 do gene 26S rRNA (KURTZMAN & ROBBNET, 1998).

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50  $\mu\text{L}$  contendo: 200ng de DNA, 1,0  $\mu\text{L}$  de cada iniciador NL1 e NL4 10  $\text{pmol}\mu\text{L}^{-1}$  (MWG Biotech), 5,0  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR 10X, 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50mM, 1,0  $\mu\text{L}$  de dNTP a 10 mM (cada), 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase 5U $\mu\text{L}^{-1}$  e o volume final completado com água destilada esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Veriti (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 93°C por 15 segundos, anelamento a 54°C por 25 segundos e extensão a 72 °C por 20 segundos, seguida por extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE 0,5X, submetidos à migração durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos a 100 Volts. Os géis contendo brometo de etídio (0,006%) foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação de gel (Vilber Lourmat, França).

#### **4.2.1.4 PCR utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4**

Para alguns isolados, foi necessária a amplificação e sequenciamento de outra região gênica. Nestes casos foi realizada a PCR com os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), para obter a amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA (WHITE et al.,1990).

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50  $\mu\text{L}$  contendo: 200ng de DNA, 1,5  $\mu\text{L}$  de cada iniciador ITS1 e ITS4 10  $\text{pmol}\mu\text{L}^{-1}$  (MWG Biotech), 5,0  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR 10X, 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50mM, 1,0  $\mu\text{L}$  de dNTP a 10 mM (cada), 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase 5U $\mu\text{L}^{-1}$  e o volume final completado com água destilada esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Veriti (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 93°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguida por extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE 0,5X, eluídos durante aproximadamente 1 hora a

100 V. Os géis foram corados com solução de brometo de etídio (0,006%), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em um sistema de fotodocumentação de gel (Vilber Lourmat, France).

#### **4.2.1.5 Ensaios de sequenciamento**

Os produtos de PCR obtidos foram purificados utilizando ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Para cada amostra, 45 µL do produto de PCR foram transferidos para tubos de microcentrífuga de 200 µL, juntamente com 11,25 µL de solução de EDTA 125 mM e 135 µL da solução de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada, incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugada a 9000 g por 25 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento acrescido de 120 µL de etanol 70%. A mistura foi homogeneizada, seguida de centrifugação por 10 minutos a 9000 g, a 25°C. Após evaporação do etanol à temperatura ambiente por 12 horas, o sedimento foi ressuscitado em 10 µL de água deionizada estéril. O DNA foi quantificado por meio do espectrofotômetro Nanodrop™ 1000 a 260 e 280 nm para estimar as concentrações necessárias a serem utilizadas na reação de sequenciamento.

As reações foram realizadas usando o kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems®) em combinação com o sistema de sequenciamento ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems®), no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisa René Rachou, MG. Para as reações de sequenciamento foram utilizados 12-20 ng do DNA purificado e os reagentes presentes no kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems®). Todo o processo foi feito diretamente na placa de 96 poços. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 0,8 µL do reagente BigDye® Terminator, 1,6 µL do tampão do kit, 5 pmol de primer (NL1 ou NL4 ou ITS1 ou ITS4) e 12-20 ng do DNA purificado, completando-se o volume final com água deionizada estéril. Após preparo da reação, a placa foi selada e levada ao termociclador. O programa da PCR consistiu de uma desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Para o processo de precipitação, foram adicionados ao produto da reação 2,5 µL de solução de EDTA 125 mM, dispensados na lateral

dos poços da placa, e 30 µL da solução de etanol absoluto. A placa foi levemente batida sobre a bancada para que as gotas do EDTA se misturassem à reação e, posteriormente, foi submetida à breve agitação em vórtex e incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Após período de incubação, a placa foi centrifugada a 3000 g por 45 minutos a 25°C e o sobrenadante foi descartado por inversão, sobre um papel absorvente. Em seguida, foram adicionados 30 µL de etanol 70% a cada poço. A placa foi novamente centrifugada 15 minutos a 3000 g, a 25°C e o sobrenadante foi então descartado. Para remoção do excesso de etanol, a placa foi invertida sobre um papel absorvente e submetida a um pulso em centrífuga a 500 g durante 1 segundo. Após evaporação do etanol à 60°C por 10 minutos no termociclador, o DNA das amostras foi ressuscitado em 10 µL de Formamida HI DI e a placa foi submetida à agitação em vórtex por 2 minutos. A desnaturação foi realizada a 95°C por 2 minutos, em termociclador. Após esta etapa, as amostras foram injetadas no sistema automatizado ABI 3730.

As sequências foram analisadas utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), para a comparação com as sequências depositadas no GenBank. A identificação dos isolados no nível de espécie foi proposta baseada na identidade igual ou maior do que 99% do fragmento sequenciado com sequências de referência depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Foi observado também como critério o número de substituições de bases: 0 a 3 bases diferentes não contíguas, pode ser considerada a mesma espécie, e maior ou igual a 6 substituições, pode ser considerada uma espécie nova, para as sequências da região D1/D2; enquanto que, para a região ITS, até 8 substituições na mesma sequência pode ser considerada a mesma espécie (KURTZMAN e ROBBNET, 1998, FELL et al., 2000; SCORZETTI et al., 2002).

#### **4.2.2 Análises de ecologia**

A taxa de colonização dos frutos foi calculada tanto para epifíticos como para endofíticos, utilizando-se a fórmula:  $N_d/N_t \times 100$ ; onde  $N_d$  e  $N_t$  correspondem, respectivamente, ao número de frutos dos quais foi possível isolar uma ou mais

leveduras epifíticas/endofíticas e ao número total de frutos amostrados (ISAEVA et al., 2006).

Valores de densidade média foram calculados dividindo a abundância total de leveduras observadas em comunidades associadas a frutos em diferentes tempos de deposição no solo (soma dos valores de UFC/fruto de todos os isolados) pelo número de frutos coletadas em cada amostragem (ISAEVA et al., 2006). Os valores foram expressos em logaritmo na base 10.

Para verificar se o número de unidades amostrais foi suficiente para amostrar a riqueza de leveduras a elas associadas, considerando as diferentes épocas de coleta, foram construídas curva de acumulação de espécies (curva de rarefação baseada em amostras) com os respectivos intervalos de confiança a 95% de probabilidade, a partir da média de 100 aleatorizações geradas com os dados obtidos em campo pelo software R 3.0.3 (R Development Core Team, 2014). O mesmo programa foi utilizado para a obtenção de uma estimativa da riqueza total com os estimadores Jackknife 1 e Bootstrap, calculada para comunidades associadas aos conjuntos coletados em tempos diferentes (MAGURRAN, 1988; FARIA, 2012; VIEIRA, 2012).

A abundância relativa das espécies foi obtida por meio da razão entre valores de abundância total de cada espécie (soma dos valores de UFC/fruto da espécie) e os valores de abundância total das leveduras, multiplicada por 100 e expressa em porcentagem, calculadas para cada comunidade associada aos frutos, coletados em diferentes períodos de deposição no solo (MAGURRAN, 1988; FARIA, 2012). Curvas de abundância de espécies foram construídas para compreensão do padrão de distribuição das espécies em cada uma das comunidades de leveduras amostradas em tempos diferentes, utilizando o software R 3.0.3.

A frequência relativa de cada espécie foi calculada de acordo com a equação:  $F_i = (J_i/K)*100$ , em que  $F_i$  é a frequência da espécie  $i$ ;  $J_i$  é o número de frutos nos quais a espécie  $i$  ocorreu e  $K$  é o número total de frutos. Também as frequências relativas foram calculadas para cada comunidade associada aos frutos, coletados em diferentes períodos de deposição no solo (FARIA, 2012).

A diversidade de espécies de leveduras, por coleta, foi medida em termos de riqueza, equitabilidade e de diversidade pelos índices de Simpson e Shannon-Wiener (MAGURRAN, 1988), com auxílio do software R 3.0.3. Todos os resultados

foram obtidos com intervalo de confiança de 95% e valores de re-amostragem (bootstrap) calculados a partir de 1.000 interações (FARIA, 2012; VIEIRA, 2012).

Análises partimentadas da diversidade foram obtidas por meio da diversidade beta ou medida de Whittaker (1960), que teve como objetivo comparar a similaridade em termos de diversidade alfa (incluindo riqueza e composição de espécies) existente entre as comunidades associadas a frutos coletados em diferentes períodos, e por meio da análise de contribuição particionada de diversidade descrita por Lu e colaboradores (2007), com a geração do coeficiente de diferenciação de amostras, que avalia o quanto as amostras (no caso, os frutos) variam entre si em termos de riqueza e abundância.

Finalmente, Modelos Lineares Generalizados (GLMs, MCCULLAGH & NELDER, 1989; AUSTIN, 2002) foram utilizados para avaliar o efeito das palmeiras e do tempo nas variações de riqueza e abundância apresentadas entre as comunidades de leveduras amostradas em diferentes tempos.

#### **4.2.3 Avaliação do potencial de produção de enzimas hidrolíticas extracelulares**

Para avaliação do potencial de produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, foram realizados testes qualitativos em meio sólido. Os resultados foram expressos em Índices Enzimáticos (IE), que correspondem à razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

##### **4.2.3.1 Produção do inóculo para os ensaios em meio sólido**

Para a avaliação do potencial de produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, as leveduras foram reativadas das culturas estoques, repicadas pela técnica do esgotamento em placas contendo ágar Sb e incubadas a 25-28°C por 48 horas. Decorrido esse tempo, as colônias foram transferidas com o auxílio de uma alça descartável para tubos de ensaio contendo 2 mL de salina esterilizada formando uma suspensão. A concentração de células foi padronizada por meio da escala de McFarland nº1, correspondente à presença de  $3 \times 10^8$  UFC/mL para leveduras.



#### **4.2.3.2 Amilases**

A habilidade de degradar amido foi usada como critério para determinação da produção de enzimas amilolíticas (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975). Os ensaios foram realizados em meio sólido contendo 1% de amido solúvel, 0,67% de YNB e 2% de ágar. A placa com meio de cultura foi dividida em seis partes, onde foram aplicados 10 µL da suspensão de células de levedura. Os cultivos foram incubados a 28°C por 120 horas e, ao final deste período, a revelação foi realizada pela sublimação de iodo depositado nas tampas das placas. A atividade amilolítica extracelular foi avaliada pela medição da zona clara formada ao redor da colônia utilizando um paquímetro. O restante do meio permaneceu corado de violeta (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).

#### **4.2.3.3 Celulases**

A habilidade de degradar carboximetilcelulose foi usada como critério para determinação da produção de enzimas celulolíticas (TEATHER & WOOD, 1982). Os ensaios foram realizados em meio sólido contendo 1% de carboximetilcelulose, 0,67% de YNB e 1,5% de ágar. Para o preparo deste meio, a carboximetilcelulose foi homogeneizada com o auxílio de um liquidificador. A placa com meio de cultura foi dividida em seis partes, onde foram aplicados 10 µL da suspensão de células de levedura. Os cultivos foram incubados por 120 horas a 28°C e a revelação foi realizada adicionando-se 5 mL de uma solução aquosa de vermelho Congo a 0,03% às placas inoculadas. Decorridos 15 minutos após esse procedimento, as placas foram lavadas com uma solução de NaCl 1M. A hidrólise da carboximetilcelulose foi evidenciada pela formação de um halo de coloração clara ao redor da colônia (TEATHER & WOOD, 1982). A atividade celulolítica extracelular foi avaliada pela medição da zona clara formada ao redor da colônia utilizando um paquímetro.

#### **4.2.3.4 Pectinases**

A habilidade de degradar pectina cítrica foi usada como critério para determinação da produção de enzimas pectinolíticas (BRIZZIO et al., 2007). Os

ensaios foram realizados em meio sólido contendo 1% de pectina cítrica, 0,67% de YNB e 1,5% de ágar. Para o preparo deste meio, a pectina foi homogeneizada com o auxílio de um liquidificador e autoclavada separada do ágar. A placa com meio de cultura foi dividida em seis partes, onde foram aplicados 10 µL da suspensão de células de levedura. Os cultivos foram incubados por 120 horas a 28°C e a revelação foi realizada pela sublimação de iodo depositado nas tampas das placas. A hidrólise da pectina foi evidenciada pela formação de um halo de coloração clara ao redor da colônia (BRIZZIO et al., 2007). A atividade pectinolítica extracelular foi avaliada pela medição da zona clara formada ao redor da colônia utilizando um paquímetro.

#### **4.2.3.5 Xilanases**

A habilidade de degradar xilana foi usada como critério para determinação da produção de enzimas xilanolíticas (BHADRA et al., 2008). Os ensaios foram realizados em meio sólido contendo 1% de xilana, 0,67% de YNB e 2% de ágar. A placa com meio de cultura foi dividida em seis partes, onde foram aplicados 10 µL da suspensão de células de levedura. Os cultivos foram incubados por 120 horas a 28°C e a revelação foi realizada adicionando-se 5 mL de uma solução aquosa de vermelho Congo a 0,03% às placas inoculadas. Decorridos 15 minutos após esse procedimento, as placas foram lavadas com uma solução de NaCl 1M. A hidrólise da xilana foi evidenciada pela formação de um halo de coloração clara ao redor da colônia (BHADRA et al., 2008). A atividade xilanolítica extracelular foi avaliada pela medição da zona clara formada ao redor da colônia utilizando um paquímetro.

#### **4.2.3.6 Proteases**

A habilidade de degradar caseína foi usada como critério para determinação da produção de enzimas proteolíticas (DUARTE et al., 2013). Os ensaios foram realizados em meio sólido contendo 2,5% de SkimMilk base (fonte de caseína), 0,1% de glicose, 0,5% de peptona, 0,3% de extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte e 1,5% de agar. Para o preparo deste meio, a base SkimMilk foi autoclavada separadamente dos demais componentes do meio e, após autoclavados, as

soluções foram misturadas a 60°C, antes da distribuição nas placas. A placa com meio de cultura foi dividida em seis partes, onde foram aplicados 10 µL da suspensão de células de levedura, e os cultivos foram incubados por 120 horas a 28°C. A hidrólise da caseína foi evidenciada pela formação de um halo translúcido ao redor da colônia (DUARTE et al., 2013). A atividade proteolítica extracelular foi avaliada pela medição da zona clara formada ao redor da colônia utilizando um paquímetro.

#### **4.2.3.7 Lipases**

A habilidade de degradar azeite de oliva foi usada como critério para determinação da produção de enzimas lipolíticas (COLEN, 2006). Os ensaios foram realizados em meio sólido contendo 1% de azeite de oliva; 0,5% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,2% de ureia; 0,1% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1% de NaCl; 0,2% de sais biliares; 0,05% de extrato de levedura; e 1,5% de agar. Para o preparo deste meio todos os reagentes foram misturados e aquecidos até solubilização do agar e, posteriormente, a mistura foi homogeneizada com o auxílio de um liquidificador. A emulsão produzida pela mistura do azeite de oliva ao meio persiste mesmo após autoclagem. Dessa forma, foi possível obter um meio homogêneo para o ensaio qualitativo. A placa com meio de cultura foi dividida em seis partes, onde foram aplicados 10 µL da suspensão de células de levedura, e os cultivos foram incubados por 120 horas a 28°C. A hidrólise do óleo de oliva foi evidenciada pela formação de um halo translúcido ao redor da colônia (COLEN, 2006). A atividade lipolítica extracelular foi avaliada pela medição da zona clara formada ao redor da colônia utilizando um paquímetro.

#### **4.2.4 Avaliação do potencial de produção de fatores promotores de crescimento**

##### **4.2.4.1 Ácido 3-indol- acético (AIA)**

A avaliação do potencial de produção de ácido indol acético foi realizada por meio de método quantitativo em meio líquido por ensaio fotométrico (GORDON & WEBER, 1951, NASSAR et al., 2005). Uma alíquota de 100 µL de suspensão de

leveduras (item 4.3.2.1) foi inoculada em 5 mL de caldo Sb suplementado com 5mM de L-triptofano e as culturas foram incubadas sob agitação no escuro a 28°C por 120 horas. Após este período, uma alíquota do meio foi utilizada para medição da densidade ótica a 600nm (OD 600nm) e outra alíquota foi centrifugada, sendo recolhido o sobrenadante para utilização na quantificação da produção de AIA (NASSAR et al., 2005).

Os ensaios de quantificação foram realizados em placas de 96 micropoços, onde ocorreram as reações enzimáticas. A mistura de reação, constituída de 120 µL de sobrenadante da cultura de leveduras e 80 µL da solução reagente de Salkoviski (2% de solução FeCl<sub>3</sub> 0,5 M e 98% de solução de ácido perclórico a 35%) (GORDON & WEBER, 1951) foi mantida a temperatura e luminosidade ambientes, por 30 minutos. Posteriormente, a absorbância foi determinada a 530nm no leitor de microplacas Varioskan Flash (Thermo Scientific). Como controle foi utilizado meio líquido esterilizado no lugar do sobrenadante. Todas as amostras foram cultivadas em triplicata e os ensaios enzimáticos conduzidos em duplicata. Uma curva-padrão de AIA foi construída com as leituras da absorvância das soluções de AIA comercial em concentrações de 0 a 100 µg de AIA.mL<sup>-1</sup> (GORDON & WEBER, 1951), resultando na equação  $y = 0,0026X$  ( $R^2 = 0,996$ ), usada para obtenção das concentrações de AIA nos sobrenadantes das culturas. As concentrações obtidas foram divididas pelos valores de OD 600nm apresentados pelas culturas, de modo a facilitar a comparação entre os isolados. O potencial de produção de AIA foi expresso em termos de µg de AIA.mL<sup>-1</sup>.OD<sub>600</sub><sup>-1</sup>.

#### **4.2.4.2 Habilidade de solubilização de fosfato insolúvel**

A habilidade das leveduras isoladas em solubilizar fosfato inorgânico insolúvel foi avaliada em meio sólido (OLIVEIRA et al., 2009), por meio da solubilização de fosfatos de cálcio precipitados no meio. Foi utilizado o meio sólido Pikovskaya modificado (OLIVEIRA et al., 2009) composto de 0,3% de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1% de glicose, 0,05% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,02% de NaCl; 0,02% de KCl; 0,01% de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,29% de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,19% de MgCl<sub>2</sub>; traços de MnSO<sub>4</sub> e FeSO<sub>4</sub> (concentração final igual a 0,1mg/L); e 2% de agar. O pH deste meio foi acertado para 7,0 com hidróxido de sódio. A placa com meio de cultura foi dividida em seis partes, onde foram aplicados

10 µL da suspensão de células de levedura (item 4.3.2.1), e os cultivos foram incubados por 120 horas a 28°C. A solubilização dos fosfatos inorgânicos precipitados no meio foi evidenciada pela formação de um halo translúcido ao redor da colônia (OLIVEIRA et al., 2009). O potencial de solubilização foi avaliado pela medição do halo utilizando um paquímetro e os resultados foram expressos em Índices de Solubilização (IS), que correspondem à razão entre o diâmetro do halo incluindo o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

#### **4.2.4.3 Fitases**

A habilidade das leveduras isoladas em produzir fitases foi avaliada em meio sólido (OLIVEIRA et al., 2009), por meio da hidrólise de fitato precipitado no meio na forma de fitato de cálcio. Foi utilizado o meio sólido Pikovskaya modificado (OLIVEIRA et al., 2009) composto de 1% de fitato de sódio - Na-IHP (Sigma-Aldrich); 1% de glicose, 0,05% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,02% de NaCl; 0,02% de KCl; 0,01% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,29% de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,19% de  $\text{MgCl}_2$ ; traços de  $\text{MnSO}_4$  e  $\text{FeSO}_4$  (concentração final igual a 0,1mg/L); e 2% de agar. O pH deste meio foi acertado para 7,0 com hidróxido de sódio. A placa com meio de cultura foi dividida em seis partes, onde foram aplicados 10 µL da suspensão de células de levedura (item 4.3.2.1), e os cultivos foram incubados por 120 horas a 28°C. A produção de fitases extracelulares foi evidenciada pela formação de um halo translúcido ao redor da colônia (OLIVEIRA et al., 2009). O potencial de solubilização foi avaliado pela medição do halo utilizando um paquímetro e os resultados foram expressos em Índices Enzimáticos (IE), que correspondem à razão entre o diâmetro do halo incluindo o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

### **4.3 Caracterização das atividades enzimáticas e da produção de fatores de crescimento em função do tempo de deposição dos frutos no solo**

As diferenças entre as frequências observadas e esperadas das atividades enzimáticas e da habilidade na produção de fatores de crescimento apresentadas

pelos isolados entre os 6 tempos de deposição do fruto no solo foram resumidas e testadas usando testes de aderência e tabelas de contingência. Estas diferenças foram analisadas utilizando Mosaic Plot (FRIENDLY, 1994; GOTELLI & ELLISON, 2010). Estas tabelas foram analisadas utilizando modelos log-lineares para ajustar as contagens esperadas em relação ao somatório marginal da tabela de contingência. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R 3.0.3 (R development core team, 2014).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação dos isolados de leveduras por métodos moleculares

O método da PCR *fingerprinting* utilizando o iniciador (GTG)<sub>5</sub> (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') (SILVA-FILHO et al., 2005) possibilitou agrupar os 290 isolados de leveduras previamente selecionados em 27 grupos com padrões de bandeamento distintos, nos quais se enquadraram 181 isolados, restando 109 isolados com padrões individuais de bandeamento (Apêndice C). Este método mostrou-se eficaz no agrupamento das leveduras, reduzindo o número de isolados a serem identificados por sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S do rRNA. Para avaliar a confiabilidade do método, cinco isolados do grupo 1 (grupo com maior número de isolados) foram escolhidos aleatoriamente e submetidos ao sequenciamento, sendo que todos apresentaram o mesmo resultado (Tabela 1). Contudo, isolados de grupos diferentes foram posicionados em uma mesma categoria taxonômica, inclusive, com isolados inicialmente classificados como de padrão de bandeamento individual. A este fato podem ser atribuídas variações genéticas intra-específicas ou problemas relacionados à técnica, como artefatos técnicos ou mesmo inadequação do uso deste iniciador para algumas espécies/gêneros (SILVA-FILHO et al., 2005).

Todos os isolados com padrão individual de bandeamento e representantes selecionados ao acaso de cada um dos grupos de padrões de bandeamento foram submetidos à identificação molecular por meio do sequenciamento da região D1/D2 do gene codificante da subunidade 26S do RNA ribossômico, utilizando os iniciadores NL-1 e NL-4 (KURTZMAN & ROBBNET, 1998) (Tabela 1).

Tabela 1: Identificação das leveduras representantes de cada grupo de bandeamento obtido com a técnica PCR *Fingerprinting*, utilizando duas regiões do gene codificante do rRNA, região D1/D2 do gene da subunidade 26S e região ITS1-5,8S-ITS2.

Isolados e grupo de bandeamento <sup>d</sup>	Espécies de referência e números de acesso no <i>Genbank</i>	Similaridade (bases analisadas)	e-value	Identificação proposta
13IV	<i>Bandoniozyma complexa</i> KC113632 <sup>a</sup> HQ623538.1 <sup>b</sup>	99% (506/507) 100% (463/463) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Bandoniozyma complexa</i>
64Ia	<i>Bandoniozyma complexa</i> KC113632 <sup>a</sup> HQ623538.1 <sup>b</sup>	99% (513/514) 100%(403/403) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Bandoniozyma complexa</i>
129III	<i>Bandoniozyma complexa</i> KC113632 <sup>a</sup> HQ623538.1 <sup>b</sup>	99% (542/543) 100%(462/463) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Bandoniozyma complexa</i>
7IV	<i>Bulleromyces nemorosus</i> AF472625.1 <sup>a</sup>	99% (475/478)	0,0	<i>Bulleromyces nemorosus</i>
7II	<i>Candida asiatica</i> AB543319.1 <sup>a</sup> JX188101.1 <sup>b</sup>	99% (480/481) 100% (416/416) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Candida asiatica</i>
89III	<i>Candida (Kurtzmaniella) natalensis</i> U45818 <sup>a</sup> KF728775.1 <sup>b</sup>	99% (462/463) 99% (553/557) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Candida (Kurtzmaniella) natalensis</i>
106IV	<i>Candida (Kurtzmaniella) natalensis</i> U45818 <sup>a</sup> KF728775.1 <sup>b</sup>	99% (510/511) 99% (456/459) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Candida (Kurtzmaniella) natalensis</i>
25Ia	<i>Candida (Meyerozyma) carpophila</i> U62311 <sup>a</sup>	100% (436/436)	0,0	<i>Candida (Meyerozyma) carpophila</i>
29IIIa (G13)	<i>Candida (Ogataea) boidinii</i> U70242 <sup>a</sup>	100% (494/494)	0,0	<i>Candida (Ogataea) boidinii</i>
31IV	<i>Candida (Ogataea) boidinii</i> U70242 <sup>a</sup>	100% (481/481)	0,0	<i>Candida (Ogataea) boidinii</i>



Isolados e grupo de bandeamento <sup>d</sup>	Espécies de referência e números de acesso no <i>Genbank</i>	Similaridade (bases analisadas)	e-value	Identificação proposta
<b>EN142IIa (G4)</b>	<i>Candida (Ogataea) boidinii</i> U70242 <sup>a</sup>	100% (497/497)	0,0	<i>Candida (Ogataea) boidinii</i>
<b>151IIIb</b>	<i>Candida (Ogataea) boidinii</i> U70242 <sup>a</sup>	99% (473/474)	0,0	<i>Candida (Ogataea) boidinii</i>
<b>86Ia</b>	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i> U45823 <sup>a</sup>	99% (479/480)	0,0	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>
<b>87I</b>	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i> U45823 <sup>a</sup>	99% (520/521)	0,0	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>
<b>112II</b>	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i> U45823 <sup>a</sup>	100% (495/495)	0,0	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>
<b>114IIIa (G22)</b>	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i> U45823 <sup>a</sup>	99% (501/502)	0,0	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>
<b>115IIIa</b>	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i> U45823 <sup>a</sup>	99% (479/482)	0,0	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>
<b>115IIIa</b>	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i> U45823 <sup>a</sup>	99% (479/482)	0,0	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>
<b>115Va</b>	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i> U45823 <sup>a</sup>	99% (477/483)	0,0	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>
<b>141IVa (G20)</b>	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i> U45823 <sup>a</sup>	99% (492/493)	0,0	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>
<b>143IIb</b>	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i> U45823 <sup>a</sup> <i>Candida</i> sp. Z8Y15 JF781425.1 <sup>b</sup>	96% (479/498) <sup>a</sup> 100% (413/413) <sup>b</sup>	0.0 <sup>a,b</sup>	<i>Candida</i> sp.03
<b>150III</b>	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i> U45823 <sup>a</sup>	99% (474/477)	0,0	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>
<b>164IIa</b>	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i> U45823 <sup>a</sup>	99% (456/458)	0,0	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>

Isolados e grupo de bandeamento <sup>d</sup>	Espécies de referência e números de acesso no Genbank	Similaridade (bases analisadas)	e-value	Identificação proposta
84III	<i>Candida (Pichia) californica</i> DQ104729 <sup>a</sup>	100% (491/491)	0,0	<i>Candida (Pichia) californica</i>
149IIb	<i>Candida (Pichia) californica</i> DQ104729 <sup>a</sup>	100% (466/466)	0,0	<i>Candida (Pichia) californica</i>
116IVa (G10)	<i>Candida (Saccharomycopsis) amapae</i> U69880 <sup>a</sup>	99% (499/500) <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	<i>Candida (Saccharomycopsis) amapae</i>
6V (G6)	<i>Candida sorboxylosa</i> AB617984.1 <sup>a</sup>	99% (336/337)	2e-173	<i>Candida sorboxylosa</i>
25II	<i>Candida sorboxylosa</i> AB617984.1 <sup>a</sup>	99% (336/337)	2e-173	<i>Candida sorboxylosa</i>
57IIIa	<i>Candida sorboxylosa</i> AB617984.1 <sup>a</sup>	99% (336/337)	2e-173	<i>Candida sorboxylosa</i>
60IIa	<i>Candida sorboxylosa</i> AB617984.1 <sup>a</sup>	100% (338/338)	1e-175	<i>Candida sorboxylosa</i>
85IIa (G25)	<i>Candida sorboxylosa</i> AB617984.1 <sup>a</sup>	100% (338/338)	1e-175	<i>Candida sorboxylosa</i>
113IIa	<i>Candida sorboxylosa</i> AB617984.1 <sup>a</sup>	99% (337/338)	5e-174	<i>Candida sorboxylosa</i>
115IIb	<i>Candida sorboxylosa</i> AB617984.1 <sup>a</sup>	99% (337/338)	5e-174	<i>Candida sorboxylosa</i>
149IIIa (G23)	<i>Candida sorboxylosa</i> AB617984.1 <sup>a</sup>	100% (338/338)	1e-175	<i>Candida sorboxylosa</i>
23I	<i>Candida</i> sp. BCC 7717 AY228491.1 <sup>a</sup> <i>Candida</i> sp. UFMG DC 166 KF695404.1 <sup>b</sup>	90% (310/345) <sup>a</sup> 85% (321/378) <sup>b</sup>	3e-117 <sup>a</sup> 2e-98 <sup>b</sup>	<i>Candida</i> sp. 01
EN44	<i>Candida</i> sp. BCC 7717 AY228491.1 <sup>a</sup> <i>Candida</i> sp. UFMG DC 166 KF695404.1 <sup>b</sup>	90%(310/345) <sup>a</sup> 85% (321/378) <sup>b</sup>	3e-117 <sup>a</sup> 2e-98 <sup>b</sup>	<i>Candida</i> sp. 01

Isolados e grupo de bandeamento <sup>d</sup>	Espécies de referência e números de acesso no <i>Genbank</i>	Similaridade (bases analisadas)	e-value	Identificação proposta	
ENC46	<i>Candida</i> sp. BCC 7717	AY228491.1 <sup>a</sup>	90% (310/345)	3e-117	<i>Candida</i> sp. 01
89Ia (G3)	<i>Candida</i> sp. BCC 7717 e <i>Candida asparagi</i>	AY450921.1 <sup>a</sup> AY228491.1 <sup>b</sup>	90% (312/347) <sup>a</sup> 94% (260/277) <sup>b</sup>	2e-118 <sup>a</sup> 2e-111 <sup>b</sup>	<i>Candida</i> sp. 02
EN105I	<i>Candida stellimalicola</i> (clado irmão <i>Starmera</i> )	U84234 <sup>a</sup>	100% (516/516)	0,0	<i>Candida stellimalicola</i> (clado irmão <i>Starmera</i> )
11Ia (G2)	<i>Candida (Yadamazyma)</i> <i>conglobata</i>	U45789 <sup>a</sup> AJ539370.1 <sup>b</sup>	100% (454/454) <sup>a</sup> 99% (477/478) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Candida (Yadamazyma)</i> <i>conglobata</i>
EN53Ia	<i>Candida (Yadamazyma)</i> <i>conglobata</i>	U45789 <sup>a</sup> AJ539370.1 <sup>b</sup>	100% (470/470) <sup>a</sup> 99% (478/479) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Candida (Yadamazyma)</i> <i>conglobata</i>
57IIa	<i>Candida (Yadamazyma)</i> <i>conglobata</i>	U45789 <sup>a</sup> AJ539370.1 <sup>b</sup>	100% (456/456) <sup>a</sup> 99% (478/479) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Candida (Yadamazyma)</i> <i>conglobata</i>
113I	<i>Candida (Yamadazyma)</i> <i>tallmaniae</i>	HQ283385 <sup>a</sup>	99% (470/476)	0,0	<i>Candida (Yamadazyma)</i> <i>tallmaniae</i>
127IIa	<i>Candida (Yadamazyma)</i> <i>conglobata</i>	U45789 <sup>a</sup> AJ539370.1 <sup>b</sup>	100% (464/464) <sup>a</sup> 99%(421/422) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Candida (Yadamazyma)</i> <i>conglobata</i>
141Ib	<i>Candida (Yamadazyma)</i> <i>tallmaniae</i>	HQ283385 <sup>a</sup>	99% (469/475)	0,0	<i>Candida (Yamadazyma)</i> <i>tallmaniae</i>
51IIb	<i>Cryptococcus</i> sp. 11-1122	JX515990 <sup>a</sup> JX515991.1 <sup>b</sup>	98% (473/482) <sup>a</sup> 92% (450/488) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Cryptococcus</i> sp. 01
51IV	<i>Cryptococcus</i> sp. 11-1122	JX515990 <sup>a</sup>	98% (454/463)	0,0	<i>Cryptococcus</i> sp. 01

Isolados e grupo de bandejamento <sup>d</sup>	Espécies de referência e números de acesso no <i>Genbank</i>	Similaridade (bases analisadas)	e-value	Identificação proposta	
61II	<i>Cryptococcus</i> sp. 11-1122	JX515990 <sup>a</sup>	98% (429/437)	0,0	<i>Cryptococcus</i> sp. 01
74II	<i>Cryptococcus</i> sp. 11-1122	JX515990 <sup>a</sup>	98% (557/567)	0,0	<i>Cryptococcus</i> sp. 01
130II	<i>Cryptococcus</i> sp. UFMG-BRO162	JX280386.1 <sup>a</sup> JX268523.1	100% (531/531) 99% (409/412) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Cryptococcus</i> sp. 02
21I	<i>Eballistra oryzae</i>	AF229353 <sup>a</sup>	99% (493/499)	0,0	<i>Eballistra oryzae</i>
4	<i>Fellomyces polyborus</i> CBS 6072 e CBS 6643=HB97	AF189859 <sup>a</sup> AJ608672.1 <sup>b</sup>	99% (485/494) <sup>a</sup> 100% (519/519) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Fellomyces polyborus</i>
13IIb (G9)	<i>Fellomyces polyborus</i> CBS 6072 e CBS 6643=HB97	AF189859 <sup>a</sup> AJ608672.1 <sup>b</sup>	99% (507/514) <sup>a</sup> 100% (425/425) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Fellomyces polyborus</i>
98II	<i>Fellomyces polyborus</i> CBS 6072 e CBS 6643=HB97	AF189859 <sup>a</sup> AJ608672.1 <sup>b</sup>	99% (485/492) <sup>a</sup> 100% (526/526) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Fellomyces polyborus</i>
105II	<i>Fellomyces polyborus</i> CBS 6072	AF189859 <sup>a</sup>	99% (426/432) <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	<i>Fellomyces polyborus</i>
38II	<i>Hannaella luteola</i>	AF075482 <sup>a</sup>	100% (468/468)	0,0	<i>Hannaella luteola</i>
80II	<i>Hannaella luteola</i>	AF075482 <sup>a</sup>	99% (510/512)	0,0	<i>Hannaella luteola</i>
7V (G15)	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	AJ512453.1 <sup>a</sup> AJ512435.1 <sup>b</sup>	100% (490/490) <sup>a</sup> 99% (637/642) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
EN72II (G7)	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	AJ512453.1 <sup>a</sup>	100% (516/516)	0,0 <sup>a</sup>	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>

Isolados e grupo de bandeamento <sup>d</sup>	Espécies de referência e números de acesso no <i>Genbank</i>	Similaridade (bases analisadas)	e-value	Identificação proposta
76IIIa (G17)	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> AJ512453.1 <sup>a</sup> AJ512435.1 <sup>b</sup>	99% (508/511) <sup>a</sup> 99% (637/642) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
102II (G18)	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> AJ512453.1 <sup>a</sup> AJ512435.1 <sup>b</sup>	99% (493/496) <sup>a</sup> 99% (522/527) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
118III (G21)	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> AJ512453.1 <sup>a</sup> AJ512435.1 <sup>b</sup>	100% (572/572) <sup>a</sup> 99% (523/527) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
12Ia (G8)	<i>Hanseniaspora uvarum</i> U84229 <sup>a</sup>	100% (510/510)	0,0	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
108IIb	<i>Hanseniaspora uvarum</i> U84229 <sup>a</sup>	100% (519/519)	0,0	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
135IIa (G16)	<i>Hanseniaspora uvarum</i> U84229 <sup>a</sup>	100% (509/509)	0,0	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
142IVa	<i>Hanseniaspora uvarum</i> U84229 <sup>a</sup>	100% (572/572)	0,0	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
150II	<i>Hanseniaspora uvarum</i> U84229 <sup>a</sup>	99% (478/479)	0,0	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
2IIIb (G11)	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> U45709.1 <sup>a</sup>	99% (482/484)	0,0	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
8III (G5)	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> U45709.1 <sup>a</sup>	99% (480/482)	0,0	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
8V, 18I, 35IIa, 59IVa, EN75Ib (G1)	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> U45709.1 <sup>a</sup>	99% (454/456)	0,0	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>

<b>Isolados e grupo de bandeamento<sup>d</sup></b>	<b>Espécies de referência e números de acesso no Genbank</b>	<b>Similaridade (bases analisadas)</b>	<b>e-value</b>	<b>Identificação proposta</b>
<b>11V</b>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> U45709.1 <sup>a</sup>	99% (506/508)	0,0	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<b>16IIrec</b>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> U45709.1 <sup>a</sup>	99% (501/503)	0,0	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<b>18II</b>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> U45709.1 <sup>a</sup>	99% (495/497)	0,0	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<b>19Ia</b>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> U45709.1 <sup>a</sup>	99% (474/476)	0,0	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<b>65Ia</b>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> U45709 <sup>a</sup>	99% (454/456)	0,0	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<b>EN69II</b>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> U45709.1 <sup>a</sup>	99% (512/516)	0,0	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<b>75Ib</b>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> U45709 <sup>a</sup>	99% (435/437)	0,0	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<b>107I</b>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> U45709 <sup>a</sup>	99% (519/521)	0,0	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<b>EN158I</b>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> U45709.1 <sup>a</sup>	99% (502/504)	0,0	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<b>160I</b>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> U45709.1 <sup>a</sup>	99% (511/513)	0,0	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<b>EN165 (G27)</b>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> U45709.1 <sup>a</sup>	99% (568/570)	0,0	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<b>ENC168 (G26)</b>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> U45709.1 <sup>a</sup>	99% (456/458)	0,0	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<b>11III</b>	<i>Metschnikowia</i> sp. ZB145 JN581109 <sup>a</sup>	99% (461/467)	0,0	<i>Metschnikowia</i> sp.

Isolados e grupo de bandeamento <sup>d</sup>	Espécies de referência e números de acesso no <i>Genbank</i>	Similaridade (bases analisadas)	e-value	Identificação proposta	
129IIa	<i>Occultifur externus</i>	AF189909 <sup>a</sup>	100% (527/527)	0,0	<i>Occultifur externus</i>
145III	<i>Occultifur externus</i>	AF189909 <sup>a</sup>	99% (456/462)	0,0	<i>Occultifur externus</i>
EN105IIa (G19)	<i>Ogataea thermomethanolica</i> <i>O. nakhonphanomensis</i>	AB200285 <sup>a</sup> / FJ914927.1 <sup>b</sup> AB307722 <sup>a</sup> / FJ914925.1 <sup>b</sup>	99% (489/492) <sup>a</sup> 99% (501/509) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Ogataea</i> sp.
118II	<i>Ogataea thermomethanolica</i> <i>O.</i> <i>nakhonphanomensis</i>	AB200285 <sup>a</sup> / FJ914927.1 <sup>b</sup> AB307722 <sup>a</sup> / FJ914925.1 <sup>b</sup>	99% (562/566) <sup>a</sup> 99% (531/540) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Ogataea</i> sp.
57IVa	<i>Pichia kluyveri</i>	EF550251 <sup>a</sup>	99% (492/493)	0,0	<i>Pichia kluyveri</i>
EN142IIIb	<i>Pichia kluyveri</i>	EF550251 <sup>a</sup>	99% (500/501)	0,0	<i>Pichia kluyveri</i>
40IIa (G14)	<i>Pichia kudriavzevii</i>	EF550222 <sup>a</sup>	100% (574/574)	0,0	<i>Pichia kudriavzevii</i>
146II	<i>Pichia kudriavzevii</i>	EF550222 <sup>a</sup>	100% (577/577)	0,0	<i>Pichia kudriavzevii</i>
6IV	<i>Pichia membranifaciens</i>	EF550227 <sup>a</sup>	99% (468/471)	0,0	<i>Pichia membranifaciens</i>
EN81III (G24)	<i>Pichia membranifaciens</i>	EF550227 <sup>a</sup>	100% (488/488)	0,0	<i>Pichia membranifaciens</i>
82III	<i>Pichia membranifaciens</i>	EF550227 <sup>a</sup>	99% (501/507)	0,0	<i>Pichia membranifaciens</i>

Isolados e grupo de bandeamento <sup>d</sup>	Espécies de referência e números de acesso no Genbank	Similaridade (bases analisadas)	e-value	Identificação proposta	
83IIb	<i>Pichia membranifaciens</i> EF550227 <sup>a</sup>	99% (502/508)	0,0	<i>Pichia membranifaciens</i>	
84IIb	<i>Pichia membranifaciens</i> EF550227 <sup>a</sup>	99% (456/459)	0,0	<i>Pichia membranifaciens</i>	
87IIIa	<i>Pichia membranifaciens</i> EF550227 <sup>a</sup>	99% (460/463)	0,0	<i>Pichia membranifaciens</i>	
152IIb	<i>Pichia membranifaciens</i> EF550227 <sup>a</sup>	100% (575/575)	0,0	<i>Pichia membranifaciens</i>	
35IIIb	<i>Pseudozyma shanxiensis</i> , <i>Ustilago calamagrostidis</i> , <i>U. striiformis</i> <i>U. sporoboli-indici</i>	DQ008955 <sup>a</sup> , AY740119 <sup>a</sup> , AY740172 <sup>a</sup> AY772739.1 <sup>b</sup>	99% (524/526) <sup>a</sup> 97% (572/592) <sup>b</sup>	0,0 <sup>a,b</sup>	<i>Ustilago</i> sp.
31V	<i>Rhodotorula dairenensis</i> AF070432 <sup>a</sup>	99% (481/482)	0.0	<i>Rhodotorula dairenensis</i> <sup>c</sup>	
69II	<i>Rhodotorula dairenensis</i> AF070432 <sup>a</sup>	100% (457/457)	0.0	<i>Rhodotorula dairenensis</i> <sup>c</sup>	
71IIa	<i>Rhodotorula dairenensis</i> AF070432 <sup>a</sup>	99% (502/503)	0.0	<i>Rhodotorula dairenensis</i> <sup>c</sup>	
157IVa (G28)	<i>Rhodotorula dairenensis</i> AF070432 <sup>a</sup>	99% (467/468)	0.0	<i>Rhodotorula dairenensis</i> <sup>c</sup>	
44IIIa	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> AF070432 <sup>a</sup>	100% (509/509)	0,0	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <sup>c</sup>	
6III	<i>Rhodotorula oryzae</i> AY335161.1 <sup>a</sup>	99% (570/571)	0,0	<i>Rhodotorula oryzae</i>	



Isolados e grupo de bandeamento <sup>d</sup>	Espécies de referência e números de acesso no <i>Genbank</i>	Similaridade (bases analisadas)	e-value	Identificação proposta	
145II	<i>Rhodotorula</i> sp. M65	JQ9564 2.1 <sup>a</sup>	97% (572/592) <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	<i>Rhodotorula</i> sp.
	<i>Rhodotorula ingenuosa</i> M65	JQ936165.1 <sup>b</sup>	92% (347/377) <sup>b</sup>	4E-145 <sup>b</sup>	
119II	<i>Sarocladium strictum</i>	HQ232141 <sup>a</sup>	99% (575/576)	0,0	<i>Sarocladium strictum</i>
8IV	<i>Saturnispora</i> sp. UFMG-CA1.2	KC832478.1 <sup>a</sup>	99% (540/545)	0,0	<i>Saturnispora</i> sp.
25III	<i>Saturnispora</i> sp. UFMG-CA1.2	KC832478.1 <sup>a</sup>	99% (448/452)	0,0	<i>Saturnispora</i> sp.
32III	<i>Saturnispora</i> sp. UFMG-CA1.2	KC832478.1 <sup>a</sup>	99% (467/471)	0,0	<i>Saturnispora</i> sp.
EN114II	<i>Saturnispora</i> sp. UFMG-CA1.2	KC832478 <sup>a</sup>	99% (448/452)	0,0	<i>Saturnispora</i> sp.
100IIIa	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	EF550341 <sup>a</sup>	99% (582/583)	0,0	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
142Vb	<i>Zygoascus hellenicus</i>	AY447007 <sup>a</sup>	100% (502/502)	0,0	<i>Zygoascus hellenicus</i>

<sup>a</sup> Acessos de sequências de fragmentos da região D1/D2 do gene 26S do rRNA. Identificação realizada por meio do BLASTn.

<sup>b</sup> Acessos de sequências de fragmentos da região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA. Identificação realizada por meio do BLASTn.

<sup>c</sup> Identificação confirmada por meio das provas bioquímicas: assimilação de nitrato e nitrito como fonte exclusiva de nitrogênio.

<sup>d</sup> Isolados e seus referidos grupos de bandeamento listados no Apêndice C.

O método de identificação utilizando o sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S do rRNA possibilitou a identificação de 75 dos 117 isolados submetidos a esta técnica. Uma fração de 14% dos isolados foram identificados apenas no nível de gênero por apresentarem valores de similaridade entre 98 e 90% com outras sequências depositadas no GenBank. Outros isolados apresentaram sequências com identidade superior a 99% com sequências de mais de uma espécie. Foi o caso dos isolados pertencentes aos gêneros *Ogataea*, *Hanseniaspora*, *Fellomyces*, *Candida*, *Ustilago* e *Rhodotorula*. Análises filogenéticas utilizando a região D1/D2 têm mostrado que algumas espécies pertencentes a estes gêneros estão intimamente relacionadas (KURTZMAN et al., 2011). Neste caso, foi necessária a utilização de outros marcadores filogenéticos, como regiões internas não codificadoras (ITS1 e ITS2) (SCORZETTI et al., 2002). Em alguns casos, esta resolução foi obtida por meio de testes bioquímicos, como, por exemplo, o teste de assimilação de nitrato e nitrito, usado para separar as espécies *Rhodotorula dairenensis* e *R. mucilaginosa* (KURTZMAN et al., 2011).

Foram observadas algumas divergências entre os resultados obtidos com o alinhamento das sequências das regiões D1/D2 do gene 26S do rRNA e ITS1-5.8S rDNA-ITS2 dos isolados 4, 13IIb, 98II e 105II, identificados como pertencentes ao gênero *Fellomyces*. As sequências obtidas para a região D1/D2 apresentaram 99% de identidade com duas espécies distintas, diferindo em 3 e 5-6 bases dos acessos *Fellomyces penicillatus* NI e CBS 5492 (EU495001.1 e AF177405.1, respectivamente) e em 5-6 bases do acesso *Fellomyces boorneensis* CBS8282 (AF189877.1). A sequência de uma terceira espécie filogeneticamente relacionada, *Fellomyces polyborus* CBS 6072, foi alinhada com as sequências dos isolados supracitados, apresentando 98% de identidade e diferindo em 6-7 bases do acesso de referência (AF189859.1).

Já as sequências ITS obtidas apresentaram identidade de 99% com os acessos *Fellomyces boorneensis* CBS 8322 = HB43, CBS 8320 = HB42, CBS 8321 = HB24 e CBS 8282, apresentando 6 bases de diferença (AJ608645.1, AJ608644.1, AJ608643.1 e AF444459.1, respectivamente) e de 100% e 98% com os acessos *Fellomyces polyborus* CBS 6643 = HB97 e CBS 6072 (AJ608672.1 e NR073238.1, respectivamente, apresentando o último 10 bases de diferença). As diferenças observadas no alinhamento das sequências ITS dos isolados com os acessos

*Fellomyces polyborus* CBS 6643 = HB97 e CBS 6072 devem se ao fato de que essas duas linhagem são geneticamente heterogêneas, o que já foi demonstrado por outros autores (PRILLINGER et al., 1997; LOPANDIC et al. 2005). Ainda, o alinhamento com a sequência de acesso *Fellomyces penicillatus* CBS 5492 (NR\_073217.1) apresentou 98% de identidade, diferindo em 10 bases da sequência de referência. Alguns autores propõem outras técnicas moleculares como polimorfismo de fragmentos amplificados ao acaso (RAPD) e polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), além do uso de regiões IGS1 e ITS1/ITS2, para estudo das relações filogenéticas e genotípicas de isolados do gênero *Fellomyces* (LOPANDIC et al., 2005).

Isolados identificados como *Ustilago* sp. apresentaram sequências da região D1/D2 com alinhamentos de 99% de identidade com várias espécies diferentes da ordem Ustilaginales, família Ustilaginaceae, como *Pseudozyma shanxiensis* (FJ515237.1, DQ008955.1) e *Ustilago calamagrostidis* (AY740119.1), ambas apresentando 2 bases de diferença entre a sequência analisada e a sequência de referência, *Ustilago striiformis* (KF381046.1, DQ875375.1, AY740172.1), apresentando 3 bases de diferença, entre outras espécies com alinhamentos de “score” mais baixos. Análises filogenéticas demonstram que as três espécies citadas são bastante próximas, estando localizadas no grupo *Ustilago* “*stricto sensu*”, clado *Ustilago* “*lato sensu*” (WANG et al., 2006, STOLL et al., 2005). Também é descrito que, apesar das pequenas diferenças entre as sequências das regiões D1/D2 das três espécies, *P. shanxiensis* não constitui espécie anamórfica de *Ustilago* por apresentar 18 substituições e 12 *gaps* na região ITS (WANG et al., 2006). Nos alinhamentos das sequências ITS realizados, não foi observada identidade significativa com as espécies de *Ustilago* supracitadas, mas com a espécie *Ustilago sporoboli-indici* (AY772739.1, AY772738.1, AY772737.1 e AY772736.1), sendo que há diferença de até 20 pares de bases entre as duas sequências e elevado número de *gaps* (13/592). Dessa forma, optou-se pela proposição da identificação dos referidos isolados apenas no nível de gênero. A repetição e realização de novos testes moleculares, bem como a análise das características fenotípicas desses isolados podem apontar se trata de uma nova espécie.

Os isolados identificados como pertencentes ao gênero *Ogataea* apresentaram 100% de alinhamento da sequência da região D1/D2 com sequência

correlata da linhagem *Pichia* sp. FS26 gene (AB200286.1 – 566/566). Estudos com esta linhagem foram realizados para avaliar sua possível inserção no gênero *Ogataea*, contudo, os resultados foram inconclusivos (Limgtong, comunicação pessoal). Além disso, os mesmos isolados também apresentaram sequências ITS e da região D1/D2 com alta identidade a sequências depositadas para as espécies *Ogataea thermomethanolica* e *Ogataea nakhonphanomensis*, diferindo dos acessos de referência em 3-4 bases em 566, no caso da região D1/D2, e 9 bases em 540, no caso da região ITS. As duas espécies citadas são filogeneticamente próximas, diferindo em 7 substituições em 566 nucleotídeos nas sequências da região D1/D2 (LIMGTONG et al., 2008a). Testes bioquímicos deverão ser realizados com o intuito de resolver a identificação desses isolados.

A maioria das sequências obtidas da região D1/D2 apresentou número de bases entre 450 e 550 nucleotídeos, suficiente para realizar uma identificação confiável, tendo em vista seu tamanho de aproximadamente 600 bases. Contudo, para os isolados identificados como *Candida sorboxylosa* foram obtidas sequências com número de bases inferior às demais. As sequências dos isolados obtiveram número de bases entre 300 e 350 (Figura 2), uma tendência também observada nas sequências depositadas no GenBank (acessos U62314, AF485970, AB617984.1, DQ466529.1, KF738159.1, AB773293.1 e EF550253.1). Esse número reduzido de bases está relacionado ao reduzido tamanho da região variável D2 da espécie (KURTZMAN et al, 2011). Em relação à identidade das sequências depositadas, as sequências obtidas diferiram em 3 bases contíguas em relação ao acesso do material tipo, U62314, e aos acessos AB773293, EF550253, e em apenas 0 a 2 bases não contíguas, em relação aos acessos AB617984 (usado neste trabalho como referência), DQ466529 e AF485970. Ainda não há dados na literatura que provem a conspecificidade ou não dessas linhagens (KURTZMAN et al., 2011), assim manteve-se a proposta da identificação como *C. sorboxylosa*.

Os demais 14% dos isolados identificados no nível de gênero distribuem-se entre *Candida*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula* e *Saturnispora*. Enquanto foram obtidas ocorrências únicas de *Metschnikowia* sp. e *Rhodotorula* sp., os demais gêneros apresentaram mais de um isolado não resolvido. No caso dos 4 isolados identificados como *Saturnispora* sp., todos apresentam 100% de

alinhamento entre si, de modo que é provável que se trata de isolados da mesma espécie.

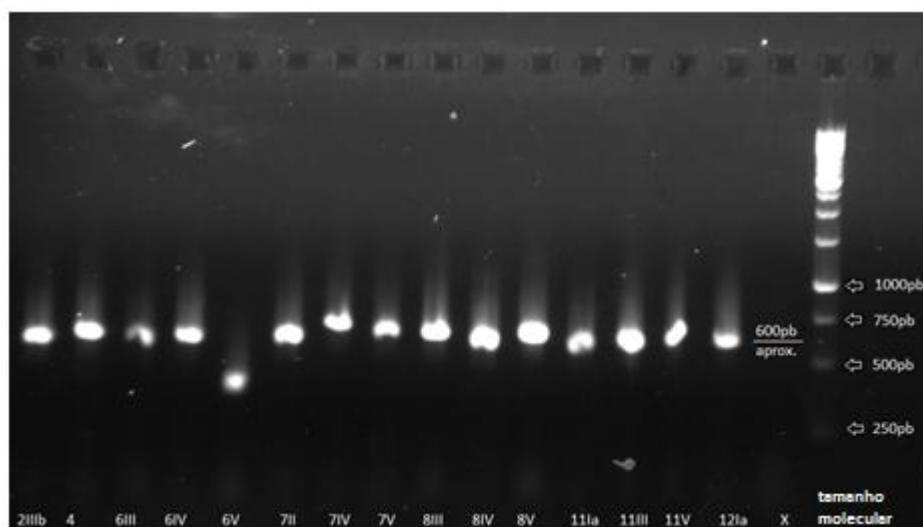


Figura 2: Gel de agarose a 1%, evidenciando as bandas referentes às regiões D1/D2 do gene 26S rRNA obtidas com os iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') amplificada por PCR. No gel é possível verificar a banda de tamanho inferior, cuja caneleta está marcada como 6V, isolado identificado como *Candida sorboxylosa*.

Para os isolados de *Candida* e *Cryptococcus*, ao comparar as sequências dos fragmentos gênicos do rRNA e sequências ITS, foram observados alguns padrões. A sequência da região D1/D2 dos isolados 23Ia, 89Ia, EN44 e ENC46 apresentam 100% de similaridade quando alinhadas, enquanto a sequência ITS do isolado 89Ia difere em mais de 10% das sequências dos demais. Em relação ao isolado 143IIb, não foi observado alinhamento com identidade acima de 90% entre as sequências obtidas com as sequências dos demais isolados 23I, 89Ia, EN44 e ENC46, também identificados como pertencentes à *Candida*. Isso indica que, provavelmente, tratam-se de três espécies diferentes, identificadas neste trabalho como *Candida* sp. 01 (23Ia, EN44 e ENC46), *Candida* sp. 02 (89Ia) e *Candida* sp. 03 (143IIb).

Para os isolados identificados como *Cryptococcus* sp. foram propostas duas identificações, *Cryptococcus* sp. 01, para os isolados 74II, 61II, 51IV, 51IIb, cujas sequências da região D1/D2 apresentam 100% de identidade, e *Cryptococcus* sp. 02, para o isolado 130II, cuja sequência difere da sequência dos demais em mais de 40 nucleotídeos. Também as sequências de ITS dos dois grupos apresentam

grandes diferenças de identidade (aproximadamente 10%). A repetição das análises moleculares destes isolados é necessária para afirmar se tratam ou não de novas espécies.

Foram isolados 2 fungos entre as leveduras obtidas. O isolado 21I, cuja identificação foi proposta neste trabalho como *Eballistra oryzae*, apresentou sequência da região D1/D2 do gene 26S rRNA com 99% de similaridade com a sequência correlata de *Eballistra oryzae* (AF229353.1), apresentando 6 bases de diferença. Esta espécie trata-se de um fungo basidiomiceto da ordem Georgefischeriales, família Eballistraceae, isolado inicialmente de arroz, na condição de patógeno, que possui em seu ciclo de vida uma fase leveduriforme (yeast-like) (BAUER et al., 2001). Já o isolado 119II, identificado como *Sarocladium strictum*, apresentou apenas 1 base substituída na região D1/D2, em relação ao acesso de referência (HQ232141). *Sarocladium strictum* é um fungo anamórfico de estrutura bastante simples, isolado em geral do solo (SUMMERBELL et al., 2011). Tendo em vista suas características macromorfológicas, estes fungos foram isolados conjuntamente com os demais isolados de leveduras. Para confirmação desta identificação, outros testes moleculares serão realizados para estes isolados, como análise das sequências ITS e de outras regiões gênicas relevantes para os grupos.

No total, foram identificadas 39 espécies, sendo 2 fungos, *Sarocladium strictum* e *Eballistra oryzae*, e 37 espécies de leveduras, distribuídas entre *Candida* (clados *Kurtzmaniella*, *Meyerozyma*, *Ogataea*, *Pichia*, *Saccharomycopsis*, *Yadamazyma*, clado irmão de *Starmera* e sem filiação), *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma*, *Ogataea*, *Pichia*, *Saturnispora*, *Wickerhamomyces*, *Zygoascus* (ascomicéticas), *Bandoniozyma*, *Bulleromyces* (*Cryptococcus*), *Cryptococcus*, *Fellomyces*, *Hannaella*, *Occultifur*, *Rhodotorula* e *Ustilago* (basidiomicéticas).

Do nosso conhecimento, nosso grupo é pioneiro na descrição da microbiota associada a frutos de palmeira macaúba. Estudos caracterizando comunidades de levedura associadas a estes frutos coletados de palmeiras nativas localizadas no Parque Nacional Serra do Cipó, MG, foram realizados por Faria (2012). No estudo foram isoladas 13 espécies, das quais apenas 4 foram também identificadas no nosso estudo, entre elas *Pichia kluyveri*, *P. membranifaciens*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Meyerozyma guilliermondii* (FARIA, 2012).

Praticamente todas as espécies de fungos e leveduras observadas como componentes da microbiota associada aos frutos de macaúba já foram isoladas de ambientes naturais como filosfera ou rizosfera de outras plantas, amostras de água, solo ou ar. Algumas espécies são descritas com frequência como associadas a frutos ou insetos polinizadores. Isolados das espécies *Candida (Ogataea) cylindracea*, *Hannaella luteola*, *Pichia membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa* e dos gêneros *Metschnikowia*, *Fellomyces* e *Cryptococcus* foram obtidos de frutas tropicais brasileiras como pitanga, acerola, umbu e mangaba (TRINDADE et al., 2002). *Hanseniaspora uvarum*, *Candida (Saccharomycopsis) amapae*, *C. sorboxylosa*, *Pichia kluyveri*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Pichia membranifaciens* foram isoladas de frutos amapá, cajuáçu e bacuri coletados em reservas florestais no norte do Brasil (MORAIS et al., 1995).

*Hanseniaspora uvarum*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Rhodotorula* sp. e *Candida* sp. já foram isoladas a partir da superfície e de tecidos de vários frutos carnosos como ameixa e frutíferas florestais, enquanto *Rhodotorula mucilaginosa* foi isolada de suas superfícies (ISAEVA et al., 2010). *Meyerozyma guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia membranifaciens*, *Cryptococcus* sp. foram isoladas de polpa de graviola e mamão (fruto e folha) de pomares em Camarões (STRINGINI et al., 2008) e em frutos maduros e polpa de abacaxi na Tailândia e Austrália (CHANPRASARTSUKA et al., 2010). *Hanseniaspora uvarum* foi identificado por métodos independentes de cultura como componente da microbiota de seiva de palmeiras oleaginosas, como dendezeiro e tamareiro (STRINGINI et al., 2009).

Isolados de *Metschnikowia* sp. foram obtidos a partir da carposfera de pomares orgânicos no norte da Itália, apresentando atividade antagonista contra fungo causador de podridões em pêssegos (ZHANG et al., 2010). Leveduras das espécies *Candida (Ogataea) boidinii*, *Cryptococcus* sp., *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia kluyveri*, *P. kudriavzevii*, *P. membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Wickerhamomyces anomalus* foram isoladas de flores e frutos de árvores frutíferas (maçãs, peras e ameixas) na Eslováquia (VADKERTIOVÁ et al., 2012).

*Wickerhamomyces anomalus* e *Candida (Ogataea) boidinii* foram isoladas da polpa de azeitonas de mesa, após processo fermentativo industrial, enquanto

*Candida stellimacolla* (clado irmão *Starmera*) foi isolada da salmoura desses frutos (TOFALO et al., 2013). *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii*, *Candida* (*Meyerozyma*) *carpophila* e *Candida stellimacolla* (clado irmão *Starmera*) foram isoladas de sementes de cacau, durante processo fermentativo, sendo que isolados de *Hanseniaspora* apresentaram dominância nos estágios iniciais da fermentação (MOREIRA et al., 2013; PAPALEXANDRATOU et al., 2013; DANIEL et al., 2009). *Candida stellimacolla* (clado irmão *Starmera*), *Hanseniaspora uvarum* e *H. opuntiae* também foram detectados por métodos independentes de cultivo como componentes da microbiota associada a sementes de cacau (ILLEGHEMS et al., 2012). *Hanseniaspora uvarum*, *Candida carpophila*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Zygoascus hellenicus* foram isoladas da superfície de frutos verdes, maduros e em estágio de fermentação de jujuba indiana (NYANGA et al., 2007) e de café (VILELA et al., 2010).

Outras espécies associadas ao fruto da macaúba têm registros menos comuns na literatura, encontrando-se muitas vezes associadas a uma planta ou grupo de plantas específicas, isoladas a partir de outras partes da filosfera, como folhas, flores e caules. Os isolados já descritos de *Rhodotorula oryzae* foram obtidos de culturas de arroz no Japão (BAI et al., 2004) e de uma planta chamada *Coccoloba uvifera* (uva-da-praia) na ilha de Guadalupe, Antilhas (SENE et al., não publicado - acesso KF472161 – GeneBank). *Rhodotorula dairenensis* já foi isolada de amostras de ar, solo e água, de serapilheira, de flores de *Canna indica*, em Portugal, Cazaquistão, EUA e Japão (GADANHO & SAMPAIO, 2002) e de flores de plantas do Cerrado, no Brasil (COLLA et al., 2010).

*Bandoniozyma complexa*, isolada da superfície do fruto da macaúba, é uma espécie descrita recentemente, cujo nome “complexa” refere-se às variações genotípicas e fenotípicas observadas entre suas linhagens (VALENTE et al., 2012). A maioria dos isolados dessa espécie foi coletada no Brasil, a partir de diversas fontes, entre elas ar do interior de uma madeireira, folhas de bromélia, lago e até de parafusos em processo de corrosão, e um dos isolados foi encontrado associado ao fruto abacaxi, em Taiwan (VALENTE et al., 2012). *Candida asiatica* foi descrita em 2010, a partir de isolados obtidos de amostras de água de estuário, de solo, folhas de samambaias e frutos (figo), na Tailândia, Taiwan e Japão (LIMTONG et al.,



2010). *Candida (Pichia) californica* foi descrita em 2006, a partir de um isolado obtido de uvas (WU et al., 2006), identificado anteriormente como *Cryptococcus californicus*. *Candida (Yamadazyma) tallmaniae* foi descrita em 2011 (GROENEWALD et al., 2011), a partir de leveduras isoladas de flores na Guiana Francesa.

Isolados dos gêneros *Saturnispora* e *Ogataea* foram encontrados nas comunidades epifíticas e endofítica dos frutos de macaúba. Representantes de espécies pertencentes à *Saturnispora* já foram isoladas de amostras de água salobras de estuários (“salt marshes”), de exsudatos e de madeira de árvores, de chucrute, de uvas silvestres e de papo e asas de *Drosophila* (KURTZMAN et al., 2011; MORAIS et al., 2005). Espécies de *Ogataea* já foram isoladas de exsudatos de árvores na Tailândia, *O. nakhonphanomensis* (LIMTONG et al., 2008); em amostras de solo na Tailândia, *O. thermomethanolica* (LIMTONG et al. 2005); e outras espécies possuem representantes isolados de espécies vegetais (filosfera e seiva), madeira em decomposição, insetos, basidiocarpos de outros fungos e água (KURTZMAN et al., 2011).

Isolados micocinogênicos de *Bulleromyces nemorosus*, forma teleomórfica de *Cryptococcus nemorosus*, foram obtidos de plantas herbáceas em uma reserva natural na Rússia (GOLUBEV et al., 2003). Isolados identificados como pertencentes ao gênero *Ustilago* foram obtidos da superfície do fruto de macaúba. Considerando que a maioria das espécies descritas neste gênero é parasita de gramíneas, a detecção de isolados de *Ustilago* associados aos frutos sugere uma origem exógena (STOLL et al., 2005).

Outras espécies ainda não possuem registros de associações com plantas, sendo este trabalho um registro inédito. A espécie *Candida (Yadamazyma) conglobata* possui isolados já descritos a partir de material clínico humano (KURTZMAN et al., 2011) e de amostras de água de florestas de mangue na Tailândia (LIMTONG et al, 2008b). Há registros de *Occultifur externus* isolada de serrapilheira e amostras de água do mar em Portugal (KURTZMAN et al., 2011). *Candida (Kurtzmaniella) natalensis* foi descrita a partir de uma levedura isolada de uma amostra de solo na África do Sul (KURTZMAN et al., 2011). Outros relatos dessa espécie estão associados com isolamentos a partir de amostras de queijo

(IMRAN et al., 2010; LARPIN-LABORDE et al., 2011) e de fezes de cachorro (FOSTER et al., 2013).

As espécies identificadas já foram isoladas de amostras do ambiente natural, sendo que uma parcela considerável já foi descrita como componente da microbiota associada à filosfera de diversas plantas. Foi observada uma significativa diferença entre a riqueza e composição de espécies identificadas neste estudo, em relação ao trabalho de Faria (2012), pioneiro na caracterização de leveduras associadas aos frutos de macaúba, o que pode ser associado às diferentes localizações das palmeiras das quais os frutos foram coletados. Este fato, somado à ocorrência de espécies de caráter cosmopolita, como *Meyerozyma guilliermondii* e *Rhodotorula mucilaginosa*, contrastando com a identificação de gêneros altamente associados a um grupo de espécies vegetais, como por exemplo, *Ustilago*, sugerem que a composição de espécies associadas aos frutos da macaúba pode ser fortemente influenciada pelo ambiente externo. De qualquer forma, este trabalho contribui não apenas para agregar conhecimento a respeito da ecologia da palmeira macaúba como também para agregar conhecimento à ecologia das espécies leveduras de descritas.

## 5.2 Análises de ecologia

As análises de ecologia foram realizadas com base na resolução taxonômica obtida por meio do sequenciamento das regiões D1/D2 e ITS de genes do rRNA das leveduras e fungos leveduriformes isolados; na extrapolação dessa identificação para os demais isolados segundo os critérios de seleção descritos na metodologia; e na numeração das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por fruto, obtidas durante o processamento dos frutos de macaúba e isolamento dos micro-organismos. Infelizmente, alguns isolados não puderam ser identificados, por não ter sido possível reativá-los após congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Seus valores de abundância, contudo, foram considerados nos estudos de ecologia. As análises de ecologia foram realizadas separadamente para as comunidades de epifíticos e endofíticos.

Das 39 espécies identificadas, 26 pertencem ao filo Ascomycota e 13 ao filo Basidiomycota (Tabela 2). Os 345 isolados epifíticos foram distribuídos entre 38 das 39 espécies, 85,8% pertencentes ao Filo Ascomycota e 8,9% ao Filo Basidiomycota,

enquanto os 53 isolados endofíticos foram distribuídos entre 10 espécies, todas pertencentes ao Filo Ascomycota. Apenas 1 espécie foi encontrada exclusivamente entre os isolados endofíticos, *Candida stellimalicola* (clado irmão *Starmera*) (Tabela 2). A predominância de ascomicetos, em relação aos basidiomicetos, como colonizadores de ambos interior e superfície dos frutos e outras partes da filosfera também foi relatada em outros trabalhos (ISAEVA et al., 2010; LIMTONG & KOOWADJANAKUL, 2012; VADKERTIOVÁ et al., 2012), inclusive para fungos filamentosos (VIEIRA, 2012).

Tabela 2: Porcentagens de isolados epifíticos e endofíticos de cada uma das espécies ou gênero identificados.

<b>Espécies</b>	<b>Epifíticos (%)</b>	<b>Endofíticos (%)</b>
<i>Candida (Kurtzmaniella) natalensis</i>	0,58 (2)	0
<i>Candida (Meyerozyma) carpophila</i>	1,16 (4)	0
<i>Candida (Ogataea) boidinii</i>	1,45 (5)	1,89 (1)
<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	4,35 (15)	0
<i>Candida (Pichia) californica</i>	0,58 (2)	0
<i>Candida (Saccharomycopsis) amapae</i>	0,58 (2)	0
<i>Candida (Yadamazyma) conglobata</i>	1,16 (4)	3,77 (2)
<i>Candida (Yamadazyma) tallmaniae</i>	0,87 (3)	0
<i>Candida asiatica</i>	0,29 (1)	0
<i>Candida sorboxylosa</i>	7,83 (27)	0
<i>Candida sp 01</i>	0,29 (1)	3,77 (2)
<i>Candida sp 02</i>	0,29 (1)	0
<i>Candida sp.03</i>	0,29 (1)	0
<i>Candida stellimalicola (clado irmão Starmera)</i>	0	3,77 (2)
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	6,38 (22)	3,77 (2)
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	2,9 (10)	0
<i>Metschnikowia sp</i>	0,29 (1)	0
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	47,25 (163)	66,04 (35)
<i>Ogataea sp.</i>	0,29 (1)	1,89 (1)
<i>Pichia kluyveri</i>	0,29 (1)	1,89 (1)
<i>Pichia kudriavzevii</i>	1,16 (4)	0
<i>Pichia membranifaciens</i>	5,8 (20)	1,89 (1)
<i>Sarocladium strictum</i>	0,29 (1)	0
<i>Saturnispora sp.</i>	0,87 (3)	1,89 (1)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0,29 (1)	0
<i>Zygoascus hellenicus</i>	0,29 (1)	0
<b>Total Ascomicetos</b>	<b>85,8%</b>	<b>90,6%</b>

<b>Espécies</b>	<b>Epifíticos (%)</b>	<b>Endofíticos (%)</b>
<i>Bandoniozyma complexa</i>	0,87 (3)	0
<i>Bulleromyces nemorosus (Cryptococcus)</i>	0,29 (1)	0
<i>Cryptococcus sp 02</i>	0,29 (1)	0
<i>Cryptococcus sp. 01</i>	1,16 (4)	0
<i>Eballistra oryzae</i>	0,29 (1)	0
<i>Fellomyces polyborus</i>	2,03 (7)	0
<i>Hannaella luteola</i>	0,58 (2)	0
<i>Occultifur externus</i>	0,58 (2)	0
<i>Rhodotorula dairenensis</i>	1,74 (4)	0
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	0,29 (1)	0
<i>Rhodotorula oryzae</i>	0,29 (1)	0
<i>Rhodotorula sp.</i>	0,29 (1)	0
<i>Ustilago sp.</i>	0,29 (1)	0
<b>Total Basidiomicetos</b>	<b>8,9%</b>	<b>0%</b>
Isolados não identificados (4)	5,3 (18)	9,4 (5)
<b>Total de isolados</b>	<b>100% (n=345)</b>	<b>100% (n=53)</b>

A taxa de colonização e riqueza total observadas na superfície do fruto (94,6% e S = 38) são bastante superiores às observadas nos tecidos internos (22% e S = 10, para mesocarpo; 1,8% e S=2, para epicarpo) (Tabela 3). Variações de 85 a 100% na taxa de colonização de leveduras epifíticas, contrapondo-se com variações de 20 a 90% na taxa de colonização de endofíticos, foram relatadas em carposferas de diferentes espécies de plantas (ISAEVA et al., 2010).

Tabela 3: Comparação entre as variáveis taxa de colonização, densidade e riqueza total de leveduras cultiváveis epifíticas e endofíticas.

<b>Origem das leveduras</b>	<b>Taxa de colonização</b>	<b>Riqueza de espécies observada</b>	<b>Densidade média Log<sub>10</sub>(UFC/fruto)</b>					
			<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>
Leveduras epifíticas	94,6%	38	6,7	7,1	7,5	7,9	7,9	8,5
Leveduras endofíticas do mesocarpo	22,0%	10	6,0	4,8	6,8	6,8	5,9	7,9
Leveduras endofíticas do epicarpo	1,8%	2	NA					
Total de frutos	168	168	28 (x 6 tempos)					

NA: no isolamento de endofíticos do epicarpo, foi avaliado o número de colônias associadas ao fragmento, não permitindo o cálculo de densidade média (UFC) por fruto.

É possível perceber que a densidade nas comunidades epifíticas aumenta em função do tempo, de forma gradativa, enquanto a densidade oscila entre as comunidades endofíticas associadas a frutos coletados em tempos diferentes. Ainda assim, em todos os casos, os valores de densidade média de leveduras epifíticas por fruto foram superiores aos de leveduras endofíticas, variando de 4 a 200 vezes para maior, a depender do tempo de coleta. Os valores observados para densidade média de endofíticos e epifíticos, de maneira geral, assemelham-se a dados da literatura (LINDOW & BRANDL, 2003; NYANGA et al., 2007; ISAEVA et al., 2010; MOREIRA et al., 2013).

Densidades, riqueza e taxas de colonização inferiores para as leveduras endofíticas podem apresentar diversas explicações. No interior dos tecidos vegetais, os micro-organismos endofíticos estão expostos à ação de vários metabólitos de defesa produzidos pelas plantas, como terpenóides, benzoxazinonas, flavonoides e isoflavonóides (BAIS et al., 2006), os quais podem regular a densidade da microbiota associada (SAIKKONEN et al., 2004; SCHULZ & BOYLE, 2005). Na maioria das vezes, a colonização por endofíticos é localizada: os micro-organismos apresentam padrão de distribuição heterogênea (agregação), onde em algumas porções não se detecta crescimento algum, enquanto em outras, podem ser encontrados em densidades que variam de  $10^5$ -  $10^6$  UFC/g do tecido, o que pode dificultar a obtenção de amostras representativas deste habitat (SCHULZ & BOYLE, 2005; ISAEVA et al., 2010). Outra questão bastante discutida que pode influenciar essas variáveis é a origem incerta dos micro-organismos endofíticos, podendo os mesmos ser derivados do ambiente externo ou terem sido transmitidos verticalmente da planta-mãe para os frutos (SAIKKONEN et al., 2004; NASSAR et al., 2005; SCHULZ & BOYLE, 2005; ISAEVA et al., 2010). A transmissão vertical ocorre por meio das sementes da planta, já colonizadas, e geralmente é realizada por micro-organismos especializados, que apresentam uma história evolutiva relacionada a de seus hospedeiros (SAIKKONEN et al., 2004). Se derivados do meio externo, estes micro-organismos provavelmente iniciaram o processo de colonização como epifíticos e, por meio de estratégias diversas, como a produção de enzimas, transporiam as barreiras de proteção da planta e atingiram os tecidos vegetais internos (SCHULZ & BOYLE, 2005; BEATTIE & LINDOW, 1999). Neste caso, a diversidade de taxas é maior, podendo ser dependente do ambiente onde a planta

está inserida. A hipótese de colonização a partir do ambiente externo é reforçada pela detecção de isolados da mesma espécie tanto na superfície quanto no interior dos tecidos das plantas, observado neste trabalho (Tabela 2) e na literatura (ISAEVA et al., 2010).

A colonização da superfície do fruto é dependente de outros fatores. A influência dos mecanismos de defesa da planta na microbiota epifítica é menor, e a estrutura e distribuição das espécies nas comunidades são moduladas principalmente pelas interações (positivas ou negativas) estabelecidas entre as populações (LINDOW & BRANDL, 2003). A produção de outros metabólitos específicos é importante para garantir a colonização dos epífitas, incluindo substâncias antagonistas, que conferem vantagem adaptativa na competição com outros micro-organismos (LINDOW & BRANDL, 2003), e substâncias tensoativas, importantes para colonização de superfícies hidrofóbicas (HUTCHISON et al., 1995). A distribuição dos micro-organismos é menos heterogênea, em relação a dos endofíticos (ISAEVA et al., 2010) e a diversidade dos micro-organismos é determinada ainda por fatores ambientais abióticos, como umidade e temperatura, e bióticos, como a presença de insetos e pássaros que podem atuar como vetores (MORAIS et al., 1995).

As curvas de acumulação de espécies (S) construídas tanto para as amostras coletadas a partir da superfície do fruto quanto para as amostras obtidas a partir do mesocarpo não estabilizaram (Figura 3). Curvas de extrapolação de espécies foram construídas utilizando os estimadores Bootstrap e Jackknife 1, para avaliar o quanto a riqueza observada se aproximou da riqueza potencialmente presente nas amostras (Figura 3). O valor de riqueza total estimado para as comunidades epifíticas variou de  $45,2 \pm 2,3$  (Bootstrap) a  $54,9 \pm 4,3$  (Jackknife 1), para a amostra de 168 frutos, cuja riqueza observada foi igual a 38 espécies. Já para as comunidades endofíticas, a riqueza estimada foi 4 vezes menor, variando de  $12,6 \pm 1,5$  (Bootstrap) a  $16 \pm 2,8$  (Jackknife 1).

Semelhanças entre as curvas de acumulação de amostras e de extrapolação de riqueza, utilizando os estimadores Bootstrap e Jackknife 1, indicam que, mesmo não tendo sido atingida a estabilidade da curva de acumulação, os valores de riqueza capturados pela amostragem utilizada aproximaram-se bastante dos valores máximos potenciais de riqueza das comunidades estudadas.

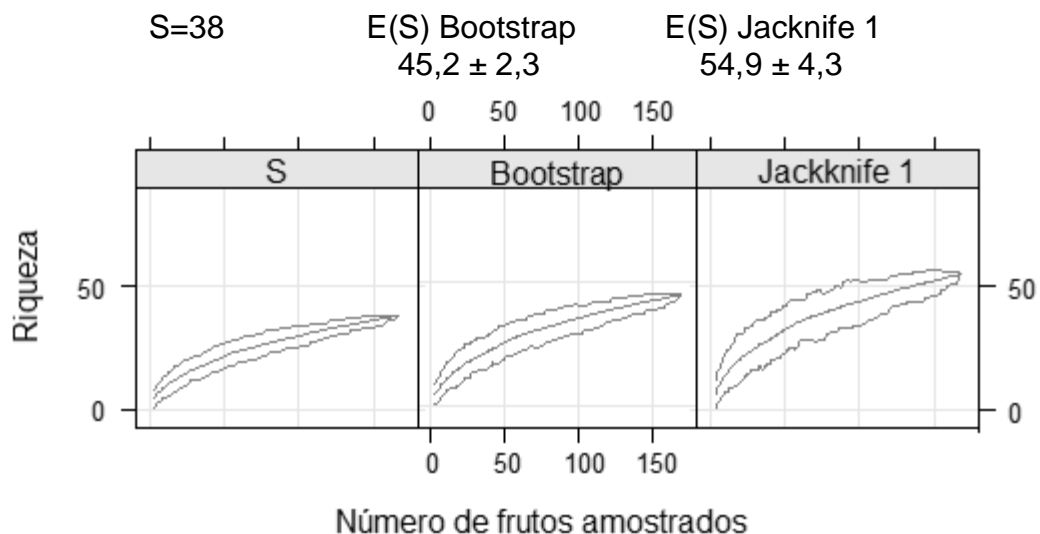
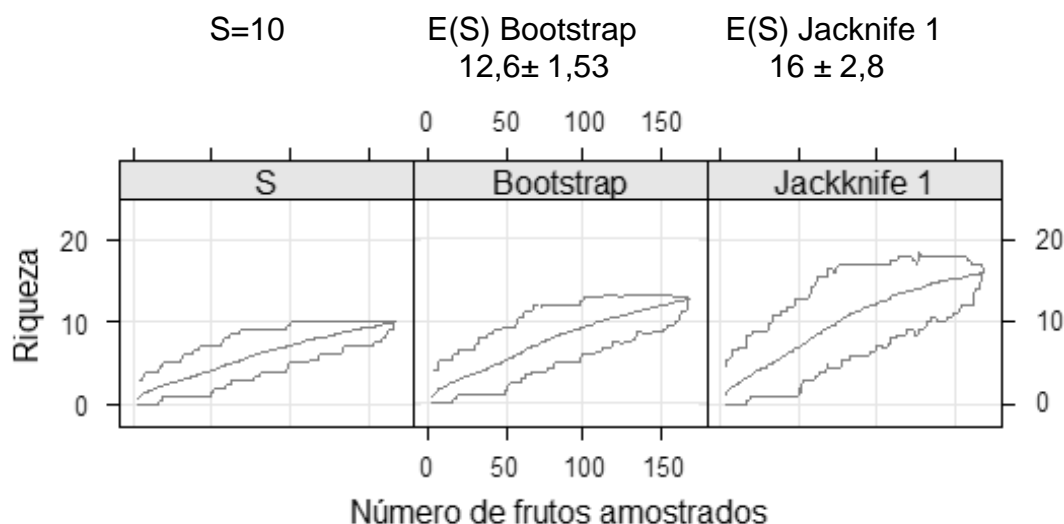
**(A) Epifíticos****(B) Endofíticos**

Figura 3: (A) Comparação entre as curva de acumulação e de extrapolação de espécies, reunindo amostras epifíticas (A) e endofíticas (B) isoladas durante todo o período de coleta (T0 a T5). Método de acumulação randômico, com 100 permutações.

Para a comunidade de leveduras epifíticas, as diferenças entre os valores de riqueza estimada e riqueza observada sugerem que 5 a 15 espécies raras, no total, poderiam ainda ser encontradas. No caso dos endofíticos, o valor de riqueza observada (S=10) encontra-se dentro da faixa de variação dos valores de riqueza estimados (Figura 3). Em ambos os casos, os valores estimados pelo modelo de Bootstrap, e consequentemente a curva obtida, foram os que mais se aproximaram, dos valores de riqueza observada. Este modelo estima a riqueza total utilizando

dados de todas as espécies, não se restringindo às espécies raras, enquanto o método Jackknife 1 utiliza apenas o número de espécies que ocorrem em apenas uma amostra (MARRUGAN, 2004).

Curvas de acumulação de espécies também foram construídas para cada conjunto de frutos coletados em tempos diferentes. As curvas obtidas para as amostras epifíticas (Apêndice D) e endofíticas (Apêndice E) mostraram comportamentos semelhantes à curva total de amostras, sendo que foram observados grandes desvios para o segundo grupo, em virtude do pequeno número de espécies e sua baixa frequência entre os frutos. Apesar das curvas não estabilizarem, as riquezas observadas para cada um dos grupos temporais também apresentam valores muito próximos aos obtidos através dos estimadores Jackknife 1 e Bootstrap (Tabela 4).

Tabela 4: Dados da riqueza observada e riqueza estimada de leveduras e fungos epifíticos e endofíticos, utilizando os estimadores Jackknife 1 e Bootstrap, para cada um dos tempos de amostragem.

	Riqueza observada	Riqueza estimada		n
		Jackknife1	Bootstrap	
<b>Epifíticos</b>				
<b>T0</b>	16	26,6 ± 4,0	20,2 ± 2,0	28
<b>T1</b>	13	17,8 ± 2,2	15,4 ± 1,4	28
<b>T2</b>	12	16,8 ± 2,6	14,3 ± 1,4	28
<b>T3</b>	12	17,8 ± 2,7	14,3 ± 1,3	28
<b>T4</b>	14	21,7 ± 3,1	17,2 ± 1,5	28
<b>T5</b>	15	21,8 ± 2,9	18,0 ± 1,7	28
<b>Endofíticos</b>				
<b>T0</b>	1	1,0	1,1 ± 0,3	28
<b>T1</b>	2	3,0 ± 1,0	2,4 ± 0,5	28
<b>T2</b>	5	6,9 ± 1,4	6,0 ± 0,9	28
<b>T3</b>	3	4,9 ± 1,4	3,9 ± 0,9	28
<b>T4</b>	2	3,0 ± 1,0	2,4 ± 0,5	28
<b>T5</b>	3	4,9 ± 2,0	3,7 ± 1,0	28



A não estabilização das curvas de acumulação de amostras sugere, em uma primeira análise, que um maior esforço amostral poderia capturar maior riqueza de espécies. Todavia, o número de amostras coletadas foi alto e, talvez, a questão esteja relacionada aos métodos escolhidos para avaliação da diversidade da microbiota associada ao fruto, não se restringindo ao aumento da amostragem. A utilização de um único meio de cultura complexo para o isolamento das leveduras, insuficiente para suprir a exigência nutricional de todas as espécies presentes nas amostras, certamente diversa neste requisito; a opção pelo isolamento de microorganismos cultiváveis, não somando a estes a parcela da microbiota não-cultivável; e a opção por reduzir o número de isolados a serem submetidos ao sequenciamento de regiões do gene do rRNA, por meio dos critérios de seleção e agrupamento estabelecidos, podem ter contribuído para a subestimação da riqueza das amostras (STRINGINI et al., 2008, 2009; TAKASHIMA et al., 2012; PPALEXANDRATOU et al., 2013). Esta riqueza, ainda que subestimada, apresentou valores altos, com a descrição de 39 espécies de leveduras e fungos leveduiformes, sendo que 35 destas foram descritas pela primeira vez como associadas aos frutos de macaúba.

Os dados apresentados na Tabela 4 permitem concluir que, em termo de riqueza de espécies, as alterações foram pouco expressivas tanto para as comunidades epifíticas quanto endofíticas. Entre as comunidades epifíticas, o maior número de espécies de leveduras e fungos foi observado no tempo 0, ou seja, diretamente após a coleta dos frutos na palmeira. Já entre as comunidades endofíticas, o maior número de espécies de leveduras e fungos foi observado no tempo 2 (Tabela 4). A riqueza, por si só, não é capaz de retratar a diversidade do sistema. Para compreender melhor o comportamento dessas comunidades ao longo do tempo, foram analisadas as variações dos valores de abundância e da composição de espécies.

As curvas de abundância auxiliaram na descrição do modo de distribuição das espécies nas comunidades epifíticas e endofíticas. Primeiramente, serão expostos os dados das análises de epifíticos e, posteriormente, de endofíticos.

Curvas utilizando os valores de abundância de isolados epifíticos obtidos a partir do conjunto total de frutos coletados (Figura 4) e a partir do o conjunto de frutos coletados em diferentes tempos (Figura 5) são mostradas em seguida.

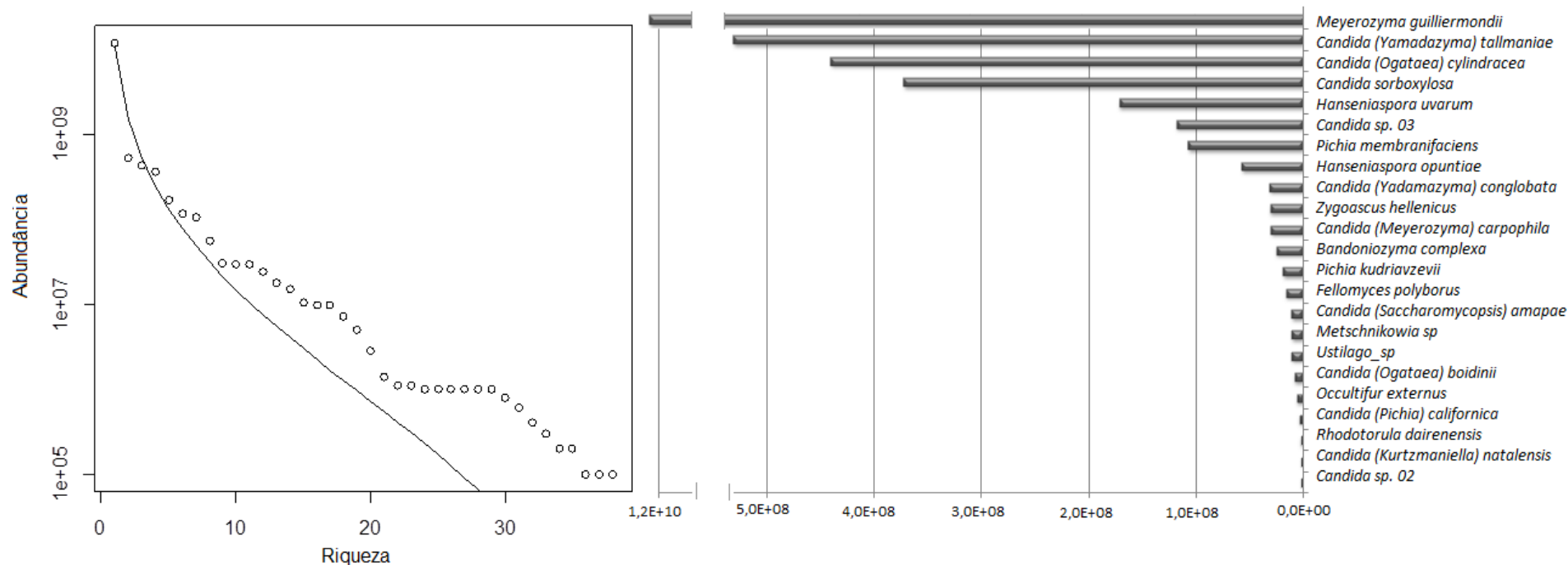
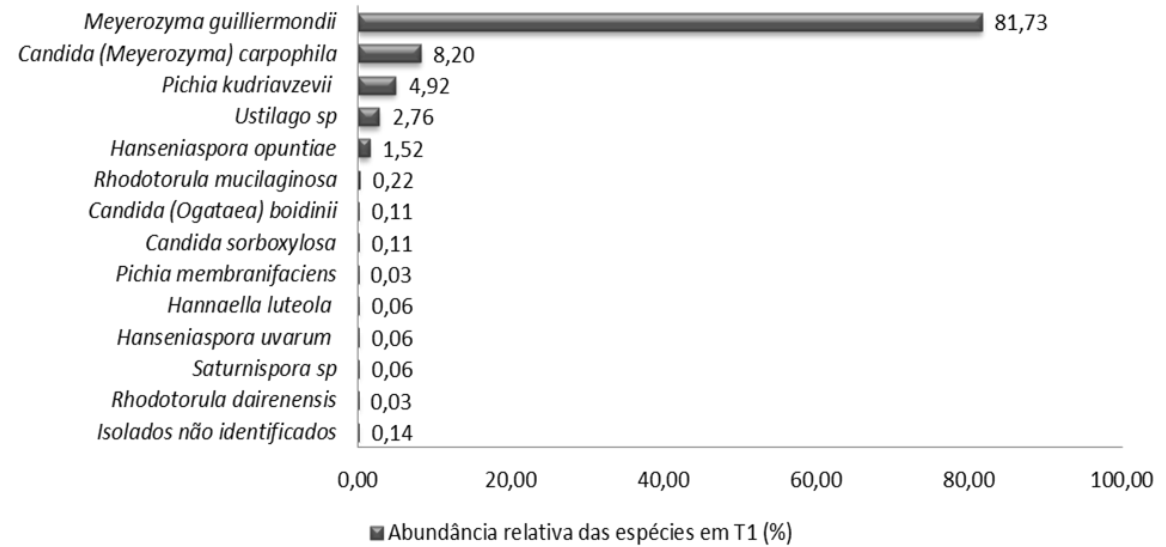
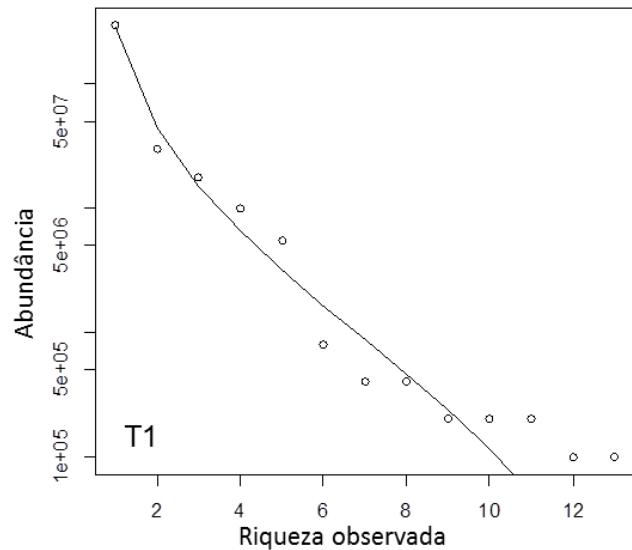
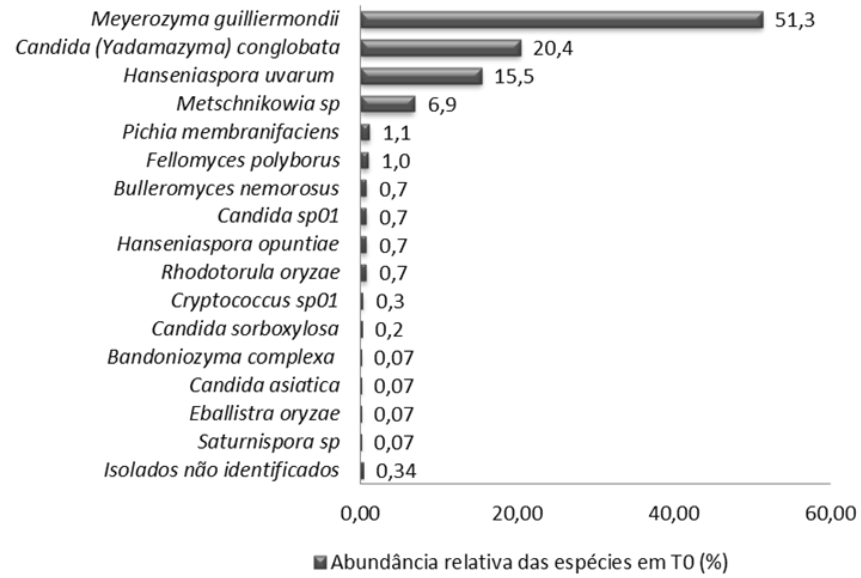
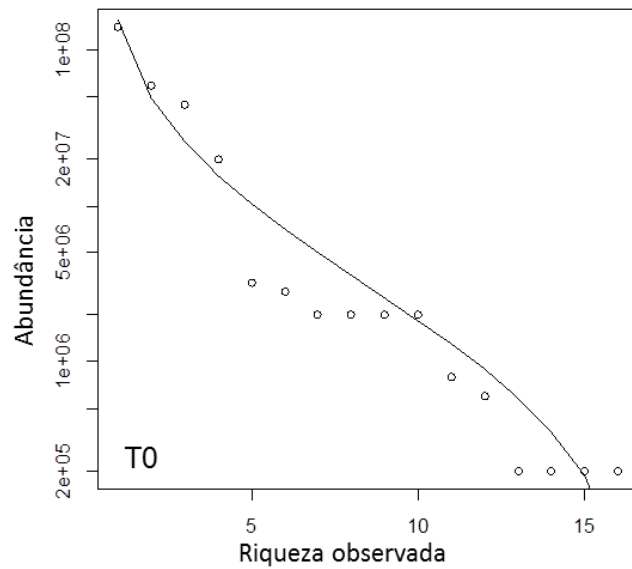
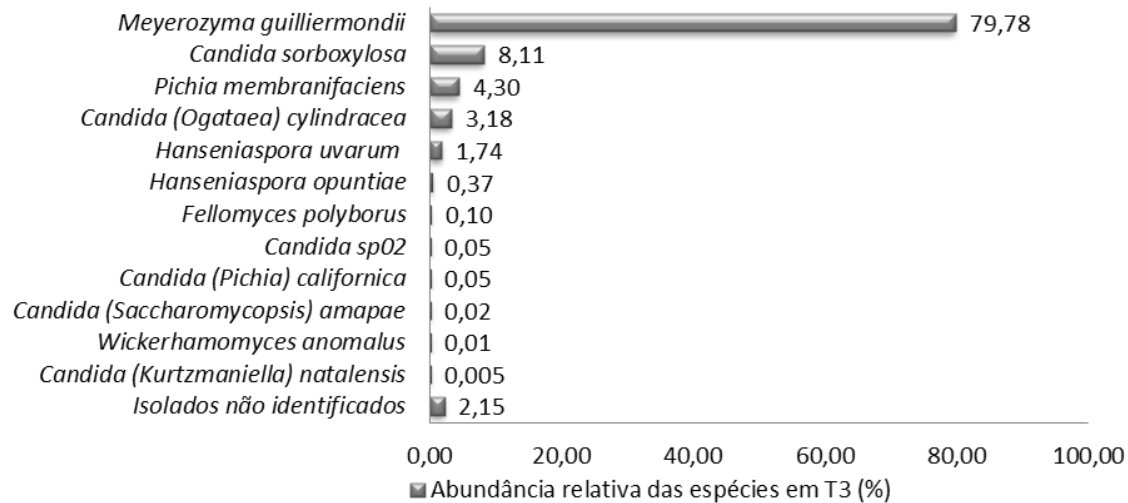
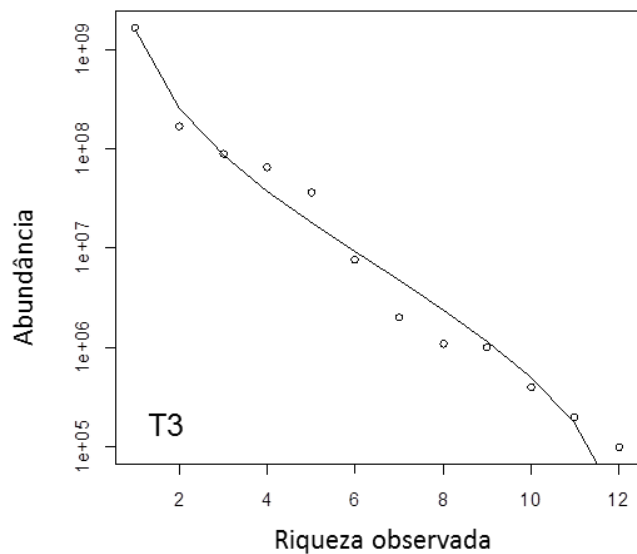
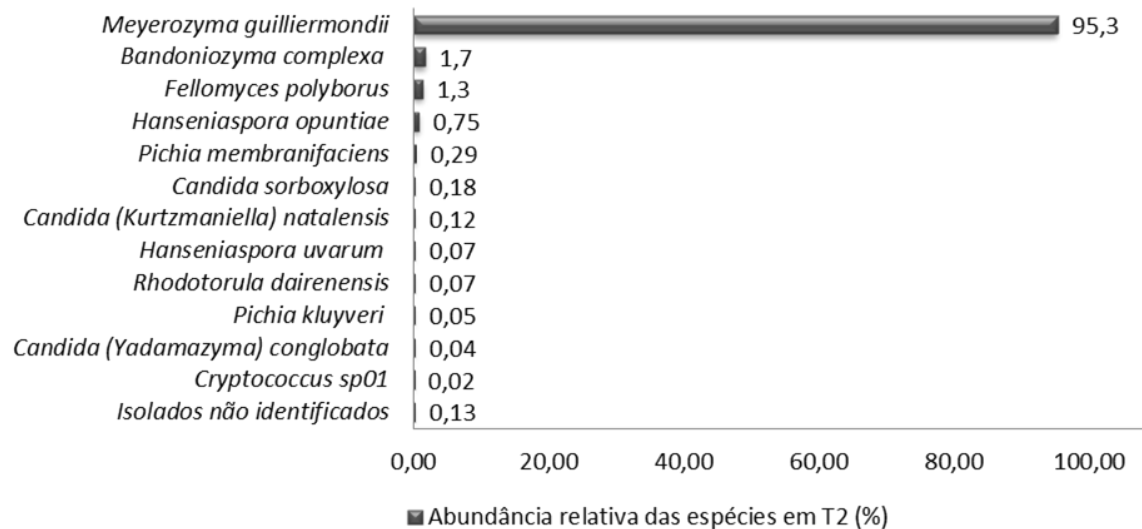
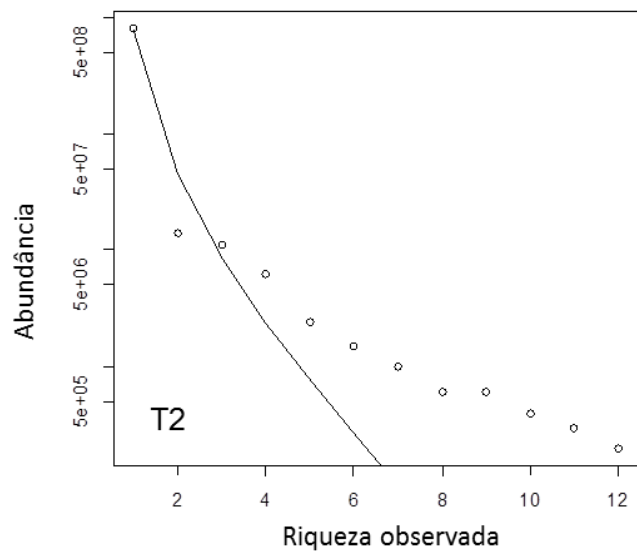


Figura 4: Curva de abundância utilizando o número total de amostras epifíticas isoladas em T0 a T5 (esquerda). Foi utilizado o modelo Log-Normal, família poisson. Número total de espécies: 38. Abundância total:  $14 \times 10^9$  Unidades Formadoras de Colônia. Gráfico com “rank” de espécies mais abundantes (direita). Espécies com abundância igual ou menor a  $1,0 \times 10^6$  UFC não foram incluídas no gráfico. Em ordem crescente: *Bulleromyces nemorosus*, *Candida* sp. 01, *Ogataea* sp., *Rhodotorula oryzae*, *Rhodotorula* sp., *Sarocladium strictum* ( $1,0 \times 10^6$  UFC); *Rhodotorula mucilaginoso* ( $8,0 \times 10^5$  UFC), *Cryptococcus* sp. 01 ( $6,0 \times 10^5$  UFC), *Pichia kluyveri* ( $6,0 \times 10^5$  UFC), *Saturnispora* sp. ( $3,0 \times 10^5$  UFC); *Hannaella luteola* e *Wickerhamomyces anomalus* ( $2,0 \times 10^5$  UFC), *Candida asiatica*, *Cryptococcus* sp 02 e *Eballistra oryzae* ( $1,0 \times 10^5$  UFC).





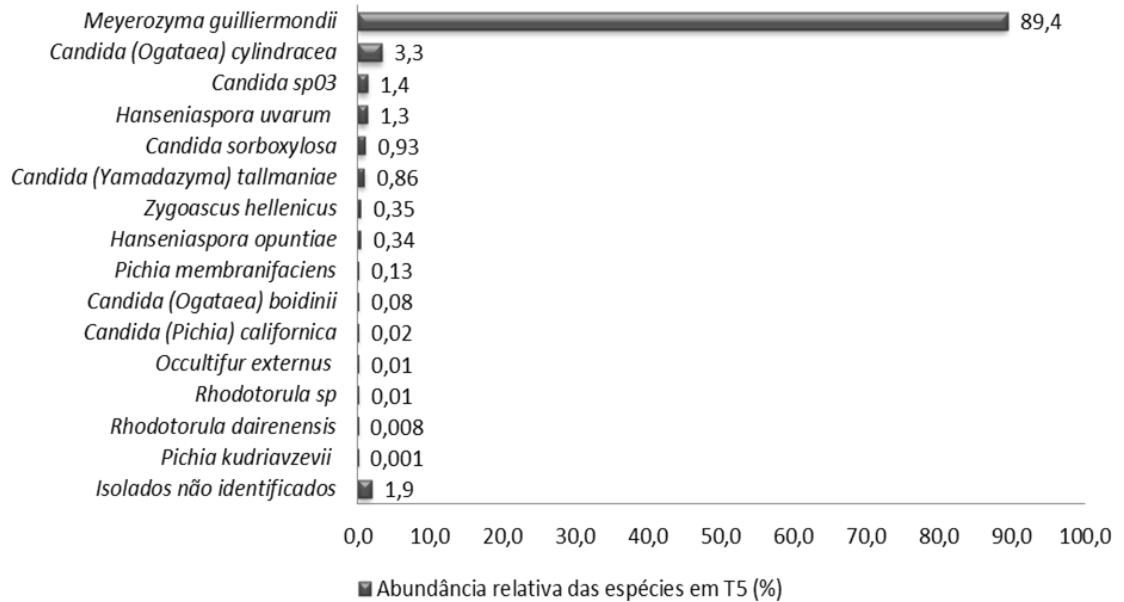
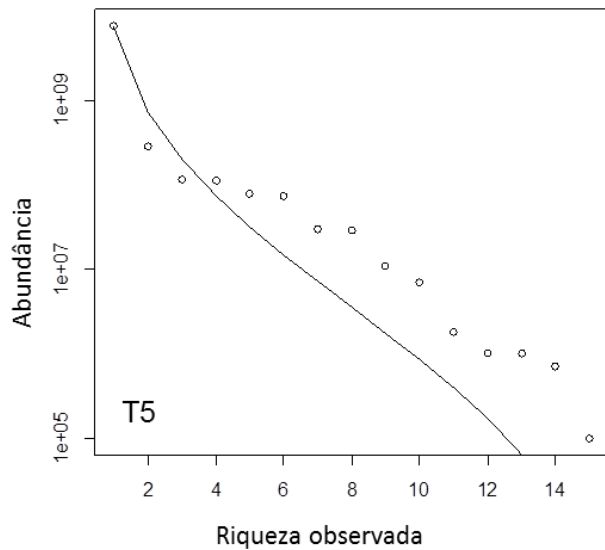
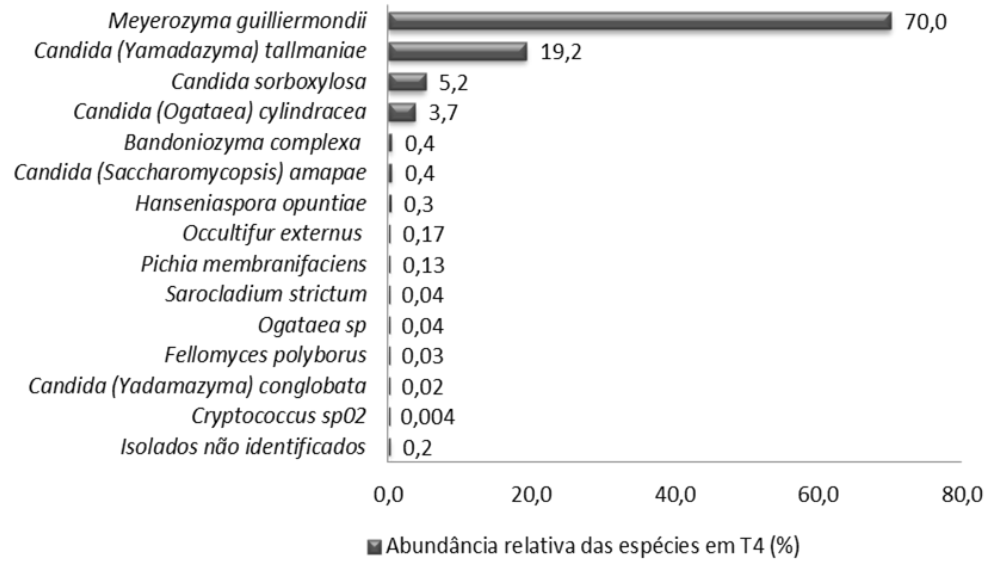
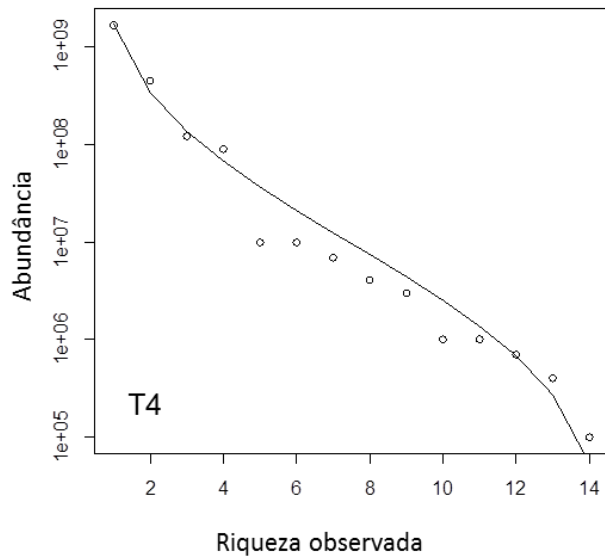


Figura 5: Curvas de abundância utilizando o número de amostras epifíticas coletadas em cada um dos períodos de coleta T0 – T5 (esquerda). Foi utilizado o modelo Log-Normal, família poisson. Gráficos de abundância relativa das espécies T0-T5 (direita). A abundância relativa das espécies foi calculada somando-se o total da contagem de UFC da espécie por fruto, em cada época de coleta, dividido pelo total de contagens de UFC do período em questão, expressos em porcentagens. Legenda referente às pranchas das páginas 72 - 74.

Juntamente com as curvas, foram dispostos os gráficos de abundância relativa para facilitar a visualização das espécies dominantes e de baixa abundância.

De modo geral, as amostras epifíticas ajustaram-se ao modelo de distribuição Logaritmo-Normal, muito usado para descrever a distribuição de espécies em comunidades naturais (MARRUGAN, 2004). É possível visualizar uma espécie dominante, destacada das demais no início da curva, e uma a quatro espécies com abundância baixa, observadas ao final, próximas ao eixo do X (Figuras 4 e 5). A distribuição observada no modelo Log-Normal deriva de espécies coexistindo em condições de competição parcial, em vez de direta, com adaptações promovendo uma diferenciação de nicho sem a exclusão competitiva de um habitat (MARRUGAN, 2004). O comportamento da abundância das espécies das comunidades epifíticas amostradas em tempos diferentes apresentou perfis semelhantes ao da curva de abundância contendo o total das amostras (Figura 5).

A espécie dominante nas comunidades epifíticas, observada tanto na análise dos dados totais, como na análise compartimentada por tempo, foi *Meyerozyma guilliermondii* (Figuras 4 e 5). Contudo, o *ranking* de espécies (ordenamento decrescente das espécies mais abundantes) observado no gráfico da Figura 4 não se mantém nos gráficos da Figura 5, variando consideravelmente entre as comunidades de frutos coletados em tempos diferentes. Na curva apresentada na Figura 4 relativa ao conjunto total de isolados epifíticos, abaixo de *M. guilliermondii* vem as espécies *Candida (Yamadazyma) tallmaniae*, *C. (Ogataea) cylindraceae*, *C. sorboxilosa*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida* sp. 03, *Pichia membranifaciens* e *H. opuntiae*, em ordem decrescente de abundância total. Entretanto, *C. (Ogataea) cylindraceae* e *C. (Yamadazyma) tallmaniae* apenas passam a compor as comunidades epifíticas a partir de T3 e T4, enquanto *Candida* sp. 03 encontra-se presente apenas em T5. Considerando que ao longo do tempo os valores de abundância total nas comunidades aumentam (Tabela 5) é razoável que o grau de

importância dessas espécies também seja alto, quando o sistema é avaliado como um todo.

Além do aumento dos valores de abundância total nas comunidades epifíticas, entre as curvas foi possível verificar sutis mudanças na equitabilidade do sistema, confirmadas pelos índices de Simpson (1-D) (Tabela 5). Em T0, observa-se um maior número de espécies e uma distribuição das espécies mais equitativa (1-D = 0,66), tornando essa comunidade mais diversa em relação às demais. Essa observação é confirmada pelos valores de Índice de Shannon (H), mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Diversidade das comunidades de leveduras e fungos epifíticos, em função do tempo de deposição dos frutos no solo.

	T0	T1	T2	T3	T4	T5
Riqueza (S)	16	13	12	12	14	15
Abundância total <sup>a</sup>	1,5x10 <sup>8</sup>	3,6x10 <sup>8</sup>	8,4x10 <sup>8</sup>	2,0x10 <sup>9</sup>	2,4 x10 <sup>9</sup>	8,4 x10 <sup>9</sup>
Dominância (D) <sup>b</sup>	0,34	0,68	0,91	0,68	0,53	0,83
Simpson (1-D) <sup>c</sup>	0,66	0,32	0,09	0,32	0,47	0,17
Shannon (H) <sup>d</sup>	1,42	0,73	0,26	0,73	0,93	0,46

<sup>a</sup>Número de indivíduos totais, em Unidades Formadoras de Colônias (UFC); <sup>b</sup>Dominância (D) → 1 – Índice de Simpson, varia de 0 (táxa em iguais quantidades) a 1 (um táxon domina completamente a comunidade); <sup>c</sup>Índice de Simpson (1 – D), mede equitabilidade da comunidade, de 0 a 1; <sup>d</sup>Índice de Shannon (entropia), índice de diversidade que leva em conta não só o número de táxons, mas também o número de indivíduos. Varia de 0 para comunidades com um único táxon até valores elevados para comunidades com muitos táxons, cada um com alguns indivíduos.

Em T0, *Meyerozyma guilliermondii* apresenta abundância relativa em torno de 51,3%, seguida de *Candida (Yadamazyma) globata* com 20,4%, *Hanseniaspora uvarum* com 15,5%, *Metschnikowia* sp. com 6,9%, e as demais espécies com abundâncias relativas entre 1,1 e 0,07%, totalizam 5,9% dos valores de abundância (Figura 5). Já nas comunidades epifíticas de frutos coletados após contato com o solo, os valores de abundância relativa de *Meyerozyma guilliermondii* aumentam consideravelmente: 81,7% em T1; 95,3% em T2; 79,8% em T3; 70% em T4; e 89,4% em T5. O aumento da abundância relativa dessa espécie reduz bastante o valor das abundâncias das demais espécies. Com isso, a equitabilidade do sistema também diminui, atingindo valores mínimos (1-D igual a 0,09) em T2 (Tabela 5).

Registros de altos valores de abundância de *Meyerozyma guilliermondii* em amostras naturais são escassos. Em um trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foi verificado valores de abundância relativa de 66,7% de *Meyerozyma guilliermondii* na superfície de frutos de macaúba coletados após 40 dias de deposição no solo (FARIA, 2012). Contudo, neste mesmo trabalho, sua frequência e abundância como espécie endofítica em frutos de macaúba foram geralmente baixas em relação às demais espécies.

*Meyerozyma guilliermondii*, por sua vez, é uma espécie cosmopolita, amplamente distribuída na natureza. Há registros de isolados obtidos a partir de plantas, insetos, produtos alimentícios, sedimento de estuários e material clínico humano e veterinário (revisado por KURTZMAN et al., 2011). Tamanha variedade de habitats possivelmente está associada à plasticidade fisiológica entre isolados desta espécie. A capacidade de produção de exoenzimas por *Meyerozyma guilliermondii* já foi descrita em diversos trabalhos (BUZZINI & MARTINI, 2002; WANG et al., 2007; FARIA, 2012; THONGEKKAEW et al., 2012; DUARTE et al., 2013). Também as capacidades de produção de auxinas e solubilização de fosfato já foram relatadas para esta espécie (LIMTONG & KOOWADJANAKUL, 2012; NAKAYAN et al., 2013). Tais habilidades conferem vantagens adaptativas aos isolados desta espécie.

O contato com o solo alterou significativamente a condição do fruto de macaúba e da microbiota a ele associada. Em geral, o solo apresenta uma grande riqueza de micro-organismos, entre fungos filamentosos, bactérias e leveduras. A plasticidade metabólica desses micro-organismos é alta, bem como suas taxas de produtividade, o que aumenta seu “fitness” e, conseqüentemente, suas vantagens competitivas. A partir do momento em que o fruto é depositado no solo, parte dessa microbiota passa a colonizar também sua superfície e tecidos, competindo por espaço e nutrientes com a microbiota anteriormente presente, passando então a compor as comunidades epifítica e endofíticas do fruto. Diante desse panorama, a plasticidade fisiológica apresentada por *M. guilliermondii*, somados ao alto valor de abundância dessa espécie em T0, podem ter contribuído para o sucesso ecológico e a manutenção da sua população no fruto de macaúba depositado no solo.

Após contato com o solo, também foram observadas mudanças no padrão de abundância das espécies. Em T1, as espécies *Candida (Meyerozyma) carpophila*, *Pichia kudriavzevii*, *Ustilago* sp. e *Hanseniaspora opuntiae* seguem abaixo de



*Meyerozyma guilliermondii*, abarcando 17,4% da abundância total, enquanto as demais espécies juntas perfazem menos de 1% (Figura 5). Em T2, outras espécies aparecem como mais abundantes abaixo de *M. guilliermondii*, entre elas *Fellomyces polyborus* e *Bandoniozyma complexa*, que juntas compreendem 3,0%, enquanto as demais compreendem aproximadamente 1% da abundância total (Figura 5). E esta observação pode ser feita em relação aos demais tempos, com um número grande de espécies (>50%) totalizando menos de 1-2% da abundância total, e 3 a 5 diferentes espécies assumindo abundâncias maiores abaixo de *M. guilliermondii*, entre elas: para T3, *C. sorboxylosa*, *Pichia membranifaciens*, *C. (Ogataea) cylindracea* e *H. uvarum*; para T4, *C. (Yamadazyma) tallmaniae*, *C. sorboxylosa* e *C. (Ogataea) cylindracea*; para T5, *C. (Ogataea) cylindracea*, *Candida* sp. 03, *H. uvarum* e *C. sorboxylosa* (Figura 5).

Assim, como a composição de espécies mais abundantes de cada comunidade de epifíticos variou em função do tempo de deposição dos frutos no solo, também foi observada a variação no conjunto total das espécies. Esta pode ser confirmada por meio dos altos valores de medida de diversidade beta de Whittaker ( $\beta W$ ) (1960), que variaram de 0,36, entre T0 e T2, a 0,68, entre T0 e T5 (Tabela 6). Esta medida tem sido utilizada para avaliar mudanças de diversidade em um sistema, mediante um gradiente físico ou temporal (WHITTAKER, 1960; TUOMISTO, 2010a,b). De modo geral, enquanto a diversidade alfa ( $\alpha$ ) mede a diversidade em uma comunidade, amostrada em um determinado período, a diversidade beta ( $\beta$ ) mede a variação dessa diversidade entre comunidades de períodos diferentes. Segundo esta medida, quanto maior o valor de  $\beta W$ , menor o número de espécies compartilhadas entre duas comunidades, analisadas par a par.

A Figura 6 permite visualizar de modo mais fácil a distribuição das espécies entre comunidades associadas a frutos coletados em diferentes tempos de deposição no solo. Algumas espécies foram isoladas em praticamente todos os tempos de coleta, *M. guilliermondii*, *C. sorboxylosa*, *H. opuntiae*, *P. membranifaciens* e *H. uvarum*, enquanto outras, como *Candida asiatica*, *Eballistra oryzae*, *Hannaella luteola*, *Pichia kluyveri* e mais 15 espécies, foram isoladas em apenas um dos tempos (Figura 6). Algumas espécies, como *Bandoniozyma complexa* e *C. (Yamadazyma) conglobata*, foram isoladas em tempos alternados (Figura 6).

Tabela 6: Tabela de diversidade beta - Medida de Whittaker ( $\beta W$ )\* (1960) para comunidades epifíticas

	T0	T1	T2	T3	T4	T5
T0	0					
T1	0,59	0				
T2	0,36	0,52	0			
T3	0,57	0,60	0,42	0		
T4	0,53	0,70	0,46	0,46	0	
T5	0,68	0,43	0,56	0,48	0,52	0

\*A medida de Whittaker ( $\beta W$ ) é obtida pela equação:  $\beta W = (S/\alpha) - 1$ , em que S = número total de espécies;  $\alpha$  = número médio de espécies.

Quando observamos as abundâncias relativas das espécies que foram isoladas em apenas um período de coleta, observamos que, em geral, elas são menores do que 0,7% (Figura 5), com valores de abundância total inferiores a  $1,0 \times 10^6$  UFC totais (Apêndice F). Exceções para este padrão são *Metschnikowia* sp., *C. (Meyerozyma) carpophila*, *Ustilago* sp., *Candida* sp. 03 e *Zygoascus hellenicus*.

Valores baixos de abundância podem ser uma das causas da exclusão competitiva de espécies (GIACOMINI, 2007). Segundo esta hipótese, estas espécies de ocorrência única teriam colonizado a superfície do fruto por um breve período de tempo, sendo excluídas por espécies dominantes ou por outras recém-chegadas mais competitivas. Contudo, espécies com valores de abundância de igual ou menor grandeza mantiveram-se ao longo do tempo nas comunidades de epifíticos (Figura 5). Dessa forma, talvez as espécies não tenham sido excluídas, mas tenham se mantido em abundâncias tão baixas, incapazes de serem detectadas pelos métodos de análise utilizados. Esta segunda hipótese explica as alternâncias de ocorrências observadas para algumas espécies.

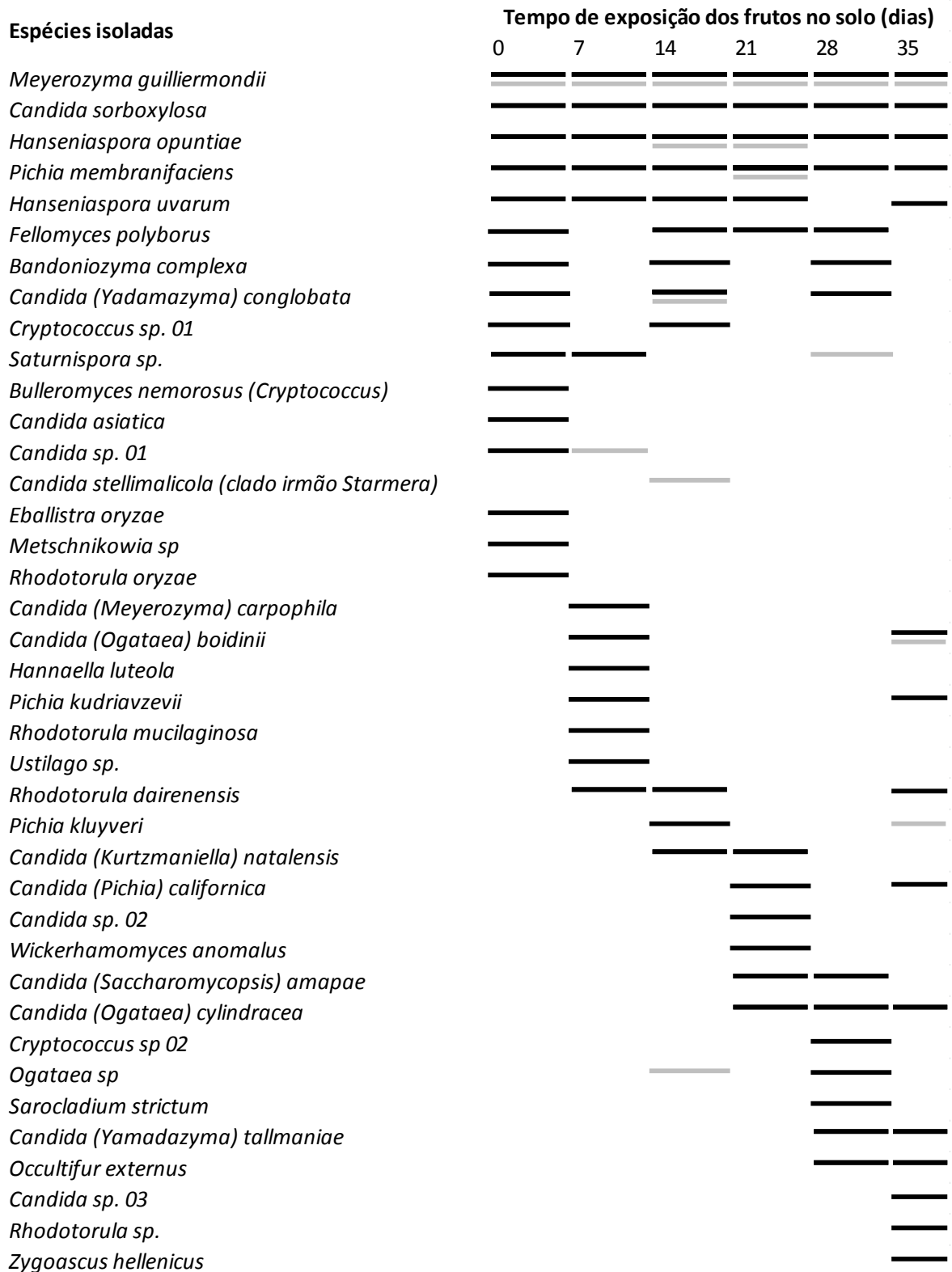


Figura 6: Figura esquemática da distribuição das espécies entre os tempos de coleta. Linhas pretas referem-se às leveduras epifíticas e linhas cinza, às leveduras endofíticas.

Uma terceira hipótese está relacionada com fatores intrínsecos à amostra e à metodologia de coleta. Foi observado que existe uma grande diferença de riqueza e abundância de espécies entre as comunidades associadas a cada fruto (unidade amostral), representado estatisticamente pelo coeficiente de diferenciação de amostras, igual a 0,95 para as amostras epifíticas. Este coeficiente foi obtido por meio da análise de contribuição particionada de diversidade descrita por Lu e colaboradores (2007) e avalia as contribuições das amostras e das variações entre as amostras para a diversidade total do sistema. As comunidades epifíticas de um fruto, por sua vez, possuem no máximo 5 espécies diferentes, o que pode ser observado na identificação dos isolados (os números romanos presentes na identificação dos isolados só chega até o número V). Somado a estes fatores ou, talvez, como uma consequência deles, a frequência das espécies isoladas por fruto é baixa, variando de 3,6% (em que a espécie é observada em apenas 1 dos 28 frutos amostrados) a 35,7% (em que a espécie é observada em até 10 dos 28 frutos amostrados), com exceção da espécie *Meyerozyma guilliermondii*, cuja frequência varia de 67,9 a 96,4% (Figura 7). Analisando estes fatores em conjunto, podemos pensar que espécies isoladas a partir de um conjunto de frutos coletados em um determinado período poderiam ser detectadas em outros períodos de coleta, se a amostragem fosse ampliada. Esta alternativa, contudo, seria de difícil execução devido à laboriosidade das análises em laboratório. De qualquer forma, as três hipóteses apresentadas para explicar o padrão de distribuição das espécies entre os tempos de coleta dos frutos não se excluem.

As elevadas frequências relativas de *Meyerozyma guilliermondii* observadas nos frutos de macaúba, em conjunto com as baixas frequências observadas para as demais espécies, contribuem para os altos valores de abundância relativa desta. Isso significa que as abundâncias de *M. guilliermondii* em cada fruto nem sempre assumirão valores muito mais altos do que as abundâncias das demais espécies, mas, como são mais frequentes que as demais, a somatória das suas abundâncias aumenta o valor da abundância relativa dessa espécie em relação à abundância total do sistema. Do mesmo modo, o aumento da frequência desta espécie ao longo do tempo contribui para o aumento da abundância relativa, apesar deste não ser o único fator que explica este fenômeno, como discutido anteriormente.

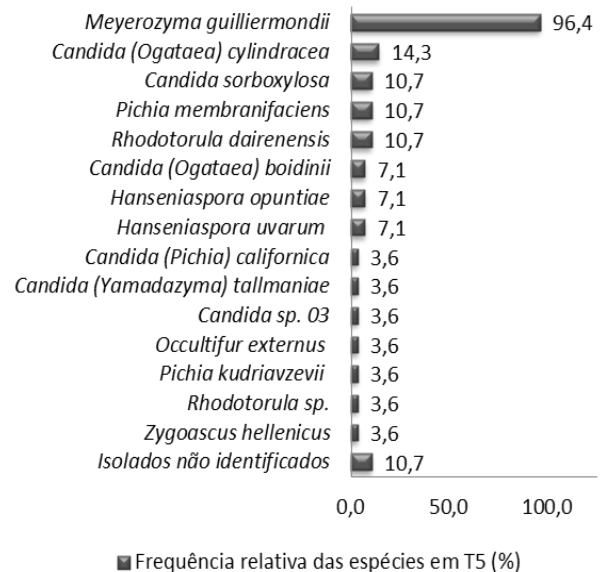
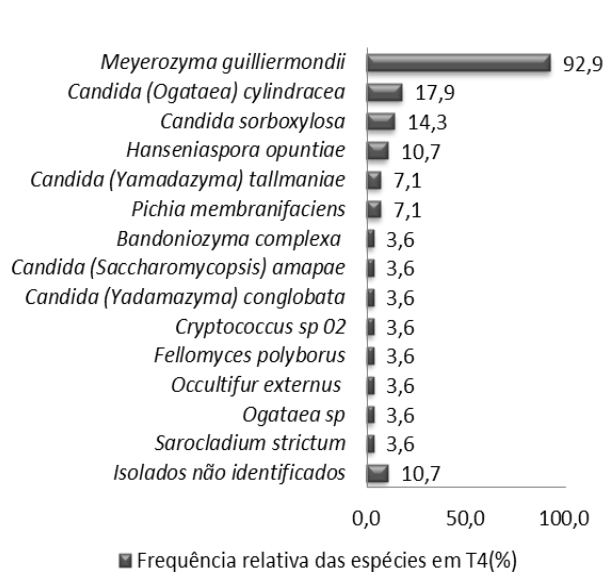
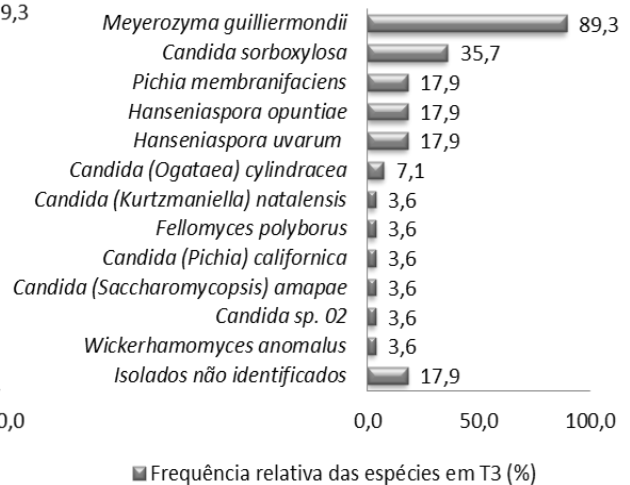
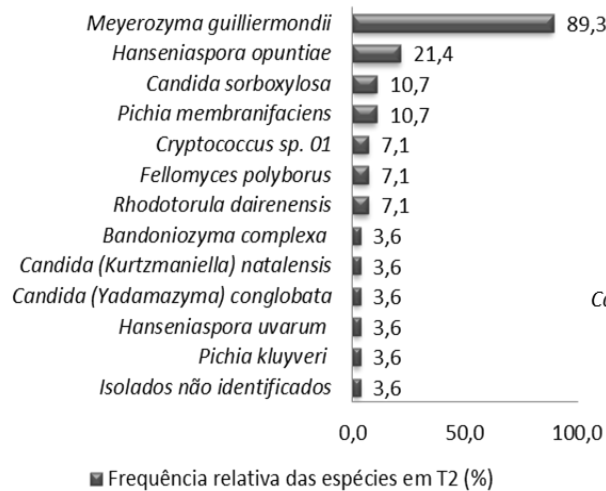
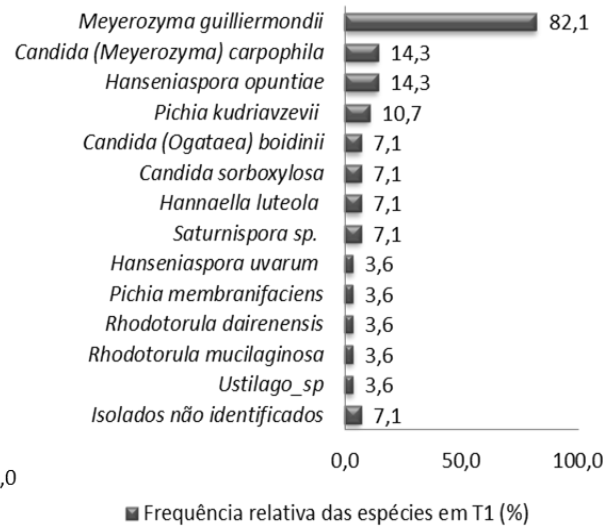
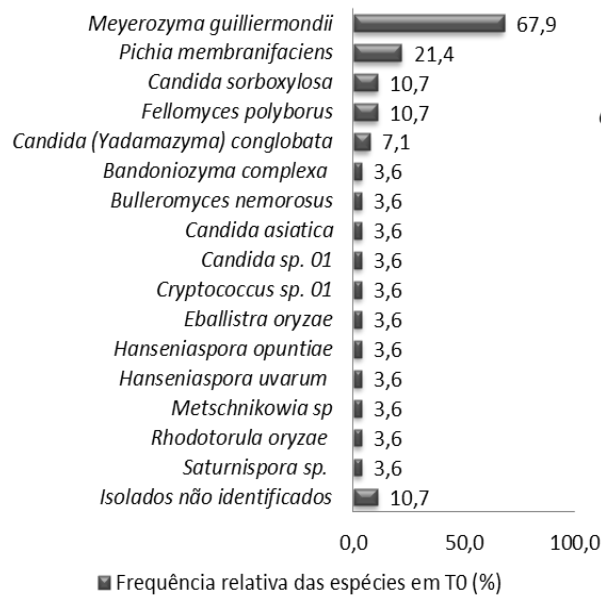


Figura 7: Gráficos de frequência relativa das espécies epifíticas por período de coleta. A frequência relativa de cada espécie foi calculada de acordo com a equação:  $F_i = (J_i/K) * 100$ , em que  $F_i$  é a frequência da espécie  $i$ ;  $J_i$  é o número de frutos nos quais a espécie  $i$  ocorreu e  $K$  é o número total de frutos. Legenda correspondente à figura da página 82.

Entre as espécies com frequências relativas mais altas, além de *M. guilliermondii*, pode-se citar *P. membranifaciens* (21,4%, em T1); *C. (Meyerozyma) carpophila* e *H. opuntiae* (14,3%, em T1); *H. opuntiae* (21,4%, em T2); *C. sorboxylosa* (35,7%, em T3), *P. membranifaciens*, *H. opuntiae* e *H. uvarum* (17,9%, em T3); *C. (Ogataea) cylindracea* (17,9%, em T4); e *C. (Ogataea) cylindracea* (14,3%, em T5) (Figura 7). Observa-se que essas espécies nem sempre correspondem às espécies com maiores abundâncias relativas nas respectivas comunidades de epifíticos (Figura 5). Em T0, as espécies citadas como mais abundantes apresentam frequências relativas de 3,6 a 7,1%, tão baixas quanto de *Ustilago* sp., em T1, *Fellomyces polyborus* e *Bandonyozyma complexa* em T2, *C. (Ogataea) cylindracea* em T3; *C. (Yamadazyma) tallmaniae* em T4, *Candida* sp. 03 e *H. uvarum*, em T5. De modo geral, a grande maioria das espécies que compõem as comunidades em cada período, de 58 a 75%, foi isolada de apenas 1 fruto (frequência relativa igual a 3,6%) ou 2 (frequência relativa igual a 7,1%). Assim como a baixa abundância, baixas frequências relativas também podem deixar as espécies vulneráveis à exclusão competitiva (GIACOMINI, 2007).

Para descrição do modo de distribuição das espécies nas comunidades de endofíticos também foram construídas curvas utilizando os valores de abundância dos isolados obtidos a partir do conjunto total de frutos coletados (Figura 8) e a partir do conjunto de frutos coletados em diferentes tempos (Figura 9). Da mesma forma que nas curvas das comunidades de epifíticos, foram dispostos os gráficos de abundância relativa adjacentes para facilitar a visualização das espécies dominantes e de baixa abundância.

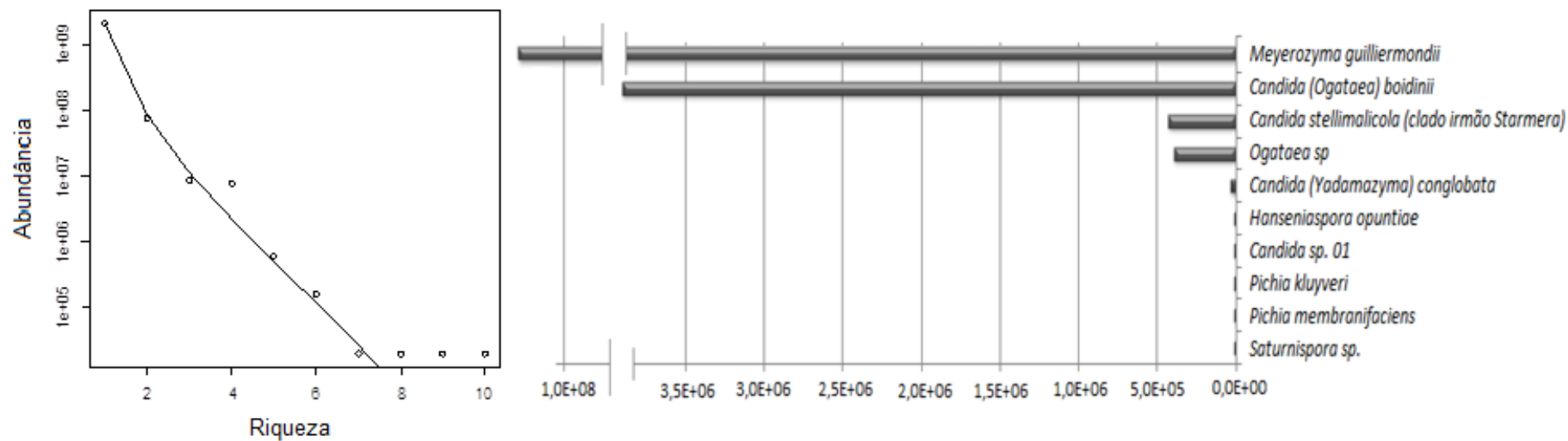


Figura 8: Curva de abundância utilizando o número total de amostras endofíticas isoladas em T0 a T5 (esquerda). Foi utilizado o modelo Log-Normal, família poisson. Número total de espécies: 10. Abundância total:  $1,1 \times 10^8$  (UFC). Gráfico com *rank* de espécies mais abundantes (direita).

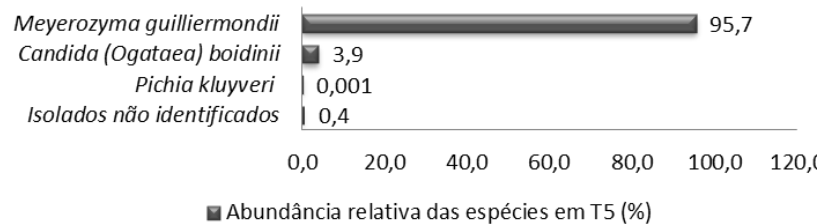
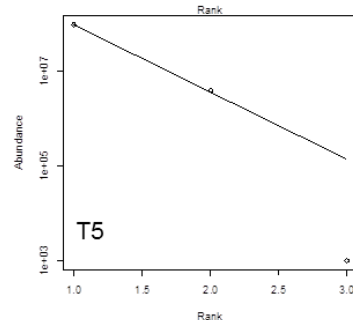
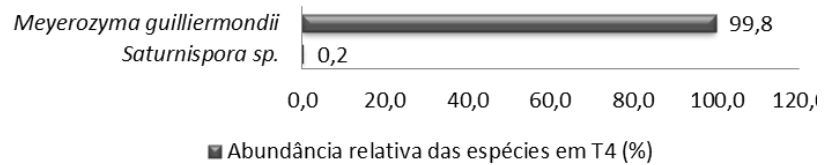
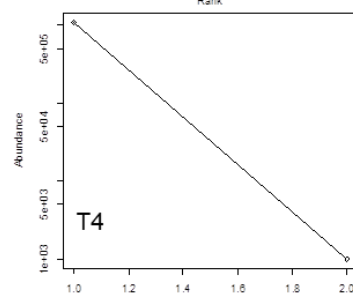
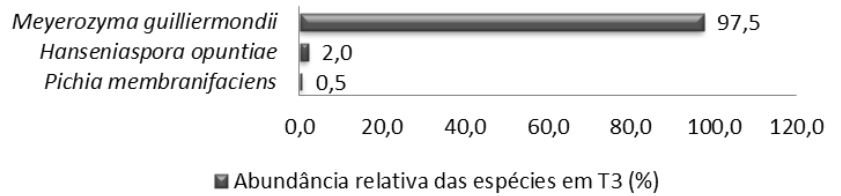
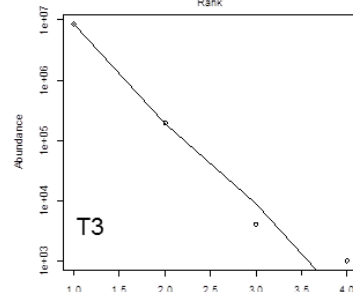
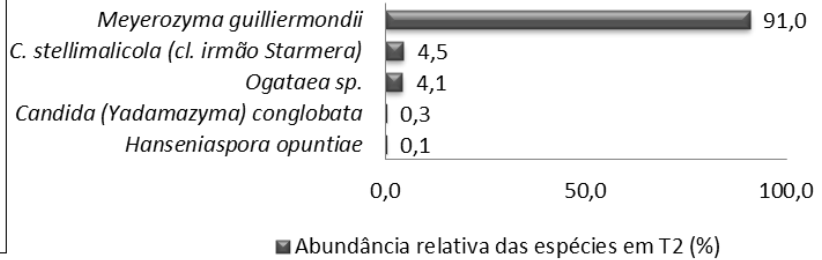
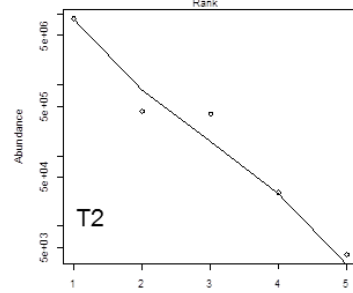
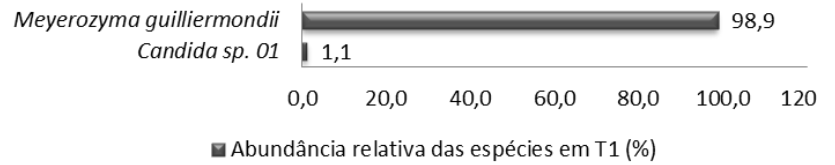
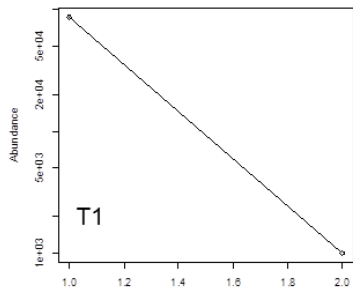
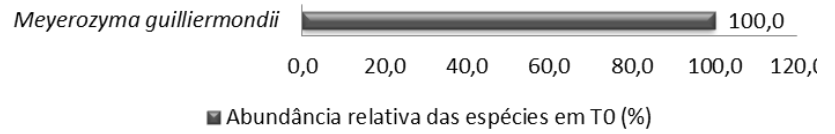
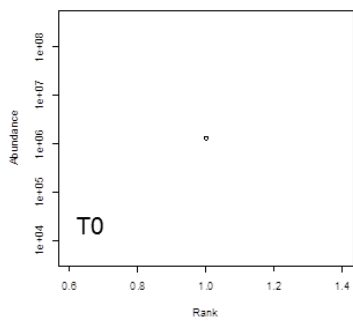




Figura 9: Curvas de abundância utilizando o número de amostras endofíticas coletadas em cada um dos períodos de coleta T0 – T5 (esquerda). Foi utilizado o modelo Log-Normal, família poisson. Gráficos de abundância relativa das espécies T0-T5 (direita). A abundância relativa das espécies foi calculada somando-se o total da contagem de UFC da espécie por fruto, em cada época de coleta, dividido pelo total de contagens de UFC do período em questão, expressos em porcentagens. Legenda referente à prancha da página 85.

Um padrão diferenciado de distribuição das espécies foi observado para as amostras endofíticas. A curva de abundância utilizando o total de amostras apresentou ajuste ao modelo Logarítmo-Normal, assim como a curva de epifíticas, também apresentando *Meyerozyma guilliermondii* como espécie dominante (Figura 8). Entretanto, quando as comunidades são analisadas tempo a tempo, o padrão observado é o de uma colonização recente, com a observação de uma espécie em T0, e o pequeno aumento na riqueza, ao longo dos tempos, pela inclusão de espécies com menor abundância (Figura 9). Tal padrão apresenta melhor ajuste ao modelo da série geométrica, que prediz uma distribuição menos uniforme das espécies, semelhante a uma reta. Esta distribuição é comum em comunidades em estágios iniciais de sucessão, em que as espécies chegam ao habitat em intervalos de tempos regulares, ocupando frações de nicho remanescentes (MARRUGAN, 2004).

*Meyerozyma guilliermondii* foi a única espécie de levedura isolada do mesocarpo do fruto de macaúba em T0. Mesmo após a deposição dos frutos no solo, esta espécie manteve suas abundâncias relativas acima de 90%, durante todo o período de coleta (Figura 9). Este padrão foi semelhante ao observado para a comunidade epifítica. Ainda que a ampla distribuição dessa espécie na natureza e sua grande plasticidade fisiológica, discutidas anteriormente, sejam importantes fatores que contribuam para sua dominância nas comunidades de leveduras endofíticas e epifíticas, o fato dessa espécie ser encontrada em tão altas abundâncias colonizando superfície e tecidos internos, mesocarpo e epicarpo (Tabela 2), sugere uma forte adaptação de *M. guilliermondii* aos frutos da palmeira macaúba. Como já discutido anteriormente, esta espécie já foi descrita como associada a frutos de macaúba coletados em localidade diferente da avaliada neste trabalho, colonizando mesocarpo e superfície do epicarpo, contudo em menores proporções às descritas neste estudo (FARIA, 2012).

Após o contato do fruto com o solo, outras espécies passaram a compor a comunidade de leveduras endofíticas, contribuindo para o aumento da riqueza, que chega ao seu valor máximo no Tempo 2, quando S é igual a 5 (Figura 9). Considerando que em T0, apenas *M. guilliermondii* fazia parte da composição da comunidade endofítica, é provável que as demais espécies observadas nos tempos de coleta posteriores tenham tido origem no ambiente externo (ISAEVA et al., 2010). Essa hipótese é reforçada pelo isolamento das mesmas espécies a partir da superfície do fruto, como é o caso de 8 das 10 espécies encontradas associadas aos tecidos internos. *Candida* sp. 01, compôs a comunidade epifítica em T1, sendo posteriormente isolada do mesocarpo em T2; *C. (Yamadazyma) conglobata* e *H. opuntiae*, presentes em T2 (endofíticos) já haviam sido isoladas da superfície em T0; e o mesmo pode ser observado para as espécies *P. membranifaciens* (T3), *Saturnispora* sp. (T4), *C. (Ogataea) boidinii* (T5) e *P. kluyveri* (T5). As duas exceções são *C. sttelimalicola* (clado irmão *Starmera*), isolada exclusivamente do mesocarpo do fruto, e *Ogataea* sp., que foi isolada do mesocarpo (T2) antes de ser isolada da superfície do fruto (T4) (Figura 6).

Com exceção de *M. guilliermondii*, as abundâncias relativas das espécies que compõem as comunidades endofíticas, em diversos períodos de coleta, são inferiores a 5% (Figura 9). Estes valores baixos refletem na equitabilidade do sistema, representada pelos valores de índice de Simpson, que variam entre 0 (T0) e 0,17 (T2) (Tabela 7). O maior valor de equitabilidade, em conjunto com o maior número de espécies observadas, fazem da comunidade endofítica associada aos frutos coletados em T2 a mais diversa entre as demais, fato confirmado pelo índice de Shannon apresentado,  $H = 0,38$  (Tabela 7).

O aumento da diversidade das comunidades endofíticas, atingindo o máximo em T2 pode ser explicada pela mudança de condição do fruto no momento que o mesmo é disposto no solo. Como discutido anteriormente, o contato com o solo propicia a ação da microbiota presente neste substrato sobre as estruturas externas do fruto de macaúba, o que pode levar à formação de microfissuras no epicarpo, possibilitando a colonização dos tecidos internos. Este fato contribui para o aumento da riqueza e da abundância total de leveduras na comunidade endofítica. Contudo, após T2 observa-se um declínio nos valores de riqueza e diversidade no sistema (Tabela 7), provavelmente relacionado à colonização dos tecidos do mesocarpo por

outros micro-organismos, como fungos filamentosos e bactérias, aumentando a competição entre os componentes da comunidade endofítica.

Tabela 7: Diversidade das comunidades de leveduras e fungos endofíticos, em função do tempo de deposição dos frutos no solo.

	T0	T1	T2	T3	T4	T5
Riqueza (S)	1	2	5	3	2	3
Abundância total <sup>a</sup>	2,6x10 <sup>7</sup>	1,8x10 <sup>6</sup>	1,9x10 <sup>8</sup>	4,0x10 <sup>6</sup>	2,2x10 <sup>7</sup>	2,0x10 <sup>9</sup>
Dominância (D) <sup>b</sup>	1	0,98	0,83	0,95	0,999	0,92
Simpson (1-D) <sup>c</sup>	0	0,02	0,17	0,05	0,001	0,08
Shannon (H) <sup>d</sup>	0	0,07	0,38	0,13	0,007	0,17

<sup>a</sup>Número de indivíduos totais, em Unidades Formadoras de Colônia (UFC); <sup>b</sup>Dominância (D) → 1 – Índice de Simpson, varia de 0 (taxa em iguais quantidades) a 1 (um táxon domina completamente a comunidade); <sup>c</sup>Índice de Simpson (1 – D), mede equitabilidade da comunidade, de 0 a 1; <sup>d</sup>Índice de Shannon (entropia), índice de diversidade que leva em conta não só o número de táxons, mas também o número de indivíduos. Varia de 0 para comunidades com um único táxon até valores elevados para comunidades com muitos táxons, cada um com alguns indivíduos.

Comparando os valores de diversidade nas comunidades de endofíticos à diversidade nas comunidades de epifíticos, observamos que a primeira é menor, flutuando entre 0,38 (máximo, T2) e 0 (mínimo, T0), bem como a riqueza e os valores de abundância total observados (Tabelas 5 e 7). Diferente do observado para as comunidades epifíticas, o aumento da abundância não ocorreu em função do tempo de deposição do fruto no solo, apresentando oscilações entre um tempo e outro (Tabela 7). Oscilações entre abundâncias de leveduras associadas a frutos em um gradiente de tempo também foram observadas em estudos com o fruto amapá, sendo atribuídas a diversos fatores, entre eles: interações negativas entre os micro-organismos, por meio da produção de substâncias “killer”; mudanças no substrato, seja pela redução de nutrientes de fácil absorção, seja pela disponibilização de outras moléculas por meio da ação enzimática em moléculas complexas; colonização por espécies trazidas por vetores animais, entre outras (MORAIS et al., 1995).

Assim como observado entre as comunidades epifíticas, há variações na composição das comunidades de leveduras endofíticas isoladas em função do tempo de coleta, claramente percebidas ao observarmos os gráficos da Figura 9 e

medidas de diversidade beta de Whittaker (Tabela 8). Pelas medidas de Whittaker, observamos que as diferenças entre as comunidades podem variar de 14%, entre T1 e T2, até 75%, entre T0 e T5. Apesar de a maior diferença ter sido observada entre as comunidades relacionadas ao primeiro e ao último tempo de coleta, assim como observado entre as comunidades epifíticas, diferenças entre tempos próximos nem sempre são menores do que entre tempos distantes. Exemplos disso são as medidas de Whittaker entre T3 e T4 (0,67) e entre T3 e T5 (0,27).

Tabela 8: Tabela de diversidade beta - Medida de Whittaker ( $\beta_W$ )\* (1960) para comunidades endofíticas

	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>
<b>T0</b>	0					
<b>T1</b>	0,50	0				
<b>T2</b>	0,60	0,14	0			
<b>T3</b>	0,60	0,43	0,25	0		
<b>T4</b>	0,33	0,60	0,67	0,67	0	
<b>T5</b>	0,75	0,40	0,27	0,27	0,56	0

\* A medida de Whittaker ( $\beta_W$ ) é obtida pela equação:  $\beta_W = (S/\alpha) - 1$ , em que S = número total de espécies;  $\alpha$  = número médio de espécies.

Assim como observado para as comunidades epifíticas, os valores de riqueza e abundância das comunidades de cada fruto variaram bastante entre si. Em vários frutos, não foi possível detectar a presença de leveduras associadas, enquanto em outros, os valores de abundância apresentados foram altos. Esta característica da amostra é refletida nas taxas de colonização baixa (Tabela 3), apresentada anteriormente. O coeficiente de diferenciação de amostras apresentado pela análise de contribuição particionada de diversidade foi bastante alto, igual a 0,884 (LU et al., 2007) e, tal como para as amostras epifíticas, uma ampliação da amostragem poderia permitir o isolamento de outras espécies ou a obtenção de maior frequência destas nos frutos. Neste caso, além da ampliação do número de frutos, poderia-se pensar no aumento da amostragem dos tecidos do mesmo, mesocarpo e epicarpo. Como discutido anteriormente, os endofíticos, em geral, apresentam padrões de

agregação (SCHULZ e BOYLE, 2005; ISAEVA et al., 2010), o que dificulta a obtenção de amostras representativas.

Todas essas questões afetam os dados de frequência relativa, que para as espécies nas comunidades endofíticas apresentaram valores consideravelmente baixos de T0 a T4 (7,1 a 14,3%), com aumento significativo em T5 (57,1%) (Figura 10). As demais espécies, em geral, apresentaram ocorrências em 1 ou 2 frutos, no máximo (frequências relativas entre 3,6 e 7,1%). As baixas frequências, bem como as baixas abundâncias observadas para estas amostras as tornam mais susceptíveis ao processo de exclusão competitiva.

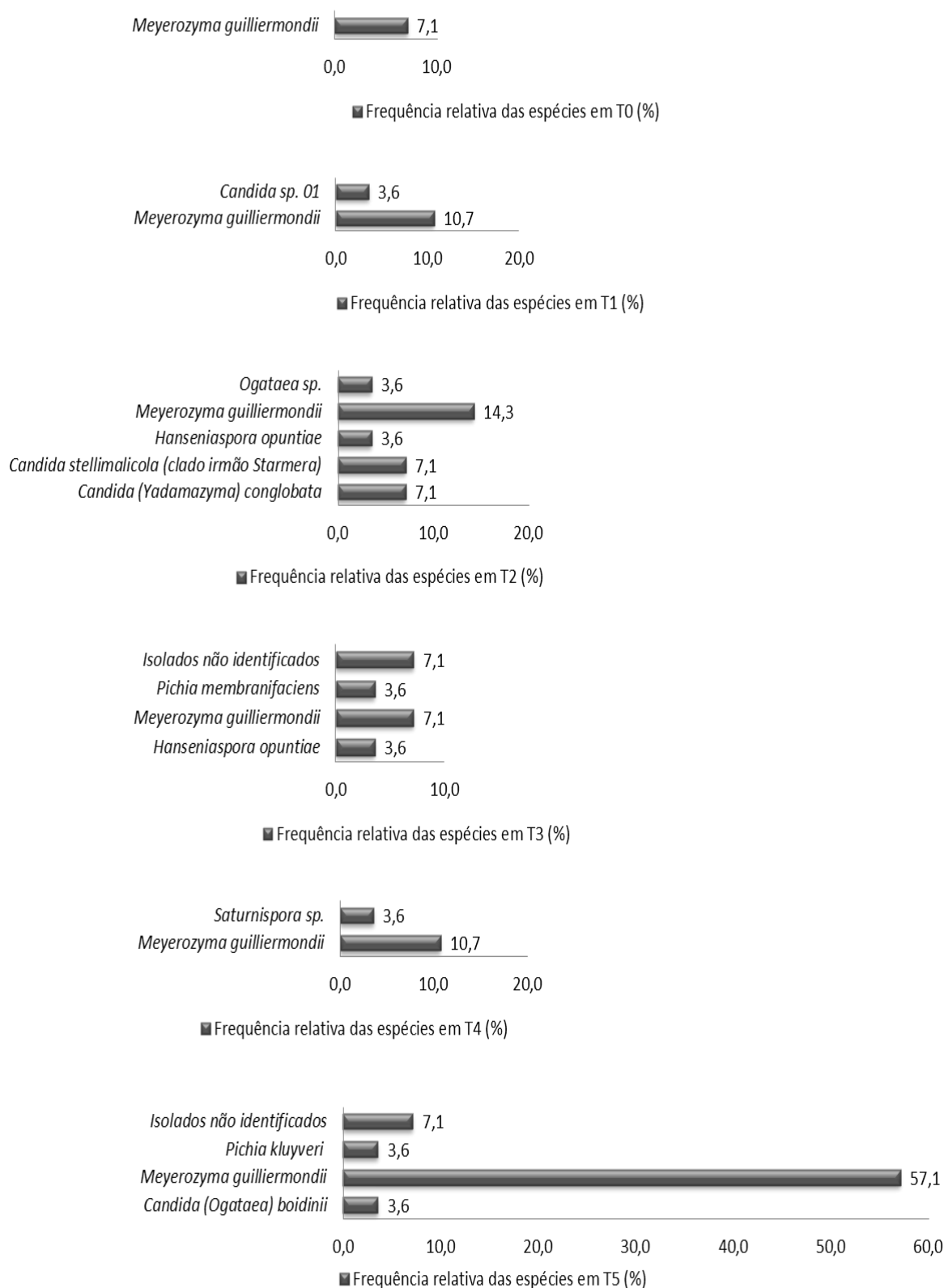


Figura 10: Gráficos de frequência relativa das espécies endofíticas por período de coleta. A frequência relativa de cada espécie foi calculada de acordo com a equação:  $F_i = (J_i/K) \cdot 100$ , em que  $F_i$  é a frequência da espécie  $i$ ;  $J_i$  é o número de frutos nos quais a espécie  $i$  ocorreu e  $K$  é o número total de frutos.

Além do tempo de deposição dos frutos no solo, o efeito de uma segunda variável, a palmeira, foi considerado na análise das variações de riqueza e abundância das comunidades observadas. Para isso, os valores de riqueza e abundância dos frutos foram agrupados em suas respectivas palmeiras de origem, sendo particionados em função do tempo de coleta (Tabelas 9 e 10, respectivamente), e análises utilizando as palmeiras como unidades amostrais foram realizadas. Até então, todas as análises de ecologia realizadas utilizaram o fruto da macaúba como unidade amostral, caracterizando as comunidades de leveduras endofíticas e epifíticas associadas às palmeiras de uma determinada área, no caso, da região de Casa Branca, Brumadinho, MG. Os dados contidos nas Tabelas 9 e 10 foram utilizados para a construção dos gráficos das Figuras 11 e 12, que permitem a comparação visual entre palmeiras e as épocas de coleta distintas.

Tabela 9: Riqueza de espécies epifíticas e endofíticas entre palmeira e tempo.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	<i>Riqueza total*</i>
<b>Epifíticos</b>								
T0	2	9	6	3	2	3	3	16
T1	4	6	2	4	3	2	2	13
T2	2	5	3	2	2	4	5	12
T3	5	6	5	1	4	2	4	12
T4	2	6	4	2	3	5	4	14
T5	1	10	4	9	1	2	1	15
<b><i>Riqueza total</i></b>	8	18	17	13	9	10	11	
<b>Endofíticos</b>								
T0	0	0	0	0	0	0	1	1
T1	0	0	0	0	2	1	1	2
T2	1	0	0	0	2	1	2	5
T3	2	0	1	0	0	1	1	3
T4	0	2	0	0	0	0	1	2
T5	1	3	1	1	1	1	1	3
<b><i>Riqueza total</i></b>	3	4	2	1	3	1	3	

\* Valores apresentados como riqueza total não correspondem ao somatório dos valores apresentados nas linhas/colunas, pois há sobreposição de espécies entre os tempos.

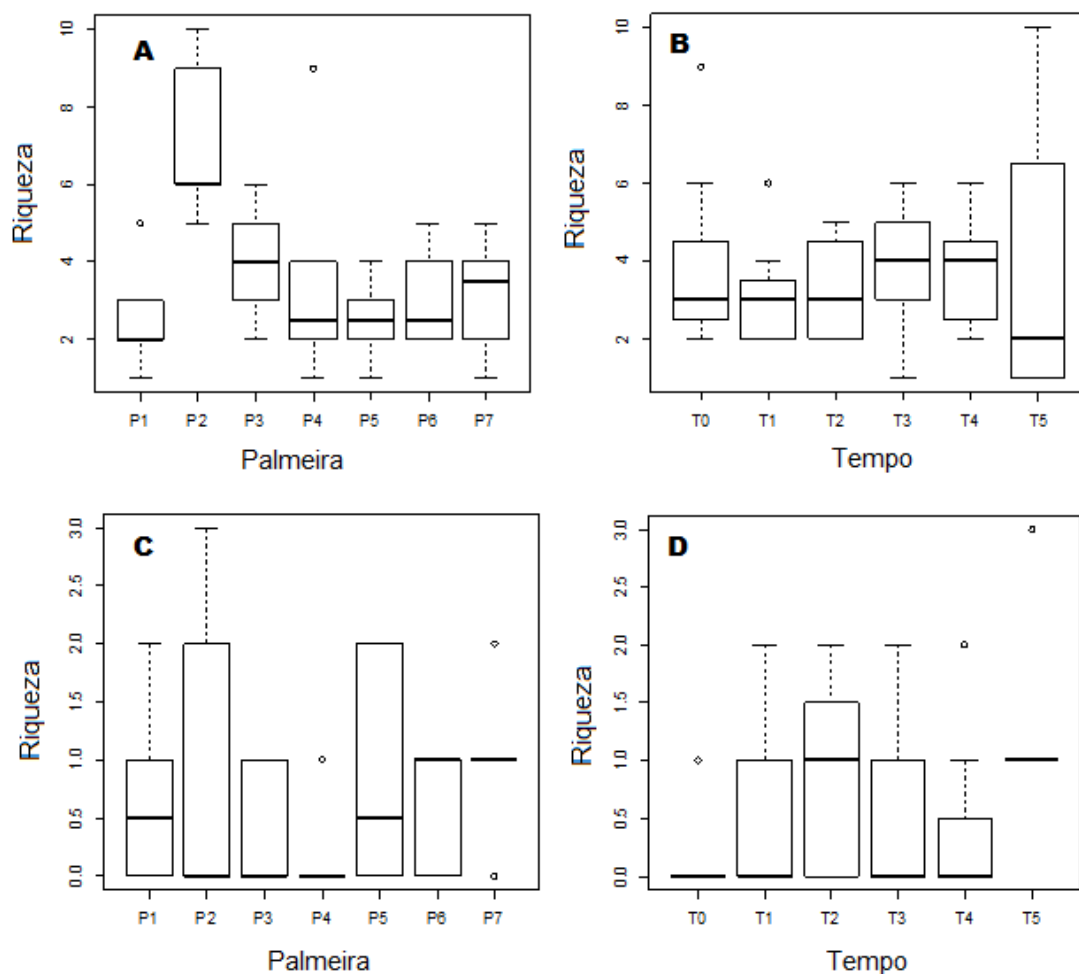


Figura 11: Variação da riqueza de epifíticos (A e B) e endofíticos (C e D) por palmeiras de macaúba, local de coleta dos frutos (P1 – P7) e por tempo de deposição dos frutos no solo (T0 – T5). As linhas grossas nos gráficos representam a mediana, as caixas, o erro padrão, as linhas tracejadas, o desvio padrão e os pontos, valores atípicos (“outliers”).

Para avaliar se as variações de riqueza e abundância foram significativas entre plantas e entre tempos, foram utilizados Modelos Lineares Generalizados (GLMs, MCCULLAGH & NELDER, 1989; AUSTIN et al., 2002). Os resultados dessas análises estatísticas podem ser consultados no Apêndice G.

De modo geral, foi possível observar que a riqueza de epifíticos foi influenciada positivamente pelas palmeiras, ou seja, houve diferença significativa de riqueza entre as plantas ( $P = 0,007$ ), principalmente pela composição de espécies na Palmeira 2 (Tabela 9, Figura 11A). As comunidades de leveduras epifíticas associadas aos frutos desta palmeira, coletados em diferentes períodos de tempo, apresentam maiores valores de riqueza em relação às demais. Enquanto a riqueza das comunidades associadas aos seus frutos variam de 5 a 10 espécies, a riqueza



máxima observada em comunidades das demais palmeiras é de 4 (P5), 5 (P1, P6 e P7), 6 (P3) ou 9 (P4). Também o número total de espécies isoladas desta palmeira é maior,  $S=18$ , aproximando apenas de P3,  $S=17$ . Quando observado o comportamento das comunidades dessa palmeira em função do tempo, percebe-se que há claramente uma redução da riqueza de T0 a T2, com o posterior aumento de T3 a T5. Este comportamento assemelha-se bastante ao observado nas análises utilizando os frutos como unidade amostral, apresentadas anteriormente, mas não é consenso entre a maioria das palmeiras, com exceção de P3.

O comportamento discrepante da palmeira 2, em relação às demais, inclusive à palmeira 1, cuja localidade é compartilhada (Figura 1), não pode ser explicada pelos dados apresentados neste trabalho. Fatores como a idade da planta, estágio de maturação dos frutos, composição inicial da comunidade microbiana e suas características fisiológicas e bioquímicas, comportamento de cada fruto após seu contato com o substrato, e fatores ambientais externos bióticos e abióticos aos quais as amostras foram submetidas durante o período experimental, podem ter contribuído para tais variações.

Não foi possível verificar variações significativas da riqueza de epifíticos em função do tempo, quando utilizamos as palmeiras como unidade amostral (Apêndice G), apesar o gráfico da Figura 11B apresentar desvios altos em T5, sugerindo um aumento da riqueza do sistema neste tempo de coleta. Em geral, o comportamento da riqueza nessas comunidades é oscilante, muito provavelmente em função da diferença de riquezas observadas entre as palmeiras. As variáveis Palmeira e Tempo não explicaram a variação observada na riqueza de endofíticos ( $P > 0,100$ , Tabelas 9, Figura 11 C,D) e o comportamento das amostras apresentou-se diverso entre as palmeiras, com a observação da ausência de espécies em vários momentos, resultado das baixas taxas de colonização dos frutos.

Já a abundância dos epifíticos foi fortemente influenciada pelo tempo ( $P < 0,0001$ , Apêndice G). No gráfico da Figura 12B, pode ser visualizado claramente o aumento da abundância nas comunidades de leveduras em função do tempo de deposição dos frutos nos solo. Este resultado também foi observado pelas análises de ecologia utilizando os frutos como unidade amostral e os fatores que influenciam neste comportamento já foram discutidos anteriormente. Já a variação da abundância de epifíticos entre as palmeiras não foi significativa, em relação aos

valores de abundância analisados ( $P > 0,100$ ), o que pode ser visualizado no gráfico da Figura 12A).

Tabela 10: Abundância de todas as espécies epifíticas e endofíticas por planta e tempo. Todos os valores representados em escala log (LOG X, base10).

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	Abundância total
<b>Epifíticos</b>								
<b>T0</b>	7,0	7,1	7,8	7,4	7,3	6,5	7,0	8,2
<b>T1</b>	7,5	7,2	7,3	7,3	8,0	7,9	7,9	8,6
<b>T2</b>	7,0	8,2	7,7	7,3	8,2	8,5	8,2	8,9
<b>T3</b>	8,5	8,5	7,6	7,5	7,9	8,3	9,0	9,3
<b>T4</b>	7,8	8,9	8,2	8,3	7,6	8,9	8,5	9,4
<b>T5</b>	7,4	9,7	7,6	8,1	9,2	7,7	9,2	9,9
<b>Abundância total</b>	8,0	9,0	8,2	6,8	8,1	8,9	7,8	
<b>Endofíticos</b>								
<b>T0</b>	0	0	0	0	0	0	7,4	7,4
<b>T1</b>	0	0	0	0	5,3	6,1	5,3	6,2
<b>T2</b>	5,8	0	0	0	7,7	8,1	7,2	8,3
<b>T3</b>	6,5	0	4,9	0	0	5,9	0	6,6
<b>T4</b>	0	4,6	0	0	0	0	7,3	7,3
<b>T5</b>	8,0	9,0	8,2	6,7	7,9	8,8	6,5	9,3
<b>Abundância total</b>	8,6	9,8	8,6	8,6	9,3	9,1	9,5	

Do mesmo modo, também não foram significativas as variações abundância de endofíticos entre palmeiras e tempos ( $P > 0,100$ , Apêndice G, Tabela 10). O grande número de “outliers”, representados pelos pontos nos gráficos mostram o comportamento desigual dos dados nesta amostra (Figura 12 C,D).

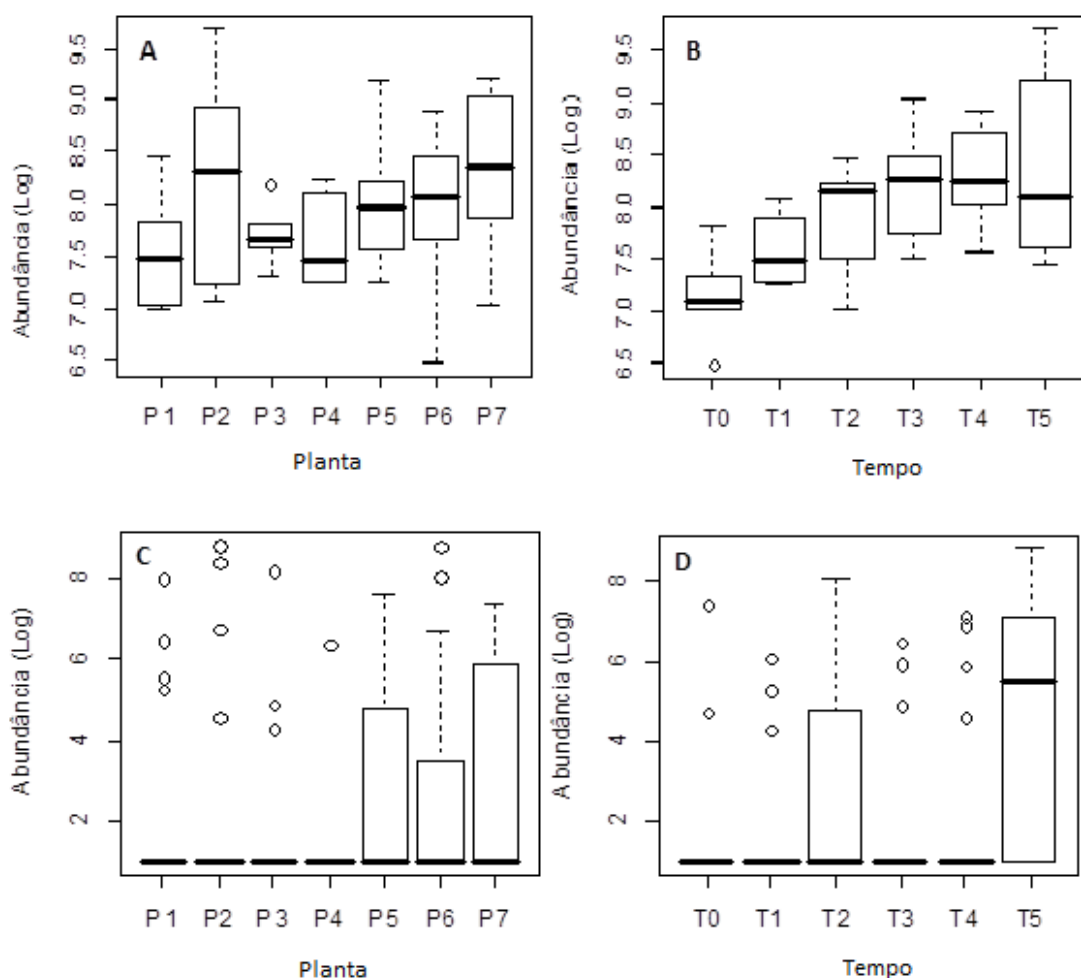


Figura 12: Variação da abundância de epifíticos (A e B) e endofíticos (C e D) por palmeiras de macaúba, local de coleta dos frutos (P1 – P7) e por tempo de deposição dos frutos no solo (T0 – T5). As linhas grossas nos gráficos representam a mediana, as caixas, o erro padrão, as linhas tracejadas, o desvio padrão e os pontos, valores atípicos (“outliers”).

A comparação dos resultados das análises de ecologia realizadas neste estudo com outros trabalhos na literatura nem sempre foi possível, devido à escassez de trabalhos com este enfoque e/ou pela diferente natureza entre o atual estudo e a literatura. Algumas comparações foram feitas com os dados apresentados por Faria (2012), no qual comunidades de leveduras coletadas de frutos com 3 diferentes tempos de exposição no solo foram analisadas, contudo, os resultados apresentaram diferenças significativas discutidas ao longo deste texto, evidenciando que essa microbiota pode variar conforme o ambiente no qual a palmeira se encontra.

Análises ecológicas semelhantes foram utilizadas em um estudo sobre diversidade de fungos em oxicoco (*Vaccinium macrocarpon*) em diferentes estágios de desenvolvimento do ovário (TADYCH et al., 2012). Outro trabalho relevante nessa área é o estudo da sucessão ecológica da comunidade de leveduras em frutos amapá caídos no solo e dos fatores que regulam os processos ecológicos, elaborado por Moraes e colaboradores (1995). Ademais, estudos envolvendo a caracterização de microbiota associada a frutos, em função de um gradiente temporal, foram conduzidos com café (VILELA et al., 2010); morango do Mediterrâneo (SANTO et al., 2012); caqui (HIDALGO et al., 2012) e cacau (GÁLVEZ et al., 2007). Em todos estes trabalhos, a caracterização da microbiota, na maioria dos trabalhos, limita-se à identificação das espécies, muitas vezes comparando métodos cultiváveis aos métodos independentes de cultivo, sua enumeração ao longo do tempo, e, no caso dos trabalhos que analisam processos fermentativos, são realizadas análises físicas e químicas do substrato, cujos resultados são associados à microbiota.

### 5.3 Caracterização do potencial de produção de enzimas hidrolíticas

Foram realizados ensaios qualitativos em meio sólido para verificação do potencial de produção das enzimas hidrolíticas extracelulares celulases, amilases, pectinases, xilanases, lipases e proteinases pelas leveduras isoladas. Para estes ensaios, foram utilizados 241 isolados, destes 30 endofíticos e 211 epifíticos. Resultados positivos foram evidenciados pela produção de halos translúcidos no entorno das colônias crescidas em meios específicos para cada enzima (Figura 13).

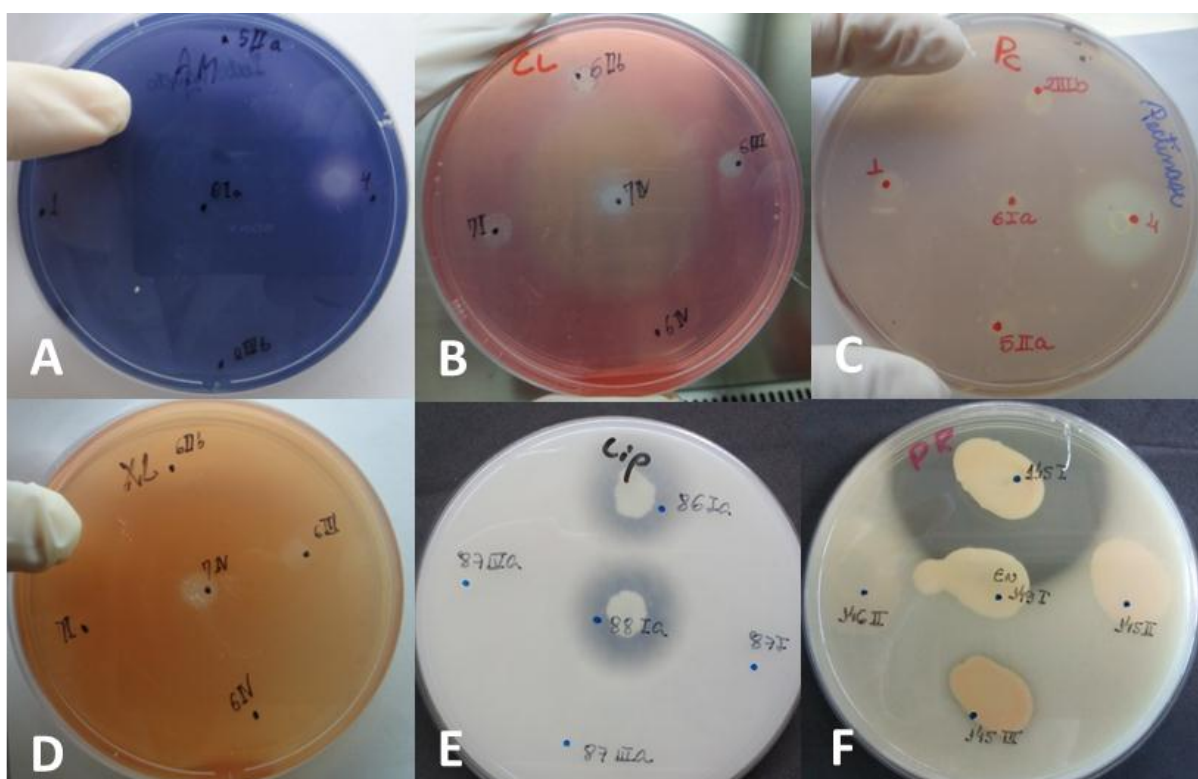


Figura 13: Fotografias de testes para ação de enzimas e halos evidenciando a atividade para: A – Amilase; B – Celulase; C- Pectinase; D – Xilanase; E – Lipase; F – Proteinase.

As Tabelas 11-14 listam isolados de leveduras que apresentaram índices enzimáticos superiores a 1,0 nos testes qualitativos de avaliação da produção das exocarbohidrases. Contudo, durante a realização dos testes, na etapa de revelação dos halos, a solução adicionada para revelação promoveu a lavagem das células componentes da colônia crescida sobre o meio sólido, evidenciando a formação de halos sob algumas colônias. Estes halos, por terem o mesmo diâmetro da sua

respectiva colônia, possuem índice enzimático igual a 1,0. Isolados que apresentaram este comportamento encontram-se listados na Tabela 13.

Entre os isolados com atividade para exocarbohidrases, 16 (6,6%) apresentaram atividade amilolítica (Tabela 11), 29 (12%) apresentaram atividade celulolítica (Tabela 12), 19 (7,9%) apresentaram atividade pectinolítica (Tabela 13) e 3 (1,2%) apresentaram atividade xilanolítica (Tabela 14). Todos estes isolados foram obtidos a partir da superfície do fruto.

Um total de 207 isolados apresentou a capacidade de produzir halos sob suas colônias (IE igual a 1,0), dos quais 95 (39,4%) foram positivos para amilase, 34 (14,1%) para celulase, 47 (19,5%) para pectinase e 31 (12,8%) para xilanase (Tabela 15). Entre estes isolados, foi observada uma pequena parcela de endofíticos, variando de 10 a 3 endofíticos por enzima, incluindo um endofítico de epicarpo (ENC46), todos pertencentes à espécie *Meyerozyma guilliermondii* e ao gênero *Candida*.

Isolados com atividade para proteinase constituem 5,4% do total testado (13 isolados), sendo 1 isolado de origem endofítica, da espécie *Candida stellimalicola* (Tabela 16). Um total de 16 (6,6%) isolados apresentaram resultado positivo para lipases, todos de origem epifítica (Tabela 17). Os gêneros e espécies aos quais os isolados positivos pertencem constam nas tabelas a seguir.

Tabela 11: Isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de avaliação do potencial de produção de amilases extracelulares, evidenciando diâmetro da colônia, do halo de degradação e respectivos índices enzimáticos.

Espécie	Origem do isolado	Isolado	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro da colônia + halo (cm)	Índice Enzimático <sup>a</sup>
<i>Bandoniozyma complexa</i>	Epifítico	13IV	0,5 ± 0,0	1,2 ± 0,0	2,2 ± 0,3
	Epifítico	129III	0,6 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,6 ± 0,1
	Epifítico	64Ia	0,7 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,4 ± 0,1
<i>Eballistra oryzae</i>	Epifítico	21I	0,6 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,5 ± 0,0
<i>Fellomyces polyborus</i>	Epifítico	4	0,6 ± 0,0	1,2 ± 0,2	2,1 ± 0,3
	Epifítico	105II	0,6 ± 0,1	1,7 ± 0,2	2,9 ± 0,7
	Epifítico	13IIIb	0,6 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,8 ± 0,2
<i>Hannaella luteola</i>	Epifítico	80II	0,7 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,9 ± 0,0
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	Epifítico	102II	0,7 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,8 ± 0,1
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Epifítico	145I	0,8 ± 0,0	3,2 ± 0,2	4,0 ± 0,2
	Epifítico	67IIa	1,3 ± 0,0	1,5 ± 0,0	1,2 ± 0,0
	Epifítico	13Ia	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,1 ± 0,1
	Epifítico	18I	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	1,1 ± 0,1
	Epifítico	145II	0,7 ± 0,0	1,7 ± 0,2	2,4 ± 0,4
<i>Rhodotorula</i> sp.	Epifítico	145II	0,7 ± 0,0	1,7 ± 0,2	2,4 ± 0,4
<i>Sarocladium strictum</i>	Epifítico	119II	0,8 ± 0,0	2,5 ± 0,0	3,1 ± 0,0
<i>Ustilago</i> sp.	Epifítico	35III	0,8 ± 0,0	3,3 ± 0,2	4,3 ± 0,5

<sup>a</sup>Índice enzimático (IE): razão entre o halo de degradação e o diâmetro da colônia. Foram considerados apenas isolados que apresentaram IE maior que 1,0.

Tabela 12: Isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de avaliação do potencial de produção de celulases extracelulares, evidenciando diâmetro da colônia, do halo de degradação e respectivos índices enzimáticos.

<b>Espécie</b>	<b>Origem do isolado</b>	<b>Isolado</b>	<b>Diâmetro da colônia (cm)</b>	<b>Diâmetro da colônia + halo (cm)</b>	<b>Índice Enzimático<sup>a</sup></b>
<i>Bandoniozyma complexa</i>	Epifítico	64Ia	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,2
<i>Bulleromyces nemorosus</i>	Epifítico	7IV	0,6 ± 0,0	4,4 ± 0,1	7,3 ± 0,1
<i>Candida (Yadamazyma) conglobata</i>	Epifítico	11Ia	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,2 ± 0,0
<i>Fellomyces polyborus</i>	Epifítico	4	0,5 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,3 ± 0,1
	Epifítico	13IIIb	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	1,1 ± 0,0
<i>Hannaella luteola</i>	Epifítico	38II	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,0	1,4 ± 0,2
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	Epifítico	102II	0,6 ± 0,0	1,8 ± 0,0	3,0 ± 0,0
	Epifítico	7V	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Epifítico	12Ia	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,2 ± 0,0
<i>Metschnikowia</i> sp.	Epifítico	11III	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,2 ± 0,0
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Epifítico	6Ia	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,0	1,3 ± 0,5
	Epifítico	9IIa	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,2 ± 0,0
	Epifítico	11V	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,2 ± 0,1
	Epifítico	16IIrec	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,1 ± 0,0
	Epifítico	75Ib	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,0	1,1 ± 0,1
	Epifítico	8III	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,1 ± 0,1
	Epifítico	2IIIb	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,1 ± 0,1
	Epifítico	67IIa	1,2 ± 0,0	2,4 ± 0,1	2,0 ± 0,1
	Epifítico	8V	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,2 ± 0,1
	Epifítico	16I	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,2 ± 0,1
Epifítico	13Ia	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,2 ± 0,1	
Epifítico	5IIa	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,1 ± 0,1	
Epifítico	10	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,1 ± 0,1	
Epifítico	18I	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,0	1,1 ± 0,1	



Tabela 12: continuação.

<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (cont.)	Epifítico	17IVa	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,1 ± 0,0
	Epifítico	1	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,1 ± 0,1
	Epifítico	9Ia	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,1 ± 0,1
<i>Sarocladium strictum</i>	Epifítico	119II	2,8 ± 0,0	3,1 ± 0,1	1,1 ± 0,0
<i>Ustilago</i> sp.	Epifítico	35III	0,6 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,7 ± 0,0

<sup>a</sup>Índice enzimático (IE): razão entre o halo de degradação e o diâmetro da colônia, Foram considerados apenas isolados que apresentaram IE maior que 1,0.

Tabela 13: Isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de avaliação do potencial de produção de pectinases extracelulares, evidenciando diâmetro da colônia, do halo de degradação e respectivos índices enzimáticos.

Espécie	Origem do isolado	Isolado	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro da colônia + halo (cm)	Índice Enzimático <sup>a</sup>
<i>Bandoniozyma complexa</i>	Epifítico	64Ia	0,5 ± 0,0	1,2 ± 0,0	2,4 ± 0,0
	Epifítico	13IV	0,5 ± 0,0	1,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0
	Epifítico	129III	0,6 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,9 ± 0,1
<i>Candida (Yadamazyma) conglobata</i>	Epifítico	11Ia	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	1,1 ± 0,1
<i>Candida sorboxylosa</i>	Epifítico	11IV	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,3 ± 0,2
<i>Eballistra oryzae</i>	Epifítico	21I	0,6 ± 0,0	1,7 ± 0,0	2,8 ± 0,0
<i>Fellomyces polyborus</i>	Epifítico	4	0,6 ± 0,0	1,8 ± 0,0	3,3 ± 0,3
	Epifítico	105II	0,6 ± 0,1	2,5 ± 0,0	4,3 ± 0,7
	Epifítico	13IIb	0,6 ± 0,0	2,0 ± 0,0	3,6 ± 0,3
	Epifítico	126II	0,5 ± 0,0	0,9 ± 0,1	1,9 ± 0,2
	Epifítico	14IIa	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,1 ± 0,1
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	Epifítico	102II	0,5 ± 0,0	1,4 ± 0,4	2,6 ± 0,6
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Epifítico	97III	0,6 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,8 ± 0,0

Tabela 13: continuação.

<i>Metschnikowia</i> sp.	Epifítico	11III	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	1,2 ± 0,1
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Epifítico	16I	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,1 ± 0,1
	Epifítico	13Ia	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,0	1,1 ± 0,1
	Epifítico	19IIb	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,1 ± 0,1
	Epifítico	35III	0,6 ± 0,0	1,9 ± 0,0	3,2 ± 0,0
<i>Ustilago</i> sp.	Epifítico	35III	0,6 ± 0,0	1,9 ± 0,0	3,2 ± 0,0
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Epifítico	100IIIa	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,8 ± 0,2

<sup>a</sup>Índice enzimático (IE): razão entre o halo de degradação e o diâmetro da colônia, Foram considerados apenas isolados que apresentaram IE maior que 1,0.

Tabela 14: Isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de avaliação do potencial de produção de xilanases extracelulares, evidenciando diâmetro da colônia, do halo de degradação e respectivos índices enzimáticos.

<b>Espécie</b>	<b>Origem do isolado</b>	<b>Isolado</b>	<b>Diâmetro da colônia (cm)</b>	<b>Diâmetro da colônia + halo (cm)</b>	<b>Índice Enzimático<sup>a</sup></b>
<i>Bandoniozyma complexa</i>	Epifítico	129III	0,7 ± 0,0	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1
<i>Bulleromyces nemorosus</i>	Epifítico	7IV	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,0	1,1 ± 0,1
<i>Rhodotorula oryzae</i>	Epifítico	6III	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,1 ± 0,1

<sup>a</sup>Índice enzimático (IE): razão entre o halo de degradação e o diâmetro da colônia, Foram considerados apenas isolados que apresentaram IE maior que 1,0.

Tabela 15: Isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de avaliação do potencial de produção de exocarbo-hidrases, apresentando índices enzimáticos iguais a 1,0.

Espécies	Isolados			
	Amilase	Celulase	Pectinase	Xilanase
<i>Bandoniozyma complexa</i>	-	13IV, 129III	-	13IV, 64Ia
<i>Candida (Saccharomycopsis) amapae</i>	88II	116IVa	-	-
<i>Candida asiatica</i>	-	7II	-	-
<i>Candida (Ogataea) boidinii</i>	29IIIa, 31II, 31IV	-	29IIIa, 31II, 31IV	-
<i>Candida (Pichia) californica</i>	84III	-	-	-
<i>Candida (Meyerozyma) carpophila</i>	25Ia	-	25Ia	-
<i>Candida (Yadamazyma) conglobata</i>	11Ia, EN53Ia	6IIb	57IIa, EN53Ia	-
<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	86Ia, 87I, 141IVa	-	-	-
<i>Candida (Kurtzmaniella) natalensis</i>	89III	-	-	-
<i>Candida sorboxylosa</i>	11IV, 25II, 57IIIa, 87IVa, 90IIa	81IIa, 25II	25II, 57IIIa	-
<i>Candida</i> sp. 01	23I, EN44, ENC46	-	23I, EN44	23I
<i>Candida (Yamadazyma) tallmaniae</i>	-	-	-	141Ib
<i>Candida</i> sp. 02	89Ia	-	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp. 02	-	130II	-	130II
<i>Cryptococcus</i> sp. 01	-	74II, 61II	-	-
<i>Eballistra oryzae</i>	-	21I	-	-
<i>Fellomyces polyborus</i>	14IIa	-	-	4, 13IIb
<i>Hannaella luteola</i>	38II	80II	38II	80II
<i>Hanseniaspora clermontiae</i>	-	75IIa	-	-

Tabela 15: continuação.

<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	30IIa, 38IIIa, 40III	134IIIa, 150IVb	30IIa, 38IIIa, 40III	102II
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	97III	-	29IIb	150II
<i>Metschnikowia</i> sp.	11III	-	-	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	2I, 8II, 8III, 8V, 9Ia, 10, 9IIa, 11V, 16I, 16IIrec, 17IVa, 19Ia, 19IIb, 23IIb, 29Ia, 35Ib, 35IIa, 38Ia, 41Ia, 46Ia, EN47I, EN49Ia, 51Ia, 57Ia, 59Ia, 59IVa, 61Ia, EN69Ia, 71Ia, 73Ia, EN75Ib, 75Ib, 81Ib, 138II, 77Ia, EN77I, EN81IIa, 88Ia, 90Ia, 92Ia, 93Ia, 97I, EN102, 107I, 125I	18II, 19Ia, 81Ib, 138II, 7I, 19IIb, EN75Ib, 77Ia, EN77I, EN81Ia, EN81IIa, 97I, 130I, 133I, 145I, 149I	2I, 11V, 16IIrec, 19Ia, 23IIb, 8II, 17IVa, 29Ia, 35Ib, 35IIa, 38Ia, 41Ia, 51Ia, 57Ia, 59IVa, 61Ia, 69Ia, 71Ia, 73Ia	81Ib, EN166Ia, EN168Ia, ENC168, 13Ia, 73Ia, 77Ia, EN81IIa, EN102, 145I 149I, EN149I, 165
<i>Occultifur externus</i>	-	-	-	129IIa, 145III
<i>Pichia kluyveri</i>	57IVa	-	57IVa	-
<i>Pichia kudriavzevii</i>	40IIa, 44IIa	-	44IIa	-
<i>Pichia membranifaciens</i>	5I, 11II, 18III, 51IIIa, 73II, 75IIIa, 76IIa, EN81III, 81IVa, 82III, 83IIb, 84IIb, 87IIIa	11II, 76IIa	5I, 11II, 18III, 51IIIa, 73II	-
<i>Rhodotorula dairenensis</i>	69II, 31V	-	69II, 71IIa, 31V	69II, 71IIa
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	44IIIa	-	-	-
<i>Rhodotorula oryzae</i>	-	6III	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp.	-	-	-	145II
<i>Sarocladium strictum</i>	-	-	-	119II
<i>Saturnispora</i> sp.	8IV, 25III, 32III	-	8IV, 25III, 32III	-
<i>Ustilago</i> sp.	-	-	-	35III
<i>Zygoascus hellenicus</i>	-	-	-	142Vb

Tabela 16: Isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de avaliação do potencial de produção de proteinases extracelulares, evidenciando diâmetro da colônia, do halo de degradação e respectivos índices enzimáticos.

<b>Espécie</b>	<b>Origem do isolado</b>	<b>Isolado</b>	<b>Diâmetro da colônia (cm)</b>	<b>Diâmetro da colônia + halo (cm)</b>	<b>Índice Enzimático<sup>a</sup></b>
<i>Candida (Yadamazyma) conglobata</i>	Epifítico	127IIa	1,4 ± 0,0	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,0
<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	Epifítico	141IVa	1,4 ± 0,0	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,0
	Epifítico	164IIa	1,8 ± 0,2	2,1 ± 0,2	1,2 ± 0,0
	Epifítico	150III	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,0	1,1 ± 0,0
<i>Candida stellimalicola (clado irmão Starmera)</i>	Endofítico	105Ia	2,2 ± 0,8	2,5 ± 0,7	1,2 ± 0,1
<i>Eballistra oryzae</i>	Epifítico	21I	1,6 ± 0,2	4,6 ± 0,1	3,0 ± 0,2
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Epifítico	145I	2,0 ± 0,1	4,9 ± 0,1	2,4 ± 0,2
	Epifítico	67IIa	2,1 ± 0,1	2,6 ± 0,1	1,3 ± 0,0
<i>Occultifur externus</i>	Epifítico	145III	1,8 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,1 ± 0,0
	Epifítico	129IIa	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,1 ± 0,0
<i>Ogataea sp.</i>	Epifítico	118II	1,3 ± 0,0	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1
<i>Sarocladium strictum</i>	Epifítico	119II	2,5 ± 0,2	2,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1
<i>Ustilago sp.</i>	Epifítico	35III	2,8 ± 0,4	4,7 ± 0,3	1,7 ± 0,2

<sup>a</sup>Índice enzimático (IE): razão entre o halo de degradação e o diâmetro da colônia, Foram considerados apenas isolados que apresentaram IE maior que 1,0.

Tabela 17: Isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de avaliação do potencial de produção de lipases extracelulares, evidenciando diâmetro da colônia, do halo de degradação e respectivos índices enzimáticos.

<b>Espécie</b>	<b>Origem do isolado</b>	<b>Isolado</b>	<b>Diâmetro da colônia (cm)</b>	<b>Diâmetro da colônia + halo (cm)</b>	<b>Índice Enzimático<sup>a</sup></b>
<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	Epifítico	141IVa	1,1 ± 0,0	3,5 ± 0,4	3,3 ± 0,3
	Epifítico	86Ia	0,8 ± 0,0	2,1 ± 0,3	2,6 ± 0,3
	Epifítico	164IIa	0,9 ± 0,0	3,7 ± 0,2	4,1 ± 0,3
	Epifítico	115Va	0,9 ± 0,1	3,5 ± 0,0	4,0 ± 0,4
	Epifítico	112II	0,6 ± 0,1	2,3 ± 0,3	3,8 ± 0,2
	Epifítico	114IIIa	0,9 ± 0,0	3,3 ± 0,5	3,6 ± 0,3
	Epifítico	112III	0,6 ± 0,0	1,6 ± 0,4	2,9 ± 1,0
	Epifítico	114IIb	0,6 ± 0,0	2,2 ± 0,2	3,4 ± 0,1
	Epifítico	150III	1,1 ± 0,0	3,2 ± 0,2	3,0 ± 0,4
	Epifítico	115IIIa	0,5 ± 0,0	1,6 ± 0,0	3,4 ± 0,0
	Epifítico	143IIb	0,7 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,6 ± 0,1
<i>Candida (Yamadazyma) tallmaniae</i>	Epifítico	141Ib	0,7 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,3 ± 0,0
	Epifítico	113I	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1
<i>Fellomyces polyborus</i>	Epifítico	14IIa	0,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1	2,1 ± 0,2
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Epifítico	88Ia	0,8 ± 0,0	2,6 ± 0,1	3,2 ± 0,1
<i>Sarocladium strictum</i>	Epifítico	119II	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,0

<sup>a</sup>Índice enzimático (IE): razão entre o halo de degradação e o diâmetro da colônia, Foram considerados apenas isolados que apresentaram IE maior que 1,0.

Nos ensaios enzimáticos qualitativos, isolados de diferentes espécies de levedura e fungos leveduriformes apresentaram resultados positivos para produção de exoenzimas hidrolíticas, bem como isolados de uma mesma espécie apresentaram potenciais diferenciados de produção das enzimas testadas, evidenciando plasticidade fisiológica intra e interespecífica. Esta plasticidade foi observada em outros trabalhos, como a caracterização de leveduras isoladas de vários ambientes de florestas tropicais brasileiras para a produção de exoenzimas (BUZZINI & MARTINI, 2002), caracterização de leveduras associadas a frutas tropicais brasileiras (BRAGA et al., 1998; TRINDADE et al., 2002). Além disso, alguns autores afirmam não ter observado correlação específica entre o perfil enzimático de amostras individuais e a sua fonte / localidade de isolamento (BRAGA et al., 1998; TRINDADE et al., 2002).

A proporção de isolados que apresentaram atividades enzimáticas foi baixa, entre 1,2 a 12%. No caso das carbohidrases isso poderia ser justificado pelo fato de que as moléculas utilizadas para avaliação da produção enzimática, carboximetilcelulose, pectina, amido e xilana, não foram usadas como indutoras e sim como fonte exclusiva de carbono, oferecendo maior dificuldade ao crescimento inicial das leveduras. Contudo, no caso de lipases e proteinases, foram usados meios complexos acrescidos de indutores.

A proporção de isolados produtores de carbohidrases aumenta quando levamos em conta os isolados com índices enzimáticos iguais a 1,0 (Tabela 15). Este resultado sugere que estes isolados produzem carbohidrases que, ou não apresentam uma taxa de difusão alta no meio, ou estão ligadas à célula (enzimas citossólicas ou ligadas à parede celular) (TONOMURA & TANABE, 1964; AGUILAR & HUITRÓN, 1993; SKORY & FREER, 1995; PÉREZ-DE MOURA et al., 2013; YAN & WU, 2013). Os estudos envolvendo enzimas ligadas à célula em fungos são escassos (PÉREZ-DE-MORA et al., 2013), contudo, estas enzimas podem oferecer vantagens em relação às enzimas secretadas. Para o micro-organismo, pode significar uma maior produtividade, em virtude de uma menor taxa de difusão dos produtos da catálise e, portanto, menor competição com os demais membros da comunidade por estas moléculas (PÉREZ-DE-MORA et al., 2013). Para sua aplicação biotecnológica, pode significar redução dos custos do processo: enquanto ligadas às células, a atividade enzimática é mantida durante o período de vida da

levedura, aumentando o tempo de atividade em relação às enzimas secretadas no meio; o reuso das leveduras permite o reuso das enzimas, sem a necessidade de custos adicionais com adição das enzimas secretadas; e a separação do produto da reação e do catalisador é facilitada (revisado por HASUNUMA & KONDO, 2012). Por estes motivos, tem sido empregados esforços na construção de micro-organismos com complexos enzimáticos expressos na superfície da célula, usados como verdadeiras fábricas enzimáticas (HASUNUMA & KONDO, 2012; MATANO et al, 2012).

A ausência de atividade detectada nos ensaios em meio sólido, em geral, pode ser atribuída à incapacidade de secreção da enzima pelo isolado, ao direcionamento da produção ao metabolismo intracelular, como já discutido, ou à insuficiência dos métodos de detecção, como por exemplo, a utilização de condições de pH, temperatura e fatores nutricionais específicos que não são suficientes para abranger as condições de atividade de todas as enzimas (SILVA, 2011). Somado a estas questões, a difusão da enzima e, conseqüentemente, o tamanho do halo hidrolítico são influenciados pela massa molecular que a enzima possui, que pode impedi-la de difundir pelo ágar e dessa forma, a atividade pode ser considerada inexistente ou baixa (SILVA, 2011). Por este motivo, os dados dos IE foram utilizados com cautela, assumindo neste trabalho apenas o apontamento das potenciais atividades de cada isolado e das espécies às quais pertencem. A utilização de testes quantitativos faz-se necessária para avaliar o real potencial de produção enzimática por estes micro-organismos e para avaliar a atividade das enzimas isoladas, de modo a verificar a possibilidade de aplicações industriais.

Entre os fungos isolados juntamente com as leveduras, ambos apresentaram atividade de amilase e proteinase, enquanto *Sarocladium strictum* foi positivo também para celulase e lipase, e *Eballistra oryzae*, para pectinase. Atividades celulolíticas (GOLDBECK et al., 2013), amilolíticas (ABDEL-SATER & ISMAIL, 1993) e lipolíticas (OKEKE & OKOLO, 1990) já foram descritas para *Sarocladium strictum*. Em nossa pesquisa, não foram encontrados estudos relacionados a enzimas produzidas por *Eballistra oryzae*. Considerando a ecologia dessa levedura, é provável que seja produtora de enzimas relacionadas à degradação de moléculas constituintes da célula vegetal. O pequeno número de pesquisas relacionadas a esta espécie, descrita desde 1914 sob o nome de *Entyloma oryzae*, pode ser devido ao



fato de que a doença causada por este fungo não tem tido grandes impactos econômicos nos seus locais de ocorrência (MycoBank, 2014).

Entre os basidiomicetos, isolados de todas as espécies, com exceção de *Cryptococcus* sp. 01 e 02, *Rhodotorula dairenensis* e *Rhodotorula mucilaginosa*, apresentaram resultado positivo para pelo menos uma das exoenzimas avaliadas. Isolados da espécie *Bandoniozyma complexa* apresentaram atividades diferenciadas para todas as exocarbohidrases, sendo que índices enzimáticos maiores ou iguais a dois foram observados para as enzimas amilase e pectinase. Tendo em vista a recente descrição desta espécie (VALENTE et al., 2012), pouco ainda se sabe sobre suas características fisiológicas. Apesar de estudos quantitativos serem desejáveis para melhor avaliar o potencial de produção de exocarbohidrases por *Bandoniozyma complexa*, os resultados obtidos com os isolados de macaúba sinalizam a possibilidade de uso biotecnológico de isolados da espécie.

Isolados de *Fellomyces polyborus* e *Ustilago* sp. apresentaram atividade de celulase, amilase e pectinase, com altos índices enzimáticos para as duas últimas enzimas (IE entre 3 e 4,3), diferenciando-se nas atividades de lipase, positiva para *Fellomyces*, e proteinase, positiva para *Ustilago*. Entre os isolados de *F. polyborus*, apenas o isolado 14IIa apresentou resultado positivo para lipase, enquanto um dos isolados, 98II, não apresentou atividade enzimática. Atividades pectinolíticas foram descritas para isolados de *Fellomyces* obtidos a partir de umbu (TRINDADE et al., 2002) e de *Ustilago* (BIELY & SLÁVIKOVÁ, 1994). Atividades amilolíticas foram descritas para *Fellomyces* sp., isolada de folhas de bromélias (LANDELL, 2006). O isolado de *Wickerhamomyces anomalus* apresentou atividade pectinolítica, relatada também para isolados da mesma espécie, obtidos a partir de água de degelo da região Antártica (CARRASCO et al., 2012), frutos de macaúba (FARIA, 2012), lulo peludo, fruto tropical encontrado no Brasil (DA SILVA et al., 2005), e café (MASOUD & JERSPERSEN, 2006).

Atividades amilolíticas e celulolíticas de *Hannaela luteola*, observada entre os isolados de macaúba já foram descritas para leveduras isoladas de ambientes diversos de florestas tropicais brasileiras (BUZZINI & MARTINI, 2002). Produção de amilase também foi descrita para vários isolados do gênero *Rhodotorula* (LANDELL, 2006; MAUTONE, 2008; BRANDÃO et al., 2011). O isolado de *Bulleromyces (Cryptococcus) nemorosus* apresentou atividade para celulase, com elevado IE

(7,3), e para xilanase, enquanto *Rhodotorula oryzae* e *Occultifur externus* apresentaram atividade para xilanase e proteinase, respectivamente. Como já discutido, estas espécies apresentam poucos isolados descritos na literatura, sendo estes os primeiros registros de produção enzimática, segundo nossas pesquisas. Produção de endo- $\beta$ -1,4-glucanase foram relatadas para *Rhodotorula oryzae* (CHI et al., 2009) e atividades celulolíticas e xilanolíticas já foram descritas para outras espécies de *Cryptococcus* (BIELY & PETRAKOVA, 1984; IEFUJI et al., 1996; THONGEKKAEW et al., 2008, 2012; BRANDÃO et al., 2011).

Entre os ascomicetos, várias espécies apresentaram resultados negativos para os testes de avaliação do potencial de produção de exoenzimas, entre elas *Candida (Kurtzmaniella) natalensis*, *C. (Meyerozyma) carpophila*, *C. (Ogataea) boidinii*, *C. (Pichia) californica*, *C. (Saccharomyopsis) amapae*, *Candida asiatica*, *Candida* sp. 01, *Candida* sp. 02, *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia membranifaciens*, *Saturnispora* sp. e *Zygoascus hellenicus*. A literatura, no entanto, traz relatos de atividades enzimáticas diversas para isolados de algumas dessas espécies (BAUTISTA-GALLEGO et al., 2011; SILVA, 2011; RODRIGUEZ-GOMEZ et al., 2010; BRAGA et al., 1998), reforçando a variabilidade fisiológica intra-específica observada.

Dos 22 isolados de *Hanseniaspora opuntiae* testados, apenas dois apresentaram atividade enzimática. O isolado 102II apresentou altos índices enzimáticos para amilase, celulase e pectinase, enquanto o isolado 7V apresentou discreto índice enzimático para celulase. Entre os 8 isolados de *Hanseniaspora uvarum*, também apenas 2 apresentaram atividades discretas para celulase (12Ia) e pectinase (97III). Atividades pectinolítica e celulolítica já foram descritas para *Hanseniaspora uvarum* (MASOUD e JERSPERSEN, 2006; BRANDÃO et al., 2011), contudo, não foram encontrados registros das atividades enzimáticas supracitadas em *Hanseniaspora opuntiae*.

Isolados dos gêneros *Ogataea* e *Metschnikowia*, apresentaram atividade para proteinase e para celulase e pectinase, respectivamente. Atividades pectinolíticas e lipídicas foram demonstradas para amostras de *Metschnikowia* sp. isoladas de solo da região Antártica (CARRASCO et al., 2012) e de pitanga e mangaba (TRINDADE et al., 2002).

Dos 84 isolados de *Meyerozyma guilliermondii* testados, 20 apresentaram atividade positiva para pelo menos uma das enzimas testadas (exceto xilanase), sendo que a maioria foi positiva para celulase. Índices enzimáticos elevados foram obtidos para amilase (145l e 13la, IE entre 4 e 5), lipase (88la, IE igual a 3,1) e proteinase (145l, IE igual a 2,4). Atividades para estas enzimas já foram descritas para leveduras desta espécie isoladas de frutos de macaúba (FARIA, 2012), de amostras naturais, entre água, solo, insetos e plantas de florestas tropicais brasileiras (BUZZINI & MARTINI, 2002), da superfície de troncos e frutos de uma reserva florestal na Tailândia (THONGEKKAEW et al., 2012) e de ambientes marinhos (WANG et al., 2007) e gélidos (DUARTE et al., 2013).

As atividades enzimáticas em geral foram pontuais e discretas, com resultados positivos para isolados de *C. (Yadamazyma) conglobata* e *C. sorboxylosa*, com atividade para celulase e pectinase; *C. (Yadamazyma) conglobata*, *C. (Ogataea) cylindracea* e *C. stellimalicola* (clado irmão *Starmera*), com atividade para proteinase; e *C. (Ogataea) cylindracea*, *C. (Yamadazyma) tallmaniae* e *Candida* sp. 03, com atividade para lipase. Não foram encontrados registros anteriores das referidas atividades enzimáticas para as espécies citadas. Uma exceção foi a espécie *C. (Ogataea) cylindracea*, a qual 10 dos 11 isolados testados apresentaram altos índices enzimáticos para o teste de lipase. Esta espécie tem atraído grande interesse devido à habilidade de produção de lipases que possuem numerosas aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica, de pesticidas, entre outras (HOUDE et al., 2004; SALIHU et al., 2011; ANDUALEMA & GESSESSE et al., 2012; NAGAJARAN, 2012; BADGUJAR et al., 2013). Atividades proteolíticas para *C. (Ogataea) cylindracea* também foram descritas para isolados de pitanga (TRINDADE et al., 2002).

A plasticidade fisiológica demonstrada por meio dos dados anteriores reforça a importância de se amostrar vários isolados do mesmo macromorfotipo durante o processamento do material biológico e isolamento dos micro-organismos, evitando assim a perda de variabilidade fenotípica e genotípica.

## 5.4 Caracterização do potencial de produção de fatores de crescimento

### 5.4.1 Produção de ácido indol-acético

A avaliação do potencial de produção de ácido indol-acético (AIA) foi realizada por métodos quantitativos. Os valores das dosagens de AIA presentes nos sobrenadantes foi correlacionado com valores de densidade ótica da cultura a 600 nm, de modo a associar o crescimento da levedura com a quantidade de AIA produzida (Tabela 18 e Apêndice H). Os ensaios foram realizados em microplaca de 96 poços, como mostrado na Figura 14. Dos 241 isolados testados, apenas cinco apresentaram resultados negativos para produção de AIA: 6IIb, *Candida (Yadamazyma) conglobata*; 59III, *Candida sorboxylosa*; 9IIa e 23IIb, *Meyerozyma guilliermondii*; e 145III, *Occultifur externus*.

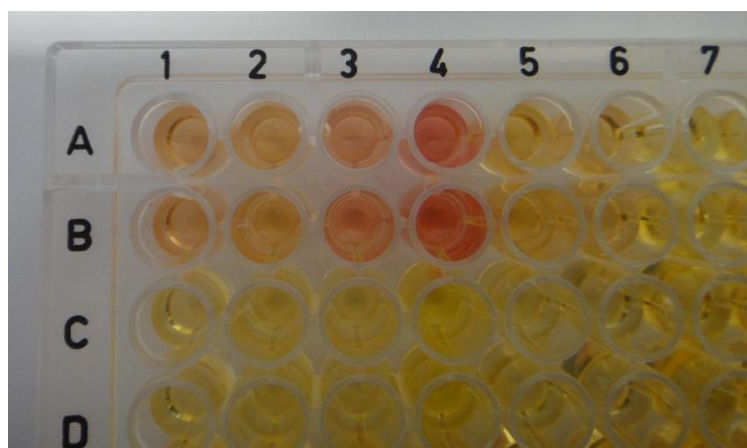


Figura 14: Ensaio de dosagem de AIA, utilizando o método do reagente de Salkoswky. Resultados positivos apresentam mudança de coloração de amarelo para rosa. As dosagens foram feitas em leitor de Elisa, a 530 nm.

Tabela 18: Categorização dos isolados de levedura por faixa de concentração de AIA produzido nas condições testadas: crescimento em meio Sabouraud suplementado com triptofano a 5 mM, a 28°C sob agitação, por 120 horas.

Identificação	Faixas de concentração de AIA (µg/mL)					
	1-20	20-40	40-60	60-80	80-100	> 100*
<i>Bandoniozyma complexa</i>	64Ia, 129III	13IV	-	-	-	-
<i>Bulleromyces nemorosus</i>	-	-	7IV	-	-	-
<i>Candida (Saccharomycopsis) amapae</i>	-	116IVa	88II			
<i>Candida asiatica</i>	-	-	7II	-	-	-
<i>Candida (Ogataea) boidinii</i>	-	29IIIa	-	31II, EN142IIa	151IIIb, 31IV	144IIa (112,9)
<i>Candida (Pichia) californica</i>	149IIb	84III	-	-	-	-
<i>Candida (Meyerozyma) carpophila</i>	25Ia	-	-	-	-	-
<i>Candida (Yadamazyma) conglobata</i>	57IIa, EN53Ia	127IIa	11Ia	-	-	-
<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	86Ia, 112II, 115Va, 150III, 112III	141IVa, 114IIb, 114IIIa, 115IIIa, 164IIa	-	-	-	87I (122,5)
<i>Candida (Kurtzmaniella) natalensis</i>	89III, 106IV	-	-	-	-	-
<i>Candida sorboxylosa</i>	151IIa, 106IIa, 142IIa, 81IIa, 136IIa, 85IIa, 25II, 60IIa	114IV, 87IVa, 11IV, 113IIIa, 113IIa, 115IIb, 57IIIa	92IIIa, 6V, 88IVa, 86IIb, 26IIa	8I, 149IIIa	-	90IIa (100,4)
<i>Candida</i> sp. 01	-	ENC46, EN44	-	23I	-	-
<i>Candida</i> sp.02	89Ia	-	-	-	-	-
<i>Candida</i> sp. 03	-	-	-	143IIb	-	-
<i>Candida stellimalicola</i> (clado irmão <i>Starmera</i> )	EN105Ia	-	-	-	-	-

Tabela 18: continuação.

Identificação	Faixas de concentração de AIA ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	1-20	20-40	40-60	60-80	80-100	> 100*
<i>Candida (Yamadazyma) tallmaniae</i>	162I	-	141Ib, 113I	-	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp. 01	74II, 51IV	51IIb	61II	-	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp. 02	-	130II	-	-	-	-
<i>Eballistra oryzae</i>	-	21I	-	-	-	-
<i>Fellomyces polyborus</i>	105II, 98II	126II, 4	-	13IIa	14IIa	-
<i>Hannaella luteola</i>	-	-	80II	-	38II	-
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	150IVb, 102II, 81IIIa, 92IIa, EN72IIa, 37IIa, 76IV, 56II, 60III, 75IIa	121III, 106IIIa, 131IIa, 118III, 65IIb, 38IIIa, 30IIa, 76IIIa	134IIIa, 41IIIa, 7V, 40III	-	-	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	142IVa, 97III	108IIb, 135IIa, 150II, 88IIIb, 29IIb	-	12Ib	-	-
<i>Metschnikowia</i> sp.	-	-	11III	-	-	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	ENC168, EN166Ia, 65Ia, 75Ib, 81Ib, 73I, 59Ia, EN149I, EN161I, 97I, EN153I, 38Ia, EN139I, 117I, 130I, EN49Ia, EN47Ia, 29Ia, 145I, 160I, 8II, 77Ia, 57Ia, 53Ia, 133I, EN102, ENC106Ia, 165, 115I, EN145I,	138II, 36Ib, 168Ia, 19Ia, 2I, 18II, 16IIrec, 8III, 6Ia, 51Ia, 90Ia, 156I, 17IVa, 8V, 59IVa, 35Ib, 101I, 35IIa, EN81IIIa, 1, 41Ia, 19IIb, EN158I, 18I, 67IIa, 5IIa, 88Ia	11V, 13Ia, 9Ia, 7I, 10, 14Ia	16I, 114I, 85I	2IIIb	-

Tabela 18: continuação.

Identificação	Faixas de concentração de AIA ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	1-20	20-40	40-60	60-80	80-100	> 100*
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (cont.)	93Ia, EN81Ia, EN77I, 107I, 109I, EN75Ib, 71Ia, 125I, 149I, 61Ia, 46Ia 121I, EN69Ia, 92Ia, EN69II,					
<i>Occultifur externus</i>	-	129IIa	-	-	-	-
<i>Ogataea</i> sp.	EN105IIa, 118II	-	-	-	-	-
<i>Pichia kluyveri</i>	57IVa	EN142IIIb	-	-	-	-
<i>Pichia kudriavzevii</i>	40IIa	146II	-	44IIa	-	-
<i>Pichia membranifaciens</i>	75IIIb, 141IIIa, 76IIa	73II, 152IIb	87IIIa, 6IV, 5I, 150Vb, 11II, 83IIb, 115IVa, 164IIIa, 84IIb	82III, EN81III, 81IVa, 18III, 51IIIa	-	47II (113,9)
<i>Rhodotorula dairenensis</i>	152IV	71IIa	31V	-	-	157IVa (126,6), 69II (238,6)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	44IIIa	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula oryzae</i>	-	-	-	-	6III	-
<i>Rhodotorula</i> sp.	-	145II	-	-	-	-
<i>Sarocladium strictum</i>	119II	-	-	-	-	-
<i>Saturnispora</i> sp.	-	8IV, 25III, EN114II	-	32III	-	-
<i>Ustilago</i> sp.	-	-	-	-	35III	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100IIIa	-	-	-	-	-
<i>Zygoascus hellenicus</i>	142Vb	-	-	-	-	-

\* Os valores indicados entre parênteses referem-se às concentrações de AIA obtidas para cada um dos isolados citados.

Entre os 98% dos isolados de levedura associados aos frutos da macaúba que foram capazes de produzir AIA *in vitro*, nas condições testadas (meio Sabouraud suplementado com L-triptofano a 5mM, a 28°C), a produção de AIA variou de 1,63 até 238,65  $\mu\text{g mL}^{-1}$   $\text{DO}_{600}^{-1}$ . A maioria dos isolados apresentou produção de AIA em concentrações abaixo de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo que 40,2% dos isolados apresentaram concentrações de AIA até 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 30,7%, entre 20 – 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 13,7%, entre 40 - 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 7,5%, entre 60 – 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; e 3,3%, entre 80 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 18).

Já foi demonstrado que, mesmo leveduras produtoras de AIA em concentrações relativamente baixas podem apresentar efeitos positivos quando associadas às plantas. Um isolado de *Cyberlindnera (Williopsis) saturnus*, endofítico de raiz de milho, apresentou produção de AIA na concentração de 22,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e foi capaz de promover o crescimento de raízes e partes aéreas desta planta, em experimentos sob condições gnotobióticas (em cultura pura) e em casa de vegetação (NASSAR et al., 2005). Isolados de *Candida valida*, *Rhodotorula glutinis* e *Trichosporon asahii*, produtores de AIA (29,5, 24,1 e 31,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e giberelina (6,2, 4,5 e 7,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), demonstraram capacidade de atuar como promotores de crescimento e controle biológico em beterraba em experimentos em casa de vegetação (EL-TARABILY, 2004).

Nas espécies cujos isolados apresentaram valores mais altos para produção dessa substância foi observada ampla variação intra-específica: *Fellomyces polyborus* (10-90  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Hannaella luteola* (50-92  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Meyerozyma guilliermondii* (0-95  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Candida sorboxylosa* (0-100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Candida (Ogataea) boidinii* (32-113  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Pichia membranifaciens* (17-114  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Candida (Ogataea) cylindracea* (8-122  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e *Rhodotorula dairenensis* (3-238  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Tabela 18, Apêndice H). Tal variação já foi relatada em outros trabalhos com leveduras produtoras de AIA (TSAVKELOVA et al. 2006; LIMTONG & KOOWADJANAKUL, 2012).

Concentrações de AIA entre 121,4 - 314,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram relatadas para amostras de *Candida maltosa* isoladas do filoplano de diversas plantas tailandesas (LIMTONG & KOOWADJANAKUL, 2012). Neste trabalho, 50% das leveduras isoladas de filoplano, correspondente a 49 isolados pertencentes a 20 espécies



diferentes foram capazes de sintetizar AIA *in vitro*. A produção de AIA variou entre 24,3 a 314,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e aproximadamente 72% dos isolados produziram AIA nas concentrações de 20 a 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Entre as espécies isoladas, *Hanseniaspora opuntiae*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Pichia kudriavzevii* produziram AIA em concentrações iguais a 44,8, 68,1 e 27,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (LIMTONG & KOOWADJANAKUL, 2012). Dois isolados de *Rhodotorula mucilaginosa*, obtidos de árvores do gênero *Populus*, foram descritos como produtores de AIA, atingindo concentrações desta substância entre 20 e 40  $\mu\text{g g}^{-1}$  de célula (peso seco) (XIN et al., 2009).

Ainda existem poucos trabalhos na literatura demonstrando o potencial de produção de AIA por leveduras associadas a plantas, quando comparados com os estudos com bactérias e fungos. Outros relatos estão associados com *Ustilago maydis*, uma levedura parasita do milho, produtora de galhas (SOSA-MORALES et al., 1997; REINEKE et al., 2008) e com *Saccharomyces cerevisiae* (SHIN et al., 1991). A caracterização das leveduras isoladas de macaúba quanto à produção de AIA realizada neste estudo e o trabalho de Limtong e Koowadjanakul (2012) demonstram que uma grande variedade de espécies apresenta esta habilidade, estimulando a realização de novos estudos, inclusive para avaliação do potencial das leveduras como agentes promotores de crescimento em plantas.

Estudos *in vivo* são necessários para avaliar se as leveduras associadas ao fruto da macaúba são capazes de promover a aceleração do processo de germinação das sementes, promover o crescimento dos órgãos vegetais em mudas da palmeira macaúba e/ou promover o aumento da produtividade das plantas. Como já exposto, esses fatores também têm sido limitantes na produção de frutos em quantidades suficientes para utilização da macaúba como matéria prima na produção de biodiesel (LORENZI, 2006; LIMA, 2011). A obtenção de bioinoculantes a partir de micro-organismos associados a esta planta podem contribuir para o sucesso de implantação de plantações comerciais, cuja maior produtividade seja capaz de suprir a demanda industrial.

#### 5.4.2 Solubilização de fosfatos e produção de fitases

Foram realizados ensaios qualitativos em meio sólido para verificação do potencial de solubilização de fosfatos orgânicos e inorgânicos pelas leveduras isoladas. Resultados positivos foram evidenciados pela produção de halos translúcidos no entorno das colônias (Figura 15).

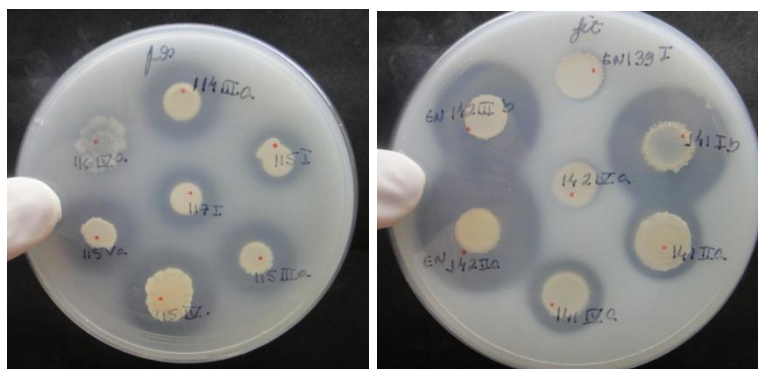


Figura 15: Fotografias de placas contendo meios de culturas específicos para os ensaios de fitase (direita) e solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis (esquerda), nos quais é possível visualizar os halos no entorno das colônias.

O número de isolados que apresentaram resultados positivos para os testes com fosfato inorgânico foi maior do que o de isolados positivos para os testes com fitato. Um total de 214 (88,8%) isolados foi capaz de promover a solubilização de formas insolúveis do fosfato cálcico, precipitado no meio de cultura, sendo 27 destes de origem endofítica (Tabela 19), enquanto 117 (48,5%) isolados foram capazes de promover a solubilização e hidrólise do fitato de cálcio precipitado no meio de cultura, sendo 8 destes de origem endofítica (Tabela 20).

Em todas as espécies de leveduras avaliadas, foram observados isolados com potencial para solubilização de fosfato inorgânico apresentaram resultados positivos. Foi observado que isolados da mesma espécie apresentaram índices de solubilização (IS, aqui considerados como a razão entre o halo translúcido produzido no meio ao redor da colônia e o halo da colônia) diferentes, tanto para fosfato inorgânico (Tabela 19) quanto para fitato, sendo que alguns não chegaram a crescer ou produzir halo no meio de cultura (Tabela 20). Isolados que apresentaram resultados negativos para o ensaio com fosfato inorgânico pertencem às espécies *Candida (Saccharomycopsis) amapae* (1 isolado), *Fellomyces polyborus* (3 isolados); *Hanseniaspora opuntiae* (14 isolados); *H. uvarum* (5 isolados); *Ogataea* sp. (1 isolado); *Pichia membranifaciens* (1 isolado); e *Saturnispora* sp. (2 isolados).

Tabela 19: Isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de avaliação do potencial de solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis, evidenciando diâmetro da colônia, do halo de degradação e a razão entre essas duas medidas.

Identificação	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro da colônia + halo (cm)	Isolados segundo índice de solubilização <sup>a</sup>			
			1,0 – 1,5	1,5 – 2,0	2,0 – 2,5	2,5 – 3,0
<i>Bandoniozyma complexa</i>	0,7 – 0,8	1,1 – 1,5	-	13IV, 129III, 64Ia	-	-
<i>Bulleromyces nemorosus</i>	0,7	1,0	7IV	-	-	-
<i>Candida asiatica</i>	0,75	1,1	7II	-	-	-
<i>Candida (Saccharomycopsis) amapae</i>	0,9	1,9	-	88II	-	-
<i>Candida (Ogataea) boidinii</i>	0,75 – 1,0	1,2 – 2,7	-	151IIIb, 29IIIa, 31IV	31II	EN142IIa, 144IIa
<i>Candida (Pichia) californica</i>	0,8 – 0,9	1,5 – 1,8	-	84III	149IIb	-
<i>Candida (Meyerozyma) carpophila</i>	0,8	1,3	-	25Ia	-	-
<i>Candida (Yadamazyma) conglobata</i>	0,7 – 0,8	1,15 – 1,7	-	57IIa, 11Ia, 127IIa, EN53Ia, 6IIb	-	-
<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	0,7 – 1,0	1,4 – 2,0	-	114IIIa, 164IIa, 114IIb, 112III	141IVa, 86Ia, 87I, 115IIIa, 150III, 112II	115Va
<i>Candida (Kurtzmaniella) natalensis</i>	0,7 – 0,8	1,6 – 1,8	-	-	89III, 106IV	-
<i>Candida sorboxylosa</i>	0,55 – 1,2	0,75 – 2,5	81IIa	136IIa, 142IIa, 114IV, 87IVa, 92IIIa, 59III, 8I, 11IV, 6V, 90IIa, 60IIa, 57IIIa, 25II	88IVa, 26IIa, 106IIa, 86IIb, 85IIa, 151IIa, 149IIIa, 115IIb, 113IIa	113IIIa
<i>Candida</i> sp 01	0,8 – 1,1	1,3 – 1,6	23I	ENC46, EN44	-	-
<i>Candida</i> sp.02	0,7	1,2	89Ia	-	-	-

Tabela 19: continuação.

<i>Candida</i> sp. 03	1,0	1,9	-	143IIb	-	-
<i>Candida stellimalicola</i> (clado irmão <i>Starmera</i> )	0,8	1,5	-	EN105Ia	-	-
<i>Candida</i> ( <i>Yamadazyma</i> ) <i>tallmaniae</i>	0,9 – 0,95	1,9 – 2,1	-	-	162I, 141Ib, 113I	-
<i>Cryptococcus</i> sp. 01	0,7 – 0,8	1,05 – 1,75	51IV	74II, 51IIb	61II	-
<i>Cryptococcus</i> sp. 02	0,8	1,2	130II	-	-	-
<i>Eballistra oryzae</i>	0,7	1,25	-	21I	-	-
<i>Fellomyces polyborus</i>	0,7 – 0,95	1,0 – 2,5	105II	-	14IIa	126II
<i>Hannaella luteola</i>	0,7	1,0 – 1,4	80II	38II	-	-
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,7 – 1,5	0,95 – 2,3	134IIIa	102II, 150IVb, 131IIIa, 38IIIa, 40III, 7V	30IIa	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1,0 - 1,1	1,65 – 2,4	-	108IIb, 142IVa	97III	-
<i>Metschnikowia</i> sp	0,6	1,1	-	11III	-	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,6 – 1,15	1,0 – 1,9	16IIrec, 1, 6Ia, 11V, 2IIIb, 61Ia, 67IIa, 8II, 85I, 59IVa, EN114I, 9Ia, 53Ia, EN69Ia	9IIa, 138II, EN168Ia, 18II, ENC168, 36Ib, 2I, EN166Ia, 19Ia, 75Ib, 81Ib, 65Ia, 8III, 23IIb, 160I, EN161I, EN158I, 133I, 19IIb, 107I, 121I, 149I, 101I, 51Ia, 125I, EN81Ia, 97I, EN153I, 92Ia, EN81IIa, EN102, 130I, EN149I, EN145I, 156I, 145I, 90Ia, 93Ia, 17IVa, 57Ia, EN139I, 7I, 35IIa, ENC106Ia,	165, 117I, 88Ia, 14Ia	-

Tabela 19: continuação.

<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (cont.)				35Ib, 109I, EN47I, 41Ia, 115I, 59Ia, 18I, 16I, 71Ia, 73Ia, EN77I, 8V, 38Ia, 29Ia, EN69II, 13Ia, 46Ia, 5IIa, 77Ia, EN49Ia, EN75Ib, 10		
<i>Occultifur externus</i>	0,7 – 1,2	1,25 – 1,95	-	145III, 129IIa	-	-
<i>Ogataea</i> sp.	0,65	1,1	-	118II	-	-
<i>Pichia kluyveri</i>	0,7 – 0,8	1,1 – 1,95	-	57IVa	EN142IIIb	-
<i>Pichia kudriavzevii</i>	0,8 – 1,8	1,3 – 2,7	146II	44IIa, 40IIa	-	-
<i>Pichia membranifaciens</i>	0,65 – 1,2	1,0 – 2,0	83IIb, EN81III, 6IV	87IIIa, 82III, 47II, 115IVa, 141IIa, 51IIIa, 84IIb, 81IVa, 164IIIa, 150Vb	18III, 152IIb, 73II, 11II, 75IIIa	76IIa
<i>Rhodotorula dairenensis</i>	0,65 – 0,75	1,35 - 1,6	-	-	31V, 69II, 157IVa, 152IV, 71IIa	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0,8	1,0	44IIIa	-	-	-
<i>Rhodotorula oryzae</i>	0,7	0,85	6III	-	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp.	0,9	2,5	-	-	-	145II
<i>Sarocladium strictum</i>	1,20	2,00	-	119II	-	-
<i>Saturnispora</i> sp.	0,7	0,9 – 1,1	32III	EN114II	-	-
<i>Ustilago</i> sp.	0,8	1,4	-	35III	-	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1,0	2,6	-	-	-	100IIIa
<i>Zygoascus hellenicus</i>	1,2	2,55	-	-	142Vb	-

<sup>a</sup>Índice de solubilização: razão entre o halo de solubilização e o diâmetro da colônia. Foram considerados apenas isolados que apresentaram índice maior que 1,0.

Entre as espécies cujos isolados apresentaram os maiores IS no teste de solubilização de fosfato inorgânico estão *Candida sorboxylosa*, *Rhodotorula* sp., *Candida (Ogataea) boidinii*, *Candida (Ogataea) cylindracea*, *Fellomyces polyborus*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Pichia membranifaciens*, somando 8 isolados (3,7%) com IS maiores que 2,5; e *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia kluyveri*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida (Yadamazyma) conglobata*, *Candida (Kurtzmaniella) natalensis*, *Candida (Yamadazyma) tallmaniae*, *Rhodotorula dairenensis*, *Cryptococcus* sp. 01, *Hanseniaspora opuntiae*, *Zygoascus hellenicus*, *Candida (Pichia) californica*, somando 39 isolados (18,2%) com IS entre 2,0 e 2,5. A maior parte dos isolados apresentou IS entre 1,5 e 2,0 (134 isolados, 62,6%) e uma menor fração, entre 1,0 e 1,5 (33 isolados, 15,4%) (Tabela 19).

Isolados de *Meyerozyma guilliermondii* e *Rhodotorula mucilaginosa*, obtidos de rizosfera e amostras de solo, demonstraram capacidade na solubilização de fosfato inorgânico insolúvel, em ensaios em meio de cultura sólido (IS = 1,8 e 1,2, respectivamente) e em meio líquido (190,8 e 97,7 mg de fósforo livre/L, respectivamente) (NAKAYAN et al., 2013). Estes dois isolados também apresentaram produção de AIA, em concentrações de 10,6 e 8,9 µg/mL, respectivamente. Ainda neste trabalho, a capacidade de promoção de crescimento desses dois isolados foi demonstrada através de experimentos *in vitro* e casa de vegetação, utilizando milho, couve-da-China e alface, e, no caso da *M. guilliermondii*, os efeitos foram demonstrados também em plantação de milho. Estes isolados não só promoveram o aumento do vigor das sementes, do tamanho e peso seco das raízes e partes aéreas, mas também contribuíram para absorção de nitrogênio, fósforo e potássio do solo pela planta (NAKAYAN et al., 2013).

Promoção de crescimento em tomate foi observada após inoculação da levedura halotolerante *Rhodotorula* sp. PS4, isolada da rizosfera da planta espinheira marinha em um deserto indiano. Neste trabalho, o potencial de solubilização de fósforo inorgânico da levedura atingiu o máximo de 277,7 mg de fósforo L<sup>-1</sup>, em condições de pH neutro (MUNDRA et al., 2011). Outros isolados de *Rhodotorula*, originados de rizosfera (NARSIAN et al., 2010; XIAO et al., 2013) demonstraram esta habilidade. Outros poucos gêneros/espécies de levedura isoladas de amostras de solo e rizosfera já foram relatados como solubilizadores de fosfato inorgânico, entre eles *Candida rugosa*, *Saccharomyces rouxii* (XIAO et al.,

2013), *Candida tropicalis* (AMPRAYN et al., 2012), *S. cerevisiae* (XIAO et al., 2013; HESHAM & MOHAMED, 2011); *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Klockera* e *Debaryomyces* (NARSIAN et al., 2010); *Barnettozyma (Williopsis) californica* (FALIH & WAINWRIGHT, 1995).

Em todos os trabalhos citados foi observada a redução do pH no meio de cultura, concomitante à solubilização do fosfato inorgânico. Em geral, esta redução pode estar associada à produção de ácidos orgânicos ou à liberação de íons H<sup>+</sup> durante a assimilação de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou outras reações metabólicas que desencadeiam a excreção de prótons (revisado por ARCAND & SCHNEIDER, 2006). Segundo alguns autores, a diversidade de ácidos produzidos pelos micro-organismos pode tornar falho o método de análise qualitativa da solubilização de fosfato inorgânico em placa (MENDES et al., 2013; JOHRI et al., 1999). Tamanhos de halos variados, ou mesmo a não detecção de halos, podem ser atribuídos às diferenças de taxas de difusão no meio de cultura, ou diferenças nas propriedades de acidificação, quelação e/ou troca iônica dos ácidos (JOHRI et al., 1999), levando a resultados falso-negativos. Apesar disso, a grande maioria dos trabalhos de prospecção de micro-organismos quanto a solubilização de fosfatos usa o método em placa para triagem (NAKAYAN et al., 2013; XIAO et al., 2013; HESHAM & MOHAMED, 2011; MUNDRA et al., 2011; NUOBARIENE et al., 2011; NARSIAN et al., 2010; FALIH & WAINWRIGHT, 1995).

As espécies *Candida asiatica*, *Candida* sp. 01, *Bulleromyces nemorosus*, *Cryptococcus* sp. 02, *Metschnikowia* sp., *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. oryzae*, *Sarocladium strictum* e *Ustilago* sp. não apresentaram isolados capazes de promover a hidrólise do fitato na sua forma precipitada. Entre as espécies cujos isolados apresentaram maiores índices enzimáticos (> 2) estão *Candida (Ogataea) boidinii*, *C. sorboxylosa*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Rhodotorula* sp., *C. (Yadamazyma) conglobata*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Wickerhamomyces anomalus* e *C. (Yamadazyma) tallmaniae*, totalizando 9,4% dos isolados com resultados positivos (11 isolados). A grande maioria dos isolados positivos para hidrólise de fitato (70,9%) apresentaram IS até 1,5, somando 83 isolados, enquanto os demais (19,7%) apresentaram IS entre 1,5 – 2,0, totalizando 23 isolados (Tabela 20).

Tabela 20: Isolados de leveduras que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de avaliação do potencial de produção de fitato, evidenciando diâmetro da colônia, do halo de degradação e respectivos índices enzimáticos.

Identificação	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro da colônia + halo (cm)	Isolados segundo índice de solubilização <sup>a</sup>		
			1,0 – 1,5	1,5 – 2,0	2,0 – 2,5
<i>Bandoniozyma complexa</i>	0,9 – 1,0	1,0 – 1,2	13IV, 129III, 64Ia	-	-
<i>Candida (Saccharomycopsis) amapae</i>	0,9	1,1	116IVa	-	-
<i>Candida (Ogataea) boidinii</i>	1,0 – 1,3	1,1 – 2,7	151IIIb, 31IV	-	EN142IIa, 144IIa, 31II
<i>Candida (Pichia) californica</i>	1,0 – 1,1	1,2 – 1,4	149IIb, 84III	-	-
<i>Candida (Meyerozyma) carpophila</i>	0,9 - 1,0	1,0	25Ia	-	-
<i>Candida (Yadamazyma) conglobata</i>	0,8 - 1,0	1,2 – 2,2	11Ia	53Ia	127IIa
<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	0,8 – 1,2	1,2 – 1,7	87I, 86Ia, 115IIIa, 150III, 114IIb, 164IIa, 112III	141IVa, 114IIIa, 112II, 115Va	-
<i>Candida (Kurtzmaniella) natalensis</i>	0,9 – 0,95	1,5 – 1,75	-	89III, 106IV	-
<i>Candida sorboxylosa</i>	0,85 – 1,2	1,0 - 2,6	106IIa, 26IIa, 86IIb, 88IVa, 151IIa, 85IIa, 6V, 8I, 142IIa, 114IV, 92IIIa, 87IVa, 90IIa, 59III, 11IV, 149IIIa, 60IIa, 115IIb, 113IIa, 57IIIa	-	113IIIa
<i>Candida</i> sp. 03	1,15	1,8	143IIb	-	-
<i>Candida</i> sp.02	0,8	1,1	89Ia	-	-
<i>Candida stellimalicola</i> (clado irmão <i>Starmera</i> )	0,95	1,1	EN105Ia	-	-



Tabela 20: continuação.

<i>Candida (Yamadazyma) tallmaniae</i>	1,05 – 1,15	2,0 – 2,25	-	162I, 113I	141Ib
<i>Cryptococcus</i> sp 01	0,85 – 0,95	0,95 – 1,5	51IV, 74II	61II	-
<i>Eballistra oryzae</i>	0,8	1,3	-	21I	-
<i>Fellomyces polyborus</i>	1,0 – 1,2	1,3 – 2,2	-	126II, 14IIa	-
<i>Hannaella luteola</i>	1,0	1,15	38II, 80II	-	-
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,8 – 1,7	1,0 – 2,15	106IIIa, 131IIIa, 134IIIa, 102II, 40III, 30IIa	-	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1,0	2,2	-	-	97III
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,8 – 1,1	0,9 – 2,5	16IIrec, 19Ia, 88Ia, 109I, EN158I, 14Ia, 85I, 117I, 145I, 165, EN81Ia, 121I, EN145I, 125I, 16I, 18I, 19IIb, 160I	-	51Ia
<i>Occultifur externus</i>	1,2	1,95	-	129IIa	-
<i>Ogataea</i> sp.	0,8	1,2	118II	-	-
<i>Pichia kluyveri</i>	0,95	2,1	-	-	EN142IIIb
<i>Pichia kudriavzevii</i>	1,7 – 2,05	2,2	44IIa, 146II	-	-
<i>Pichia membranifaciens</i>	0,8 – 1,15	0,95 – 1,8	82III, 87IIIa, 47II, 11II, 51IIIa, 164IIIa, 73II, 75IIIa, 83IIb, 141IIIa	152IIb, 76IIa, 18III	-
<i>Rhodotorula dairenensis</i>	0,85 – 0,95	1,0 – 1,4	157IVa, 152IV, 31V, 69II, 71IIa	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp.	1,1	2,55	-	-	145II
<i>Saturnispora</i> sp.	0,8 – 0,9	1,0 – 1,1	32III, EN114II	-	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1,1	2,3	-	-	100IIIa
<i>Zygoascus hellenicus</i>	1,5	2,75	-	142Vb	-

<sup>a</sup>Índice enzimático: razão entre o halo de hidrólise e o diâmetro da colônia. Foram considerados apenas isolados que apresentaram índice maior que 1,0.

Uma grande variedade de espécies de leveduras já foi descrita como potencialmente produtoras de fitase (SANO et al., 1999; OLSTORPE et al., 2009; NUOBARIENE et al., 2011; 2012; TSANG, 2011; HELLSTRÖM et al., 2012). Em estudo com 122 amostras de mais 60 espécies de diferentes origens, praticamente 100% apresentaram potencial de produção de fitases, com resultados mais expressivos para isolados das espécies *Blastobotrys adenivorans*, *Candida (Starmerella) bombi*, *Candida (Wickerhamomyces) vartiovaarae*, *Pichia fermentans*, *Bulleromyces laurentii* e *Wickerhamomyces anomalus* (OLSTORPE et al., 2009). Isolados de *Blastobotrys adenivorans* tem sido relatados em muitos trabalhos como bons produtores de fitase (SANO et al., 1999; OLSTORPE et al., 2009; NUOBARIENE et al., 2011; 2012). Em geral, as leveduras testadas tem origem em coleções de micro-organismos, amostras de solo e amostras de alimentos.

Entre as espécies de leveduras isoladas do fruto de macaúba que apresentaram resultados positivos no teste qualitativo para fitases já foram descritas atividade para *Pichia kudriavzevii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia membranifaciens* (OLSTORPE et al., 2009; NUOBARIENE et al., 2011; 2012; TSANG, 2011; HELLSTRÖM et al., 2012), *Meyerozyma guilliermondii* (TSANG, 2011),

Isolados com resultados negativos para solubilização de fosfato inorgânico insolúvel também apresentaram resultado negativo para solubilização de fitato, com exceção do isolado de *Candida (Saccharomycopsis) amapae* (116IVa) e de um dos isolados de *H. opuntiae* (106IIIa) (Tabela 20). Alguns trabalhos verificaram que a secreção de ácidos orgânicos pode aumentar as taxas de hidrólise do fitato, quando este se encontra complexado a metais, incluindo  $\text{Ca}^{2+}$  (PATEL et al., 2010; TANG et al., 2006; FREDRIKSON et al., 2002). Na presença de cátions metálicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), o fitato precipita e os ácidos orgânicos podem auxiliar na sua solubilização e atuar na complexação dos cátions, permitindo que os grupos fosfatos desprotonados possam ser acessados pelo sítio catalítico da enzima fitase (TANG et al., 2006). Por mais que ambas características, produção de ácidos orgânicos e de fitases, sejam desejáveis para que o micro-organismos possam efetivamente solubilizar fosfatos orgânicos em substratos complexos, os isolados supracitados deverão ser submetidos a um segundo

teste de triagem, tendo em vista que o princípio do método utilizado foi a hidrólise do fitato precipitado com cálcio.

A utilização dos ensaios em meio sólido como forma de verificar o potencial de produção de fitases por micro-organismos também tem sido avaliado por alguns autores (TSENG et al., 2000; OLSTORPE et al., 2009; NUOBARIENE et al., 2011; 2012). Testes utilizando meios sólidos, com fitatos insolúveis, podem ser imprecisos na avaliação da produção de fitases, quando estas enzimas são de origem intracelular (citossólica ou ligada à parede celular), pois a formação de halo translúcido no entorno da colônia depende de fitases extracelulares. Além disso, o tamanho do halo não pode ser diretamente correlacionado com a produção/atividade das enzimas (FREDRIKSON et al., 2002). Outros testes em meios sólidos, que avaliam o crescimento das leveduras utilizando o fitato como fonte exclusiva de fósforo, em comparação com controles positivo (meio com fosfato) e negativo (meio sem fósforo), são de difícil interpretação, especialmente em virtude do crescimento residual nos controles negativos (OLSTORPE et al., 2009; NUOBARIENE et al., 2011; 2012).

Um teste de triagem em microplacas, por meio da comparação das curvas de crescimento das leveduras em meios líquidos contendo fitato como fonte exclusiva de fósforo, em relação a controles positivos e negativos, foi apresentado como uma alternativa prática aos testes em meio sólido (OLSTORPE et al., 2009). A eficácia deste teste de triagem, em relação aos testes em meio sólido, é controversa. Os autores que o propuseram afirmam não ter observado diferenças qualitativas significantes entre a produção de fitases nos meios sólidos e líquidos, além de observarem que maiores taxas de crescimento no teste de triagem nem sempre estão relacionadas às maiores taxas de produtividade/atividade das fitases, observadas nos ensaios quantitativos (OLSTORPE et al., 2009). Contudo, em outros trabalhos, foram observadas diferenças nos resultados dos testes para o mesmo isolado (NUOBARIENE et al., 2011).

Do nosso conhecimento, entre as espécies/gêneros de levedura isoladas neste trabalho com resultado positivo para os testes de solubilização de fosfatos orgânicos e inorgânicos, aproximadamente 80% ainda não tem relatos na literatura para este tipo de habilidade. Em geral, existem poucos trabalhos

que descrevem leveduras solubilizadoras de fosfato orgânico e inorgânico, em relação aos trabalhos com fungos filamentosos e bactérias. Ademais, a maioria deles utiliza isolados originados de amostras de solo ou rizosfera de plantas, o que se justifica pela grande disponibilidade de fósforo nestes substratos. Poucos trabalhos investigam o potencial de solubilização de leveduras isoladas de frutos e outras partes aéreas da planta.

Neste trabalho, foi demonstrado que várias espécies de leveduras epifíticas e endofíticas associadas aos frutos da macaúba apresentam potencial para solubilização de fosfatos orgânicos e inorgânicos, muitas ainda não descritas para esta habilidade na literatura, merecendo maior atenção por parte dos pesquisadores. A presença dessas leveduras associadas ao fruto de macaúba pode apresentar vantagens e desvantagens. Uma das vantagens está no potencial dessas leveduras de auxiliar na promoção do crescimento da planta *in vivo* por meio do aumento da disponibilização de fosfato solúvel para a mesma. Assim como no caso das leveduras produtoras de AIA, caso essa habilidade seja comprovada, os isolados podem ser considerados potenciais bioinoculantes, podendo auxiliar no aumento da produtividade dos frutos pelas palmeiras, sendo utilizados inclusive na implantação de plantações comerciais. Entre as desvantagens, podemos citar a acidificação do óleo presente no fruto, promovida pelos ácidos orgânicos oriundos do metabolismo dessas leveduras, indesejável para o processo de produção de biodiesel (SILVA, 2007), um dos principais usos potenciais dessa planta.

### **5.5 Atividade enzimática e produção de fatores de crescimento em função do tempo**

Foram realizados testes estatísticos para avaliar se as atividades enzimáticas e/ou produção de fatores de crescimento demonstradas pelos isolados de leveduras apresentaram distribuição diferenciada, quando considerados os tempos de deposição dos frutos de macaúba no solo. Foram usados inicialmente testes de aderência, que constituem testes de hipóteses que avaliam de modo geral a distribuição dos dados. Para isso, a identidade das espécies foi desconsiderada e os tempos foram representados como a somatória das atividades de cada enzima/fator de crescimento. Nesta análise,

para os dados de atividade enzimática, foram considerados os testes que apresentaram IE maior do que 1 e, no caso das carbohidrases, também foram considerados os testes com IE igual a 1 (Tabela 15).

Segundo os resultados apresentados pelos testes de aderência, a atividade enzimática/produção de fatores de crescimento foi dependente do tempo ( $\chi^2 = 165.75$ ;  $df = 40$ ;  $P < 0.0001$ ). A associação parcial indicou valores significantes quando avaliadas as hipóteses de diferença entre os tempos ( $\chi^2 = 27.15$   $df = 5$ ;  $P < 0.0001$ ) e entre as habilidades ( $\chi^2 = 529.73$   $df = 8$ ;  $P < 0.0001$ ).

Com o objetivo de avaliar o comportamento de cada enzima nos tempos, foi utilizada uma representação gráfica chamada Mosaic Plot (FRIENDLY, 1994), em que os dados são representados na forma de áreas. O gráfico mostra as diferenças observada e esperada das atividades enzimáticas/produção de fatores de crescimento nos tempos de deposição do fruto no solo, sendo, dessa forma, avaliados os comportamentos dos resíduos (Figura 16).

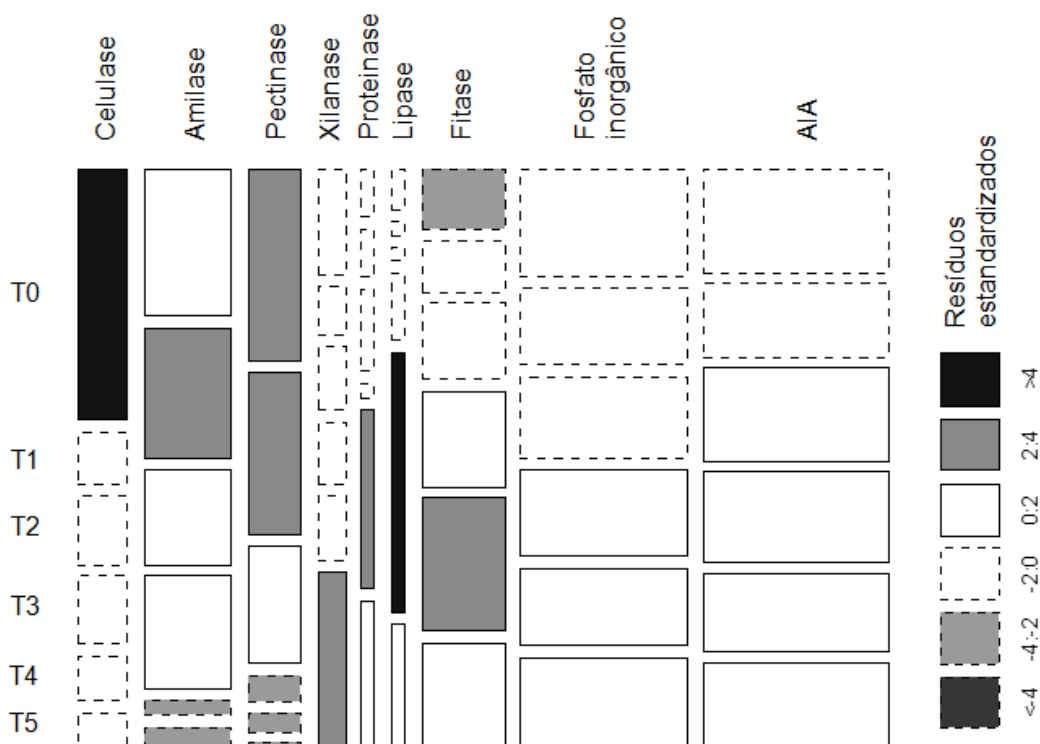


Figura 16: Mosaic Plot, evidenciado a distribuição das atividades enzimáticas e habilidades na produção de fatores promotores de crescimento em função do tempo de deposição dos frutos no solo. Linhas sólidas e pontilhadas indicam, respectivamente, desvios positivos e negativos dos dados em relação às frequências esperadas. O sombreamento de cada retângulo é proporcional aos resíduos padronizados do modelo ajustado (valores indicado na legenda). Retângulos cinza e pretos indicam desvios significativos nas frequências esperadas (com  $\alpha = 0,05$  e  $\alpha = 0,0001$ , respectivamente).

Através da interpretação do Mosaico, percebe-se que a atividade da enzima celulase foi significativamente mais frequente entre os isolados associados aos frutos coletados em T0, quando comparado com os demais tempos cujos isolados apresentaram pouca atividade. Também a atividade para a enzima pectinase é mais expressiva entre isolados associados a frutos coletados em T0 e T1, enquanto para a atividade de amilase, os valores são mais expressivos entre os isolados relacionados aos frutos coletados em T1. Comportamento oposto é observado para as atividades das enzimas xilanase, proteinase e lipase, cujos valores são mais significativos entre isolados associados a frutos coletados mais tardiamente, a partir de T4, apresentando padrão de atividade similar entre si. A habilidade de solubilização de fosfato inorgânico e produção de ácido indol-acético (AIA) apresentaram distribuição igualitária entre os tempos, não apresentando variações significativas. Já atividade para fitase aumenta entre os isolados associados aos frutos coletados no intervalo T3-T5.

As áreas dos retângulos são proporcionais à frequência dos dados (FRIENDLY, 1994), que pode ser correlacionada nesta análise à proporção dos isolados (neste caso, cada um representando um valor de atividade) que demonstraram a habilidade de produção das enzimas e/ou dos fatores de crescimento. Dessa forma, observamos retângulos maiores e mais homogêneos nas colunas referentes à solubilização de fosfato e produção de AIA, habilidades demonstradas por mais de 89% dos isolados testados, e retângulos menores nas estreitas colunas referentes às atividades de xilanase, lipase e proteinase, para as quais a proporção de isolados foi consideravelmente menor (inferior a 15%). Assim, esta informação visual corrobora os dados numéricos apresentados anteriormente no item 5.3.

A distribuição homogênea na produção de ácido indol-acético e promoção da solubilização de fosfatos inorgânicos sugere que estas habilidades encontram-se entre as leveduras isoladas da filosfera, com e sem interferência da microbiota do solo. A produção de ácidos orgânicos faz parte do metabolismo dos micro-organismos solubilizadores de fosfato inorgânico (ARCAND & SCHNEIDER, 2006), estejam eles em contato com o solo ou com a superfície de um órgão vegetal. Já a produção de ácido indol-acético, traz benefícios mútuos para micro-organismos e plantas nas duas condições:

quando ligados à planta, podem induzir seu crescimento, inclusive por meio da biossíntese de metabólitos, usados como fonte de nutrientes para ambos organismos; quando em associação com os frutos desprendidos, auxiliam no seu processo germinativo e na formação dos órgãos vegetais, beneficiando-se nutricionalmente deste processo (BERG, 2009). Já a expressão mais significativa de fitases após o contato do fruto com o solo pode estar relacionada com a presença do fitato, geralmente presente em grandes concentrações neste substrato (GYANESHWAR et al., 2002), sugerindo dessa forma que os micro-organismos associados ao fruto de macaúba após um determinado tempo possam ser provenientes do solo.

A sequência da expressão das atividades enzimáticas pelos isolados de leveduras no processo de colonização do fruto da macaúba permite algumas análises interessantes. A ordem de expressão das enzimas, celulases → pectinases → amilases → lipases e proteinases → xilanases, sugere um processo de colonização do fruto de macaúba de fora para dentro. Celulases e pectinases atuam na degradação de componentes da parede celular das células vegetais, umas das primeiras e principais barreiras para colonização dos tecidos da planta (GIBSON et al., 2011; HÉMATY et al., 2009). As amilases, por sua vez, estão relacionadas com reservas de nutrientes armazenadas no interior das células vegetais (BADRI et al., 2009). Juntas, essas três enzimas podem estar relacionadas à produção de microfissuras no epicarpo do fruto, promovendo o acesso dos micro-organismos aos tecidos internos (COMPANT et al., 2010).

Lipases também podem auxiliar na degradação da cutícula hidrofóbica dos órgãos vegetais (HÉMATY et al., 2009), bem como proteinases podem auxiliar na degradação da parede celular (BADRI et al., 2009), contudo, no caso do fruto de macaúba, elas estão mais relacionadas com o substrato altamente oleaginoso e proteico do mesocarpo. Por fim, as xilanases auxiliam na quebra de moléculas mais recalcitrantes, cuja degradação, em geral, é complexa (GIBSON et al., 2011; BEG et al., 2001).

Certamente, este processo não ocorre da forma linear como descrito anteriormente, muito menos depende exclusivamente da comunidade de leveduras que colonizam o fruto da macaúba. Como já discutido, esta comunidade convive em interação com outros micro-organismos, como fungos

filamentosos e bactérias, que também atuam sobre o substrato, por meio da produção de enzimas e metabólitos secundários, como ácidos orgânicos. Com a modificação do substrato, outras moléculas passam a estar disponíveis para a microbiota associada ao fruto, promovendo a seleção de indivíduos com habilidades metabólicas que possibilitem sua utilização como recurso nutricional (GIBSON et al., 2011).

Assim como as abordagens apresentadas, outras podem ser utilizadas para explicar o padrão de distribuição das atividades enzimáticas e habilidade em produção de fatores de crescimento entre as comunidades de leveduras associadas a frutos coletados em diferentes tempos de deposição no solo. De qualquer maneira, o contato com o solo e com seus micro-organismos pode acelerar o processo de degradação dos componentes do fruto da macaúba, inclusive dos lipídeos presentes no mesocarpo, cujo alto conteúdo tanto interessa a indústria do biodiesel (LIMA, 2011). Além da degradação dos lipídeos, a produção de ácidos pelos micro-organismos também é indesejável no processo de produção do biodiesel (SILVA, 2007).



## 6 CONCLUSÕES

A microbiota associada aos frutos de palmeiras macaúba localizadas na região de Casa Branca, Brumadinho, MG apresentou em sua composição 39 espécies de leveduras e fungos leveduriformes, pertencentes a 19 gêneros distintos. Um total de 14% dos isolados foi identificado no nível de gênero, *Candida* sp. 01, *Candida* sp. 02, *Candida* sp. 03, *Saturnispora* sp., *Ogataea* sp., *Metschnikowia* sp., *Ustilago* sp., *Cryptococcus* sp. 01, *Cryptococcus* 02, *Rhodotorula* sp., por não apresentarem identidade acima de 99% de suas sequências com as demais depositadas no GenBank. Para estes isolados, estudos adicionais são necessários para afirmar se tratam de espécies novas.

Todas as espécies identificadas já foram isoladas de amostras do ambiente natural, incluindo a filosfera de diversas plantas. A diferença na composição de espécies de leveduras associadas aos frutos coletados neste trabalho em relação à descrita para frutos coletados de palmeiras macaúba em outra localidade sugere forte influência do ambiente externo na composição das comunidades de leveduras associadas a esta planta. Esta hipótese é reforçada pela ocorrência de espécies de caráter cosmopolita, como *M. guilliermondii* e *Rh. mucilaginoso*, bem como de gêneros fortemente associados a um grupo de espécies vegetais, como *Ustilago*.

De modo geral, o número de espécies observadas nas comunidades epifíticas e endofíticas aproximou-se bastante do número de espécies estimadas, em especial com os estimador Bootstrap, sugerindo que o esforço amostral foi suficiente para capturar a riqueza total do sistema.

Diferenças entre as comunidades de epifíticos e endofíticos foram observadas. Das espécies citadas, 38 foram isoladas a partir da superfície dos frutos, enquanto 10 foram isoladas do mesocarpo e epicarpo. *Candida stellimalicola* (clado irmão *Starmera*) foi encontrada exclusivamente associada ao mesocarpo dos frutos. Entre os isolados epifíticos, foi observada a predominância de ascomicetos, em relação aos basidiomicetos, enquanto a comunidade de endofíticos foi composta unicamente de ascomicetos. Além disso, na comunidade epifítica foram observadas maiores taxas de colonização

dos frutos, maiores valores de abundância total e, conseqüentemente, de densidades médias de leveduras por fruto.

Mudanças no comportamento das comunidades de leveduras epifíticas e endofíticas foram observadas em função do tempo de deposição dos frutos no solo. Nas comunidades de epifíticos ocorreu, inicialmente, um decréscimo no valor de riqueza de espécies durante os primeiros 21 dias, seguido de um aumento do número de espécies observado. Já a abundância total do sistema aumentou em função do tempo. Durante todo o período experimental foi observada forte dominância da espécie *M. guilliermondii* e uma alta taxa de substituição de espécies entre comunidades de leveduras associadas a frutos coletados em períodos diferentes, refletida nos altos valores de diversidade beta de Whittaker. Esta espécie foi encontrada associada a um grande número de frutos, apresentando altos valores de frequência relativa. As espécies *M. guilliermondii*, *C. sorboxylosa*, *H. opuntiae*, *P. membranifaciens*, *H. uvarum*, *F. polyborus* foram isoladas durante todo o período experimental, sendo observadas em várias das comunidades de epifíticos associados a frutos nos diferentes tempos de coleta, enquanto um número grande de espécies foi observada em apenas um dos períodos. O maior valor de diversidade na comunidade epifítica foi encontrado em T0, quando os frutos ainda não haviam sido dispostos sobre o solo.

A riqueza nas comunidades de endofíticos, por sua vez, aumentou após o contato dos frutos com o solo, apresentando um decréscimo após os primeiros 14 dias. Em T0, apenas a espécie *M. guilliermondii* foi encontrada associada ao mesocarpo dos frutos. Os valores de abundância total do sistema oscilaram em função do tempo, sem contudo apresentar uma tendência. Durante todo o período experimental foi observada forte dominância da espécie *M. guilliermondii* e uma alta taxa de substituição de espécies entre comunidades de leveduras associadas a frutos coletados em períodos diferentes, refletida nos altos valores de diversidade beta de Whittaker, assim como observado para as comunidades de epifíticos. A frequência relativa de *M. guilliermondii* aumentou em função do tempo de deposição dos frutos no solo. O maior valor de diversidade na comunidade epifítica foi encontrado em T2, após 14 dias de deposição dos frutos sobre o solo.

Foi demonstrado que as comunidades de leveduras apresentam variações maiores entre os frutos de macaúba do que quando analisadas por fruto. Em outras palavras, a diversidade de leveduras no fruto é pequena, e as variações dessa diversidade entre os frutos apresentam maior contribuição para os valores de diversidade total do sistema. Também foi demonstrado que houve diferença significativa de riqueza entre palmeiras, em especial, nos frutos coletados na palmeira 2, que apresentaram número de espécies maior do que os frutos coletados nas demais palmeiras.

Grande plasticidade fisiológica inter e intra-específica foi observada tanto na produção de exoenzimas, quanto na produção dos fatores de crescimento. Com relação às atividades enzimáticas, aproximadamente 90% dos isolados apresentaram capacidade de crescer em pelo menos um dos meios contendo polissacarídeos como fonte exclusiva de carbono. Destes, uma pequena fração apresentou potencial de produção das exoenzimas amilase (6,6%), celulase (12%), pectinase (7,9%) e xilanase (1,2%). Nos testes de lipase e proteinase extracelulares, foram observados resultados positivos para 6,6% e 5,4% dos isolados, respectivamente.

Mais da metade das espécies apresentaram representantes com atividade para pelo menos uma das exoenzimas, enquanto *Meyerozyma guilliermondii*, *Bandoniozyma complexa*, *Sarocladium strictum*, *Eballistra oryzae*, *Fellomyces polyborus*, *Ustilago* sp., *Hanseniaspora opuntiae*, *Bulleromyces (Cryptococcus) nemorosus* e *Metschnikowia* sp. apresentaram isolados com atividade para várias enzimas. Do nosso conhecimento, este estudo trata-se do primeiro relato de produção de exoenzimas para isolados das espécies *Bandoniozyma complexa*, *Eballistra oryzae*, *Bulleromyces (Cryptococcus) nemorosus*, *Rhodotorula oryzae*, *Occultifur externus* e *C. (Yamadazyma) tallmaniae*, cuja ecologia ainda é pouco conhecida.

A capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis e de produção de ácido indol-acético foi detectada em representantes de todas as espécies, em altas proporções entre os isolados. Já o potencial de produção de fitases extracelulares foi apresentado por metade dos isolados, entre 30 espécies diferentes. Para a grande maioria das espécies testadas, este se trata do primeiro relato de produção dos fatores de crescimento supracitados, segundo revisão bibliográfica realizada.

Atividades enzimáticas e a produção de fitase demonstradas pelos isolados de leveduras apresentaram distribuição diferenciada, quando considerados os tempos de deposição dos frutos de macaúba no solo. Expressão das enzimas celulase, amilase e pectinase foram observadas em tempos anteriores, enquanto a expressão de lipases, proteinases e xilanases foram detectadas em tempos posteriores. A detecção de fitases foi significativamente mais alta após 28 dias de deposição dos frutos no solo. A produção de ácido indol-acético e promoção da solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis não apresentaram diferenças significativas entre os períodos de coleta.

Em síntese, o estudo da diversidade de leveduras associadas aos frutos da palmeira macaúba e dos vários compostos orgânicos produzidos nesta interação é importante para determinar os efeitos benéficos ou prejudiciais que eles causam sobre a planta. Neste estudo foi demonstrado que uma grande variedade de espécies de leveduras e fungos leveduriformes pode ser encontrada associada aos frutos de macaúba, em particular à superfície do mesmo. O comportamento desta microbiota não é estático, sendo influenciado por fatores externos, como o contato do fruto com o solo, e por fatores internos, como as interações entre as diversas populações que compõe esta microbiota. O potencial de produção de exoenzimas demonstrado por esses micro-organismos é significativo, podendo contribuir para a degradação tanto do epicarpo, produzindo microfissuras no mesmo e desse modo permitindo o acesso de outros micro-organismos ao interior do fruto; quanto do mesocarpo, promovendo a degradação das substâncias da polpa, incluindo o óleo, substância de interesse da indústria do Biodiesel. Por outro lado, essas enzimas podem apresentar aplicações importantes em diversos setores industriais, podendo o homem se beneficiar dessa habilidade. A produção de substâncias e enzimas que possam atuar na promoção do crescimento da planta, apresentadas pelas leveduras caracterizadas neste estudo, é um tipo de interação positiva micro-organismo – planta, podendo ser explorada na agricultura por meio da utilização desses micro-organismos como bioinoculantes. Contudo, algumas das substâncias produzidas por estas leveduras, como, por exemplo, os ácidos orgânicos que auxiliam na solubilização de fosfato, podem ser indesejáveis quando o fruto é utilizado

como matéria-prima na produção do biodiesel, por promover a acificação do óleo do mesocarpo. De qualquer forma, a agregação desses conhecimentos é essencial para elaboração de projetos de exploração comercial e industrial sustentáveis desta palmeira.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Sater, M. A. & Ismail, M. A., Ecological and Enzymatic Studies on Fungi Associated with Biscuits in Egypt. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 31, p. 277-292, 1993.

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, Boletim mensal do Biodiesel, fev/2014, disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=69998&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1395462115409>, acessado em 22 de março de 2014.

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, disponível em: [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br), acessado em 22 de março de 2014.

Aguilar, G. & Huitrón, C., Conidial and mycelial-bound exo-pectinase of *Aspergillus* sp. *FEMS Microbiology Letters*, 108, 2, p. 127–132, 1993.

Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S., Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 163, p. 173 – 181, 2008.

Akiyama, K., Matsuzaki, K., Hayashi, Y., Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435, p.824-827, 2005.

Al-Falih, A.M., Wainwright, M., Nitrification, S-oxidation and P-solubilization by the soil yeast *Williopsis californica* and by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycol Res* 99, p. 200 – 204, 1995.

Alimardani-Theuil, P., Gainvors-Claisse, A., Duchiron, F., Yeasts: An attractive source of pectinases—From gene expression to potential applications: A review. *Process Biochemistry* 46 (2011) 1525–1537

Aly, A.H., Debbab, A., Proksch, P., Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90, p.1829–1845, 2011.

Amprayna, K., Rose, M.T., Kecskés, M., Pereg, L., Nguyen, H.T., Kennedy, I.R., Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. *Applied Soil Ecology* 61, p. 295–299, 2012.

Andualema, B. e Gessesse, A., Microbial Lipase and Their Industrial Applications: Review. *Biotechnology*, 11, p. 100-118, 2012.

Arcand, M.M., Schneider, K.D., Plant- and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78(4), p. 791-807, 2006.

Arkcooll, D. New crops from Brasil. In: National Symposium on Advances in New Crops. Proceedings of the first national symposium “New crops: research,

development, economics”, Indianapolis, Indiana, USA, 1988. Editores: Janick, J. e Simon, J.E., pp. 367-371, 1990.

ÁrvoresBrasil: disponível em: [http://www.arvoresbrasil.com.br/arvore\\_ficha\\_cientifica.php?p\\_id\\_arvore=51](http://www.arvoresbrasil.com.br/arvore_ficha_cientifica.php?p_id_arvore=51). Acessado em 12 de junho de 2012.

Asturias, R. Bioenergía en Centroamérica. Anais In: Foro Regional Alianza en Energía y Ambiente, 3., 2004, Antigua, Guatemala. Disponível em <[http://www.camagro.com/cnpml/Articulos/3\\_03.asp](http://www.camagro.com/cnpml/Articulos/3_03.asp)>. Acessado em 17 março de 2007.

Austin, M.P., Spatial prediction of species distribution: an interface between ecological theory and statistical modeling. *Ecological Modelling*, v. 157, 2–3, p. 101–118, 2002.

Axtell, C.A. e Beattie, G.A., Construction and Characterization of a proU-gfp Transcriptional Fusion That Measures Water Availability in a Microbial Habitat. *Applied And Environmental Microbiology*, 68 (9), p. 4604–4612, 2002.

Badgujar, K.C., Dhake, K.P., Bhanage, B.M. Immobilization of *Candida cylindracea* lipase on poly lactic acid, polyvinyl alcohol and chitosan based ternary blend film: Characterization, activity, stability and its application for N-acylation reactions. *Process Biochemistry* 48, p. 1335–1347, 2013.

Badri, D.V., Weir, T.L., van der Lelie, D., Vivanco, J.M., Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, p.642–650, 2009.

Bai, F., Cai, Y., Wang, Q., Ohkubo, H., *Rhodotorula oryzae* sp. nov., a novel basidiomycetous yeast species isolated from paddy rice. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86, p. 295–299, 2004.

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 57, p. 233-266, 2006.

Bauer, R., Begerow, D., Nagler, A., Oberwinkler, F., The Georgerfischeriales : a phylogenetic hypothesis. *Mycol. Res.*, 105, 4, p. 416-424, 2001.

Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A., Arroyo-López, F.N., Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, 147, p. 89–96, 2011.

Bayer, E.A., Chanzyt, H., Lamed, R., Shoham, Y., Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology*, 8, p. 548-557, 1998.

Beattie, G.A. e Lindow, S.E., Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology* 89, 353–359, 1999.

Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S., Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 56, p. 326–338, 2001.

Beguín, P. e Lemaire, M., The cellulosome: an exocellular, multiprotein complex specialized in cellulose degradation. *Crit Rev Biochem*, 31, p. 201-236, 1996.

Belén-Camacho, D.G., López, I., García, D., González, M., Moreno-Álvarez, M.J., Medina, C., Evaluación físico-química de la semilla y del aceite de corozo (*Acrocomia aculeata* Jacq.), *Grasas y Aceites*, 56, 4, p. 311-316, 2005.

Benedetti, O., Plá, J.A., Rathmann, R., Padula, A.D., Uma proposta de modelo para avaliar a viabilidade do biodiesel no Brasil. *Teoria e Evidência Econômica*, Passo Fundo, v. 14, Ed. Especial, p. 81-107, 2006.

Berg, G., Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, p. 11-18, 2009.

Berg, G., Smalla, K., Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 68, p.1–13, 2009.

Bhadra, B.; Rao, R.S.; Singh, P.K.; Sarkar, P.K.; Shivaji, S. Yeasts and yeast-like fungi associated with tree bark: diversity and identification of yeasts producing extracellular endoxylanases. *Curr. Microbiol.* 56, p. 489-494, 2008.

Bhagobaty, R. K. e Joshi, S. R., Enzymatic Activity of Fungi Endophytic on Five Medicinal Plant Species of the Pristine Sacred Forests of Meghalaya, India. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17, p. 33-40, 2012.

Bhattacharyya, P. N. e Jha, D. K., Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol.*, 28, p.1327–1350, 2012.

Biely & Sláviková, New Search for Pectolytic Yeasts. *Folia Microbiol.* 39 (6), p. 485-488, 1994.

Biely, P. & Petrakova, A.E., Novel Inducers of the Xylan-Degrading Enzyme System of *Cryptococcus albidus*. *Journal Of Bacteriology*, p. 408-412, 1984.

Bonfante, P. e Anca, I.A., Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, p. 363–83, 2009.

Bornscheuer, U.T. Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev*, v. 26, p. 73-81, 2002.

Botha, A., The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 43, p. 1-8., 2011.



Bradford, M.M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, p.248-254, 1976.

Braga, A.A., Morais, P.B., Linardi, V.R., Screening of Yeasts from Brazilian Amazon Rain Forest for Extracellular Proteinases Production. *System. Appl. Microbiol.* 21, p. 353-359, 1998.

Brandão, L.R., Libkind, D., Vaz, A.B.M., Santo, L.C.E., Moline, M., Garcia, V., van Broock, M., Rosa, C.A., Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. *FEMS Microbiol Ecol* 76, p. 1–13, 2011.

Brandl, M. T., Lindow, S. E., Contribution of indole-3-acetic acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, p.3256–3263, 1998.

Brasil, Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, edição número 10 de 14/01/2005, disponível em: <http://www.mda.gov.br/portal/saf/programas/biodiesel/2290882>, acessada em 17 de junho de 2012.

Bric, J.M., Bostock, R.M., Silverstone, S.E., Rapid In Situ Assay for Indoleacetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (2), p. 535-538, 1991.

Brizzio, S.; Turchetti, B.; De Garcia, V.; Libkind, D.; Buzzini, P.; Van Broock, M. Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagônia (Argentina). *Can. J. Microbiol.*, v. 53, p. 519-525, 2007.

Bunster, L., Fokkema, H. J., Schippers, B., Effect of surface activity of *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, p.1340–1345, 1989.

Buzzini, P. & Martini, A., Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology*, 93, p. 1020–1025, 2002.

Cappellazzo, G., Lanfranco, L., Fitz, M., Wipf, D., Bonfante, P., Characterization of an amino acid permease from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiol.* 147, p. 429–37, 2008.

Carrasco, M., Rozas, J.M., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V., Baeza, M., Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. Carrasco et al. *BMC Microbiology*, 12:251, 2012.

Castelões, L. 2011. - Núcleo de Apoio a Culturas Energéticas fortalecem pesquisas para produção de energia, disponível em: <http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2011/maio/4a->

[semana/nucleo-de-apoio-a-culturas-energeticas-fortalecem-pesquisas-para-producao-de-energia](#). Acessado em 15 de junho de 2012.

Castillo, U.F., Strobel, G.A., Ford, E.J., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B., Albert, H., Robison, R., Condrón, M.A.M., Teplow, D.B., Stevens, D., Yaver, D., Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*, *Microbiology*, 148, p. 2675–2685, 2002.

Camilleri, C. e Jouanin, L., TheTR-DNAregion carrying the auxin synthesis genes of the *Agrobacterium rhizogenes* agropine-type plasmid pRiA4: nucleotide sequence analysis and introduction into tobacco plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4, p.155–162, 1991.

Chanprasartsuk, O., Prakitchaiwattana, C., Sanguandeeikul, R., Fleet, G.H., Autochthonous yeasts associated with mature pineapple fruits, freshly crushed juice and their ferments; and the chemical changes during natural fermentation. *Bioresource Technology*, 101, p. 7500–7509, 2010.

Chassot, C., Nawrath, C., Métraux, J.P., The cuticle: Not only a barrier for plant defence, A novel defence syndrome in plants with cuticular defects. *Plant Signaling & Behavior*, 3 (2), p. 142-144, 2008.

Chi, Z., Zhang, T., Liu, Z., Li, J., Wang, X., Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. *Biotechnology Advances* 27 p. 236–255, 2009.

Cipriano, R. Descobrimo o poder da macaúba, disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2006/foldernoticia.2006-04-3.3722359657/noticia.2006-04-26.0919750710/?searchterm=macaúba>. Acessado em 15 de junho de 2012.

Colla, E., Pereira, A.B., Hernalsteens, S., Maugeri, F., Rodrigues, M.I. Optimization of Trehalose Production by *Rhodotorula dairenensis* Following a Sequential Strategy of Experimental Design. *Food Bioprocess Technol*, 3, p. 265–275, 2010.

Colen, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 206pp., 2006.

Cómmenil, P., Belingheri, L., Dehorter, B., Anti-lipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 52, p. 1-14, 1998.

Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A., Dias, L.A.S., Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology & Biochemistry*, 42, p. 669-678, 2010.

Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., López-Bucio, J., *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass

Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 149, p. 1579–1592, 2009.

Daniel, H., Vrancken, G., Takrama, J.F., Camu, N., De Vos, P., De Vuyst, L., Yeast diversity of *Ghanaian cocoa* bean heap fermentations. *FEMS Yeast Res.*, 9, p.774–783, 2009.

da Silva, E., Borges, M.F, Medina, C., Piccoli, R.H., Schwan, R.F., Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*, 5, p. 859–865, 2005.

Debbab, A., Aly, A.H., Edrada-Ebel, R.A., Müller Werner, E.G., Mosaddak, M., Hakiki, A., Rainer Ebel, R., Proksch, P. Bioactive secondary metabolites from the endophytic fungus *Chaetomium* sp. isolated from *Salvia officinalis* growing in Morocco. *Biotechnol Agron Soc Environ* 13, p.229–234, 2009.

de Boer, W., Folman, L.B., Summerbell, R.C., Boddy, L., Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews* 29 p. 795–811, 2005.

Duarte, A. W. F. Dayo-Owoyemi, I. , Nobre, F. S., Pagnocca, F. C., Chaud, L. C. S., Pessoa, A., Felipe, M. G. A., Sette, L. D. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. *Extremophiles*, 17, p. 1023–1035, 2013.

El-Tarabily, K.A., Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 96, p. 69–75, 2004.

Falih, A.M. & Wainwright, M., Nitrification, S-oxidation and P-solubilization by the soil yeast *Williopsis californica* and by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycol. Res.* 99 (2), p. 200-204, 1995.

Faria, R.,C., Diversidade e produção de enzimas de interesse biotecnológico por leveduras isoladas de frutos da Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart) do Parque Nacional Serra do Cipó – MG. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 133 pp., 2012.

Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., Stätzell-Tallman, A., Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, p. 1351–1371, 2000.

Feng, J. Feng, W., Liu, G., Greenshields, D., Shen, W., Kaminskyj, S., Hughes, G.R., Peng, Y., Selvaraj, G., Zou, J., Wei, Y., Analysis of a *Blumeria graminis* - Secreted Lipase Reveals the Importance of Host Epicuticular Wax Components for Fungal Adhesion and Development. *MPM*, 22 (12), pp. 1601–1610, 2009.

Fokkema, N. J., Riphagen, I., Poot, R. J., de Jong, C., Aphid honeydew, a potential stimulant of *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum* and the

competitive role of saprophytic mycoflora. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 81:355–363, 1983.

Foster, M.L., Dowd, S.E., Stephenson, C., Steiner, J., Suchodolski, J.S., Characterization of the Fungal Microbiome (Mycobiome) in Fecal Samples from Dogs. *Veterinary Medicine International*, 2013.

Fredrikson, M., Andlid, T., Haikara, A., Sandberg, A.S., Phytate degradation by micro-organisms in synthetic media and pea flour. *Journal of Applied Microbiology*, 93, p. 197–204, 2002.

Friendly, M., Mosaic displays for multiway contingency tables. *J. Amer. Statist. Assoc* 89, p. 190–200, 1994.

Gadanhó & Sampaio, Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula*: *Rh. glutinis* sensu stricto and *Rh. dairenensis* comb. nov. *FEMS Yeast Research*, 2, p. 47-58, 2002.

Galvani, F. e Fernandes, J. Extração mecânica da polpa da bociuva coletada na região de Miranda, MS. *Circular Técnica* 93, Embrapa Pantanal, 5pp., 2010.

Gálvez, S.L., Loiseau, G., Paredes, J.L., Barel, M., Guiraud, J. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114, p. 124–130, 2007.

Gangadevi, V., Muthumary, J. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*: a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. *Mycol Balc* 5, p.1–4, 2008.

Ghorbani-Nasrabadi, R., Greiner, R., Alikhani, H.A., Hamedi, J., Identification and determination of extracellular phytate-degrading activity in actinomycetes. *World J Microbiol Biotechnol.*, 28, p. 2601–2608, 2012.

Giacomini, H.C., Os mecanismos de coexistência de espécies como vistos pela teoria ecológica. *Oecol. Bras.*, 11, 4, p. 521-543, 2007.

Gibson, D.M., King, B.C., Hayes, M.L., Bergstrom, G.C., Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. *Current Opinion in Microbiology*, 14, p.264–270, 2011.

Goldbeck, R., Gonçalo, R.M.M., Pereira, A.G., Maugeri-Filho, F., Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates. *Bioresource Technology* 128, p. 797–803, 2013.

Golubev, W., Gadanhó, M., Sampaio, J.P., Golubev, N.W., *Cryptococcus nemorosus* sp. nov. and *Cryptococcus perniciosus* sp. nov., related to *Papiliotrema* Sampaio et al. (Tremellales). *Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, p. 905–911, 2003.

Gordon, S.A. e Weber, R.P, Colorimetric estimation of indolacetic acid. *Plant Physiol.*, 26, p.192-195, 1951.

Gotelli, N.G. & Ellison, A.M., Princípios de estatística em Ecologia. Editora Artmed, p. 532. 2010.

Groenewald, M., Robert, V., Smith, M.T., The value of the D1/D2 and internal transcribed spacers (ITS) domains for the identification of yeast species belonging to the genus *Yamadazyma*. *Persoonia*, 26, p. 40–46, 2011.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38, p. 1599 – 1616, 2003.

Gyaneshwar, P., Nareshkumar, G., Parekh, L.J., Poole, P.S., Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* 245, p. 83–93, 2002.

Hankin, L. e Anagnostakis, S.G., The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycol.*, v.67, p.597-607, 1975.

Harrison, M.J., van Buuren, M.L., A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378, p.626–29, 1995.

Hartley, B. S., Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 29, p.45–72, 1960.

Hasunuma, T. & Kondo, A., Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering *Biotechnology Advances*, 30, p. 1207–1218, 2012.

Hellström, A.M., Almgren, A., Carlsson, N.,G., Svanberg, U., Andlid, T.A., Degradation of phytate by *Pichia kudriavzevii* TY13 and *Hanseniaspora guilliermondii* TY14 in Tanzanian togwa. *International Journal of Food Microbiology*, 153, p. 73–77, 2012.

Hemáty, K., Cherk, C., Somerville, S., Host–pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, v.12, p. 406-413, 2009.

Hesham, A.L. e Mohamed, H.M., Molecular Genetic Identification of Yeast Strains Isolated from Egyptian Soils for Solubilization of Inorganic Phosphates and Growth Promotion of Corn Plants. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 21(1), p. 55–61, 2011.

Hidalgo, C., Mateo, E., Mas, A., Torija, M.J., Identification of yeast and acetic acid bacteria isolated from the fermentation and acetification of persimmon (*Diospyros kaki*). *Food Microbiology*, 30, p. 98-104, 2012.

Hinsinger, P., Betencourt, E., Bernard, L., Brauman, A., Plassard, C., Shen, J., Tang, X., Zhang, F., P for Two, Sharing a Scarce Resource: Soil Phosphorus Acquisition in the Rhizosphere of Intercropped Species. *Plant Physiology*, 156, p. 1078–1086, 2011.

Homma, A.K.O., Extrativismo vegetal ou plantio: qual a opção para a Amazônia? *Estudos avançados*, 26 (74), p. 167-186, 2012.

Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D., Lipases and Their Industrial Applications An Overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118, P. 155-170, 2004.

Hutchison, M. L., Tester, M. A., Gross, D. C., Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8, p.610–620, 1995.

Iefuji, H., Chino, M., Kato, M., Limura, Y., Acid xylanase from Yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, Characterization, Cloning and Sequencing. *Biosc. Biotech. Biochem.*, 60 (8), p. 1331-1338, 1996.

Illegghems, k., De Vuyst, L., Papalexandratou, Z., Weckx, S., Phylogenetic Analysis of a Spontaneous Cocoa Bean Fermentation Metagenome Reveals New Insights into Its Bacterial and Fungal Community Diversity. *PLoS ONE*, 7, Issue 5, 2012.

Imran, M., Desmaures, N., Vernoux, J.P., From undefined red smear cheese consortia to minimal model communities both exhibiting similar anti-listerial activity on a cheese-like matrix. *Food Microbiology*, 27, p. 1095-1103, 2010.

Isaeva, O. V., Glushakova, A. M., Garbuz, S. A., Kachalkin, A. V., Chernov, Y. I., Endophytic Yeast Fungi in Plant Storage Tissues, *Biology Bulletin*, Vol. 37, No. 1, pp. 26–34, 2010.

Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40, p. 2931–2944, 2005.

Johri, J.K., Surange, S., Nautiyal, C.S., Occurrence of Salt, pH, and Temperature-tolerant, Phosphate-solubilizing Bacteria in Alkaline Soils. *Current Microbiology*, 39, p. 89–93, 1999.

Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., Tewari, R., Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology* 77, p. 215-227, 2001.

Katiyar, V. e Goel, R. Siderophore mediated plant growth promotion at low temperature by mutant of fluorescent pseudomonad. *Plant Growth Regul*, 42, p. 239–244, 2004.

Kefford N. P., Brockell J. and Zwar J. A., The symbiotic synthesis of auxin by legumes and nodule bacteria and its role in nodule development. *Australian Journal of Biological Science* 13, 456-467, 1960.

Khalid, A., Arshad, M., Zahir, Z.A., Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 96, p. 473 –480, 2004.

Kishore, G.K., Pande, S., Podile, A.R., Phylloplane bacteria increase seedling emergence, growth and yield of field-grown groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Letters in Applied Microbiology*, 40, p. 260–268, 2005.

Körber, H., Strizhov, N., Staigerl, D., Feldwischl, J., Olsson, O., Sandberg, G., Palmel, K., Schell, J., Konczl, C., T-DNA gene 5 of *Agrobacterium* modulates auxin response by autoregulated synthesis of a growth hormone antagonist in plants. *The EMBO Journal*, vol.10 n° 13, p. 3983-3991, 1991.

Kouker, G. e Jaeger, K.E., Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, p. 211 – 213, 1987.

Kuhad, R.C, Gupta, R., Singh, A., *Microbial Cellulases and Their Industrial Applications*. *Enzyme Research*, p. 1-10, 2011.

Kumar, C.G., Takagi, H., *Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint*. *Biotechnol. Adv.*, 17(7), p. 561-594, 1999.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., Robert, V., *Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts*. In.: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., *The Yeasts a Taxonomic Study*, 5a Ed. Elsevier, v. 1, p. 87-110, 2011.

Kurtzman, C.P. e 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.

Landell, M.F., *Biodiversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos leveduriformes associados ao filoplano de bromélias do Parque de Itapoã-Viamão/RS*. Dissertação (mestrado) Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 136 pp., 2006

Larpin-Laborde, S. et al., Surface microbial consortia from Livarot, a French smear-ripened cheese. *Can. J. Microbiol.*, 57, p. 651–660, 2011.

Laslo, E., György, E., Mara, G., Tamás, E. Ábrahám, B., Lányi, S., Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. *Crop Protection*, 40, p. 43 – 48, 2012.

Lee, D., Koh, Y., Kim, K., Kim, B., Choi, H., isolation and characterizations of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol. Lett.*, 179, p. 393-400, 1999.

Lee, H.K., Ahn, M.J., Kwak, S.H., Song, W.H., Jeong, B.C., Purifications from Psychrotrophic *Aeromonas* sp. LBP 4. *J. Microbiol.*, 41, p. 22-27, 2003.

Lerouxel, O., Cavalier, D.M., Liepman, A.H., Keegstra, K., Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides-a complex process. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, p. 621-30, 2006.

Lieckfeldt, E., Meyer, W., Böner, T., Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J. Basic Microbiol.* 33: 413–426, 1993.

Lima, M.M., *Análise transdisciplinar, evolutiva e sustentável de uma filière de combustível: a macaúba em Montes Claros/MG*. Tese (Doutorado em

Agronegócios) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 316pp., 2011.

Limtong, S., Srisuk, N., Yongmanitchai, W., Yurimoto, H., Nakase, T., Kato, N., *Pichia thermomethanolica* sp. nov., a novel thermotolerant, methylotrophic yeast isolated in Thailand. *Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, p. 2225–2229, 2005.

Limtong, S., Srisuk, N., Yongmanitchai, W., Yurimoto, H., Nakase, T., *Ogataea chonburiensis* sp. nov. and *Ogataea nakhonphanomensis* sp. nov., thermotolerant, methylotrophic yeast species isolated in Thailand, and transfer of *Pichia siamensis* and *Pichia thermomethanolica* to the genus *Ogataea*. *Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, p. 302–307, 2008a.

Limtong, S., Youngmanitchai, W., Kawasaki, H., Seki, T., *Candida phangngensis* sp. nov., an anamorphic yeast species in the *Yarrowia* clade, isolated from water in mangrove forests in Phang-Nga Province, Thailand. *Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, p. 515–519, 2008b.

Limtong, S., Kaewwichian, R., Am-In, S., Nakase, T., Lee, C., Yongmanitchai, W., *Candida asiatica* sp. nov., an anamorphic ascomycetous yeast species isolated from natural samples from Thailand, Taiwan, and Japan. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98, p. 475–481, 2010.

Limtong, S. & Koowadjanakul, N., Yeasts from phylloplane and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World J Microbiol Biotechnol*, 28, p. 3323–3335, 2012.

Lindow, S.E. e Brandl, M.T, *Microbiology of the Phyllosphere*, Applied and Environmental Microbiology, 69 (4), p. 1875–1883, 2003.

Lisingen, L.V. e Cervi, A.C., *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart., nova ocorrência para a flora do Estado do Paraná. *Acta Biol. Par.*, Curitiba, 38 (3-4), p. 187-192, 2009.

Lopandic, K., Molnár, O., Prillinger, H., Application of ITS sequence analysis, RAPD and AFLP fingerprinting in characterising the yeast Genus *Fellomyces*. *Microbiological Research*, 160, p. 13—26, 2005.

Lorenzi, G.M.A.C. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart – Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Paraná, 156 pp., 2006.

Lorenzi, H., *Flora Brasileira: Arecaceae (Palmeiras)*. Editora Plantarum, 1ª edição, 384pp., 2010.

Lu, H., Wagner, H.H., Chen, X., A contribution diversity approach to evaluate species diversity. *Basic and Applied Ecology*, 8, p. 1-12, 2007.

Lugtenberg, B.J.J., Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81, p. 373–383, 2002.



Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, p. 506–577, 2002.

Magurran, A. E. Ecological diversity and its measurements. New Jersey: Princeton University Press, pp. 179, 1988.

Malboobi, M.A., Owlia, P., Behbahani, M., Sarokhani, E., Moradi, S., Yakhchali, B., Deljou, A., Heravi, K.M., Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. *World J Microbiol Biotechnol.*, 25, p. 1471–1477, 2009.

Maldonado-Mendoza, I.E., Dewbre, G.R., Harrison, M.J., A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular plant-microbe interactions*, 14 (10) p. 1140 -1148, 2001.

Maor, R., Haskin, S., Levi-Kedmi, H., and Sharon, A., In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 3, p. 1852–1854, 2004.

Mariano, R. L. R., Lira, R. V. I., Silveira, E. B., Menezes, M. Levantamento de fungos endofíticos e epifíticos em folhas de coqueiro no Nordeste do Brasil. I. Freqüência da população fúngica e efeito da hospedeira. *Agrotópica*, 9, p. 127-134, 1997.

Masoud, W. & Jespersen, L., Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *International Journal of Food Microbiology* 110, p. 291–296, 2006

Matano, Y., Hasunuma, T., Kondo, A., Display of cellulases on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* for high yield ethanol production from high-solid lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 108, p. 128–133, 2012.

Mautone, J.N., Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de folhas de figueiras do Parque de Itapuã, RS, Brasil. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, pp.113, 2008.

McCullagh, P., Generalized linear models. *European Journal of Operational Research*, 16(3), p. 285-292, 1984.

McCullagh, P. & Nelder, J.A. *Generalized Linear Models*, Second Edition, Ed. Chapman & Hall/CRC - Monographs on Statistics & Applied Probability), 1989.

Mendes, G.O., Freitas, A.L.M, Pereira, O.L., Silva, I.R., Vassilev, N. B., Costa, M.D.C., Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Ann Microbiol*, 64, p. 239–249, 2014.

Mercier, J. e Lindow, S. E., Role of Leaf Surface Sugars in Colonization of Plants by Bacterial Epiphytes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(1) p.369-374, 2000.

Miller, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3), p. 426-428, 1959.

Ministério do Desenvolvimento Agrário – MDA e Secretaria da Agricultura Familiar – SAF – Brasil, Cartilha Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel - Inclusão Social e Desenvolvimento Territorial, disponível em: <http://www.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/nsmail.pdf>, acessado em: 17 de julho de 2012.

Miyamoto, T., Kawahara, M. Minamisawa, K., Novel endophytic nitrogen-fixing clostridia from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl Environ Microbiol*, 70, p. 6580–6586, 2004.

Morais, P.B., Martins, M.B., Klaczko, L.B., Mendonça-Hagler, L.C., Hagler, A.N. Yeast succession in the Amazon fruit *Parahancornia amapa* as resource partitioning among *Drosophila* spp., *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(12) p. 4251–4257, 1995.

Moreira, F.M.S. e Siqueira, J.O., Ecologia do solo (Capítulo 3), em: *Microbiologia e Bioquímica do Solo*, dos mesmos autores. 2.ed., Editora UFLA, Lavras/MG, p.83-161, 2006.

Moreira, I.M.V., Miguel, M.G.C.P, Duarte, W.F., Dias, D.R., Schwan, R.F. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *Food Research International*, 54, p. 9–17, 2013.

Motta, P.E.F, Cury, N., Oliveira-Filho, A.T., Gomes, J.B.V., Ocorrência de macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais, *Pesq. Agrop. Bras.*, Brasília, v.37, n.7, p.1023-1031, 2002.

Moura, E.F, Motoike, S.Y., Ventrella, M.C., Sá Júnior, A.Q., Carvalho, M., Manfio, C.E., Efeito de diferentes auxinas e do TDZ na indução de calos embriogênicos em macaúba a partir de embriões zigóticos, em: *Resumos do 4º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel: “Biodiesel: Combustível Ecológico”*, editores, Pedro Castro Neto, Antônio Carlos Fraga - UFLA, p.1147-1152, Varginha, 2007a.

Moura, E.F, Motoike, S.Y., Ventrella, M.C., Sá Júnior, A.Q., Carvalho, M., Manfio, C.E., Uso de citocininas na regeneração in vitro de calos embriogênicos de macaúba, em: *Resumos do 4º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel: “Biodiesel: Combustível Ecológico”*, editores, Pedro Castro Neto, Antônio Carlos Fraga - UFLA, p.1142-1146, Varginha, 2007b.

Mundra, S., Arora, R., Stobdan, T., Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel temperature-, pH-, and salt-tolerant yeast, *Rhodotorula* sp. PS4, isolated from seabuckthorn rhizosphere, growing in cold desert of Ladakh, India. *World J Microbiol Biotechnol*, 27, p. 2387–2396, 2011.

MycoBank - International Mycological Association. Site, disponível em: <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Link=T&TableKey=1468261600000063&Rec=14266&Fields=All> ). Acessado em 10/02/2014.

Nagarajan, S., New Tools for Exploring “Old Friends—Microbial Lipases”. Appl Biochem Biotechnol, 168, p. 1163–1196, 2012.

Nakayan, P., Hameed, A., Singh, S., Young, L.S., Hung, M.H., Young, C.C., Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. Plant Soil, 373, p. 301–315, 2013.

Narsian, V., Samaha, A.A. S. M., Patel, H.H., Rock phosphate dissolution by specific yeast. Indian J Microbiol., 50, p. 57–62, 2010.

Nassar, A.H., El-Tarabily, K.A., and Sivasithamparam, K., Promotion of Plant Growth by an Auxin-Producing Isolate of the Yeast *Williopsis saturnus* Endophytic in Maize (*Zea mays* L.) Roots, J. Biol. Fertil. Soils, vol. 42, no. 2, pp. 97–108, 2005.

Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., Jones, J.D.G., A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. Science 312, p. 436–439, 2006.

Nenwani, V., Doshi, P., Saha, T., Rajkumar, S., Isolation and characterization of a fungal isolate for phosphate solubilization and plant growth promoting activity. Journal of Yeast and Fungal Research Vol. 1(1) p. 9-14, 2010.

Nuobariene, L., Hansen, A.S., Jespersen, L., Arneborg, N., Phytase-active yeasts from grain-based food and beer. Journal of Applied Microbiology 110, p. 1370–1380, 2011.

Nuobariene, L., Hansen, A.S., Arneborg, N., Isolation and identification of phytase-active yeasts from sourdoughs. LWT - Food Science and Technology 48, p. 190-196, 2012.

Nyanga, L.K., Nout, M.J.R., Gadaga, T.H., Theelen, B., Boekhout, T., Zwietering, M.H., Yeasts and lactic acid bacteria microbiota from masau (*Ziziphus mauritiana*) fruits and their fermented fruit pulp in Zimbabwe. International Journal of Food Microbiology, 120, p. 159–166, 2007.

Okeke, C. N. & Okolo, B. N., The effect of cultural conditions on the production of lipase by *Acremonium strictum*. Biotechnology Letters, 12 (10), p. 747-750, 1990.

Oliveira, F., (2009) Equacionando os problemas do extrativismo (III), disponível em: <http://ongtremmacaubeiros.blog.terra.com.br/2009/03/>. Acessado em 15 de junho de 2012.

Oliveira, F.A.M., A produção de óleos vegetais de macaúba e seus co-produtos na região metropolitana de Belo Horizonte. In: 3º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, óleos, Gorduras e Biodiesel, Varginha, 2006. CD-Rom.

Oliveira, F.A.M. e Oliveira, C.F., Formação de macaubais por transplante de brotos nativos, em: Resumos do 4º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel: "Biodiesel: Combustível Ecológico", editores, Pedro Castro Neto, Antônio Carlos Fraga - UFLA, p. 628-633, Varginha, 2007.

Oliveira, C.A., Alves, V.M.C. Marriel, I.E., Gomes, E.A., Scotti, M.R., Carneiro, N.P., Guimarães, C.T., Schaffert, R.E., Sá, N.M.H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 1782-1787, 2009.

Olstorpe, M., Schnurer, J., Passoth, V., Screening of yeast strains for phytase activity. *FEMS Yeast Res* 9, p. 478–488, 2009.

Ousley, M.A., Lynch, J.M., Whipps, J.M., Potential of *Trichoderma* spp. as consistent plant growth stimulators, *Biology and Fertility of Soils* 17, 85–90, 1994.

Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O.S., Daniel, H., Vuyst, L., *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed *Malaysian* cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology*, 35, p. 73-85, 2013.

Paradigma, A Macaúba, disponível em: [http://www.paradigma.ind.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=61&Itemid=29](http://www.paradigma.ind.br/index.php?option=com_content&view=article&id=61&Itemid=29). Acessado em 15 de junho de 2012.

Patel, K.J., Singh, A.K., Nareshkumar, G., Archana, G., Organic-acid-producing, phytate-mineralizing rhizobacteria and their effect on growth of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Applied Soil Ecology*, 44, p. 252–261, 2010.

Pérez-Tienda, J., Valderas, A., Camañes, G., García-Agustín, P., Ferrol, N., Kinetics of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Mycorrhiza*, 22, p. 485–491, 2012.

Pérez-de-Mora, A., Reuter, B., Lucio, M., Ahne, A., Schloter, M., Pritsch, K., Activity of native hydrolytic enzymes and their association with the cell wall of three ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 23, p. 185–197, 2013.

Petrobrás S.A., Petrobrás Biocombustíveis S.A (2009), Relatório de Administração e Balanço Contábil, disponível em: [http://www.petrobras.com.br/pt/energia-e-tecnologia/include/pdf/03\\_RELATORIO\\_DE\\_ADMINISTRACAO\\_E\\_BALANCO\\_CONTABIL\\_2009.pdf](http://www.petrobras.com.br/pt/energia-e-tecnologia/include/pdf/03_RELATORIO_DE_ADMINISTRACAO_E_BALANCO_CONTABIL_2009.pdf). Acessado em 17 de julho de 2012.

Pimenta, R.S., Silva, J.F.M., Coelho, C.M., Morais, P.B., Rosa, C.A., Corrêa Jr., A., Integrated control of *Penicillium digitatum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis crataegensis* and sodium bicarbonate on oranges. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, p. 404-410, 2010.

Pinheiro, C. U. B. Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Hom.; Rutaceae) no Maranhão, Brasil. Acta Botânica Brasilica, São Paulo, v.16, n.2, p.141-150, 2002.

Pradhan, N. e Sukla, L.B., Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. African J Biotechnol., 5, p. 850–855, 2006.

Prasad, A., Kumar, S., Pandey, A., Chand, S., Microbial and chemical sources of phosphorus supply modulate the yield and chemical composition of essential oil of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) in sodic soils. Biol Fertil Soils, 48, p.117–122, 2012.

Prasanna,R., Joshi, M., Rana, A., Nain, L., Modulations of IAA Production in Cyanobacteria by Tryptophan and Light. Polish Journal of Microbiology, 59, 2, p. 99-105, 2010.

Prates, C.P.T., Pierobon, E.C., Costa, R.C., Formação do mercado de biodiesel no Brasil. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p. 39-64, 2007 – Disponível em:

[http://www.bndespar.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes\\_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set2502.pdf](http://www.bndespar.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set2502.pdf), acessado em 29 de julho de 2012.

Prillinger, H., Kraepelin, G., Lopandic, K., Schweigkofler, W., Molnar, O., Weigan, F., Dreyfuss, M.M., New species of *Fellomyces* Isolated from Epiphytic Lichen Species. System. Appl. Microbiol. 20, p. 572-584, 1997.

Prusty, R., Grisafi, P., Fink, G.R., The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, p. 4153–4157, 2004.

Pujadas, G., Ramirez, F.M., Valero, R., Palau, J., Evolution of  $\beta$ -amylase: Patterns of variation and conservation in subfamily sequences in relation to parsimony mechanisms. Proteins, v.25, n.4, p.456-472, 1996.

R development core team, R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, 2012.

Rahamath Bivi, M., Farhana, M.S.F., Khairulmazmi, A., Idris, A. Control of *Ganoderma boninense*: A Causal Agent of Basal Stem Rot Disease in Oil Palm with Endophyte Bacteria In Vitro. Int. J. Agric. Biol., 12, 6, p. 833-839, 2010.

Ramos, L.P., Kucek, K.T., Domingos, A.K., Wilhelm, H.M., Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil (2003) Disponível em:

[http://www.faculdadesantamaria.com.br/web/sustentabilidade/templates/rt\\_catalyst\\_j15/download/biodiesel.pdf](http://www.faculdadesantamaria.com.br/web/sustentabilidade/templates/rt_catalyst_j15/download/biodiesel.pdf), acessado em 29 de julho de 2012.

Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 (3) p. 597-635. 1998.

- Rawlings, N. D. e A. J. Barrett., Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 290, p.205–218, 1993.
- Ray, M.K., Devi, K.U., Kumar, G.S., Shivaji, S., Extracellular protease from the antarctic yeast *Candida humicola*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(6), p. 1918-1923, 1992.
- Reis, H., Pfiffi, S., Hahn, M., Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 6, 257–267, 2005.
- Reineke, G., Heinze, B., Schirawski, J., Buettner, H., Kahmann, R., Basse, C.W., Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. *Molecular Plant Pathology*, 9 (3), p. 339–355, 2008.
- Ribas R.P., Miguel, L. A., Extração e Comercialização de Folhagens Ornamentais da Mata Atlântica: o Caso da Verdes (*Rumohra adiantiformis*) no RS. *RER*, Rio de Janeiro, vol. 42, nº 04, p. 575-596, 2004.
- Ribeiro, B.D, Castro, A.M., Coelho, M.A.Z., Freire, D.M.G., Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. *Enzyme Research*, p. 1-16, 2011a.
- Ribeiro, L.M., Souza, P.P., Rodrigues Jr., A.G., Oliveira, T.G.S., Garcia, Q.S., Overcoming dormancy in macaw palm diaspores, a tropical species with potential for use as bio-fuel, *Seed Sci. & Technol.*, 39, p. 303-317, 2011b.
- Richardson, A.E. e Hadobas, P. A., Soil isolates of *Pseudomonas* sp. that utilize inositol phosphates. *Can. J. Microbiol.* 43, p. 509–516, 1997.
- Richardson, A.E., Barea, J.M., McNeill, A.M., Prigent-Combaret, C., Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321, p. 305–339, 2009.
- Rincón, A., Priha, O., Sotta, B., Bonnet, M., Le Tacon, F., Comparative effects of auxin transport inhibitors on rhizogenesis and mycorrhizal establishment of spruce seedlings inoculated with *Laccaria bicolor*. *Tree Physiol.*, vol. 23, nº 11, p. 785–791, 2003.
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., Bashan, Y., Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria, *Plant and Soil*, 287(1/2), p. 15-21, 2006.
- Rodríguez, H. e Fraga, R., Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17, p. 319–339, 1999.
- Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F.N., López-López, A., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A., Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation / storage phase of ripe olive processing. *Food Microbiology*, 27, p. 604-612, 2010.

Rodrigues, K. F., The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia* 86, p. 376-385, 1994.

Robles-Medina, A., González-Moreno, P.A., Esteban-Cerdán, L., Molina-Grima, E., Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, 27, p. 398–408, 2009.

Rubio Neto, A., Silva, F.G., Sales, J.F., Reis, E.F, Silva, M.V.V., Souza, A.L., Effect of drying and soaking fruits and seeds on germination of macaw palm (*Acrocomia aculeata* [Jacq.] Loddiges ex MART.), *Acta Scientiarum. Agronomy Maringá*, v. 34, n. 2, p. 179-185, 2012.

Ryu, K., Kim, J., Dordick, J.S., Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile. *Enzyme Microb. Technol.*, 16, p. 266-275, 1994,

Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M., Faeth, S.H., Evolution of endophyte plant symbioses. *Trends Plant Science*, 9, p. 275–280, 2004.

Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., Bhatti, A.S., Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 635–648, 2007.

Salihua, A., Alama, M.Z., AbdulKarima, M.I., Salleha, H.M., Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69, p. 66–73, 2011.

Sano, K., Fukuhara, H., Nakamura, Y., Phytase of the yeast *Arxula adenivorans*. *Biotechnology Letters* 21, p. 33–38, 1999.

Santana, G.C.S, Andrade, T.C.Q., Florêncio, A., Oleaginosas para produção de biodiesel no estado da Bahia a partir da agricultura familiar, em: Resumos do 4º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel: “Biodiesel: Combustível Ecológico”, editores, Pedro Castro Neto, Antônio Carlos Fraga - UFLA, p. 1217-1226, Varginha, 2007.

Santo, D.E., Galego, L., Gonçalves, T., Quintas, C., Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits' fermentations. *Food Research International*, 47, p. 45–50, 2012.

Sarkar, P., Bosneaga, E., Auer, M., Plant cell walls throughout evolution: towards a

Schulz, B. e Boyle, C., The endophytic continuum, *Mycol. Res.* 109 (6): p. 661–686, 2005.

Scorzetti, G., Fell, J. W., Fonseca, A. & Statzell-Tallman, A. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res* 2, p. 495–517, 2002.

- Shah, J., Lipids, Lipases, and Lipid-Modifying Enzymes in Plant Disease Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, p. 229–60, 2005.
- Shi, Y., Lou, K., Li, C., Promotion of plant growth by phytohormone-producing endophytic microbes of sugar beet. *Biol Fertil Soils*, 45, p.645–653, 2009.
- Shin, M., Shinguu, T., Sano, K., Umezawa, C., Metabolic Fates of L-Tryptofano in *Saccharomyces uvarum* (*Saccharomyces carlsbergensis*). *Che., Pharm. Bull.*, 39 (7) p. 1792-1795, 1991.
- Silva, E.G., Borges, M. F., Medina, C., Piccoli, R.H., Schwan, R.F., Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Res.* 5, p.859–65, 2005.
- Silva, J.C., Macaúba: Fonte de matéria-prima para os setores alimentício, energético e industrial. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Engenharia Florestal, Viçosa, MG, 63 pp., 2007.
- Silva, M.S., Atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas da fermentação do cacau. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Estadual de Feira de Santana, pp. 82, 2011.
- Silva-Filho, E.A., Santos, S.K.B., Resende, A.M., Morais, J.O.F., Morais Jr, M.A., Simões, D.A., Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*, 88, p. 13–23, 2005.
- Singh, J.S. e Pandey, V.C., Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 140, p. 339–353, 2011.
- Singh, H. e Reddy, M.S., Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *European Journal of Soil Biology*, 47, p. 30 – 34, 2011.
- Singh, B. e Satyanarayana, T., Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion. *Physiol Mol Biol Plants*, 17(2), p. 93–103, 2011.
- Skory, C.D. & Freer, S.N., Cloning and Characterization of a Gene Encoding a Cell-Bound, Extracellular  $\beta$ -Glucosidase in the Yeast *Candida wickerhamii*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 518–525, 1995.
- Smith, S.E. e Smith, F.A., Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, p.227–50, 2011.
- Soares J. D. R., Rodrigues, F. A., Pasqual, M., Nunes, C. F., Araujo, A. G., Germinação de embriões e crescimento inicial in vitro de macaúba. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.41, n.5, p.773-778, 2011.



Sosa-Morales, M. E., Guevara-Lara, F., Mart3nez-Juarez, M., Paredes-Lopez, O., Production of indole-3-acetic acid by mutant strains of *Ustilago maydis* (maize smut / huitlacoche). *Appl Microbiol Biotechnol*, 48, p. 726-729, 1997.

Steinkellner, S., Lenzemo, V., Langer, I., Schweiger, P., Khaosaad, T., Toussaint, J.P., Vierheilig, H., Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant–fungus interactions. *Molecules*, 12, p.1290-1306, 2007.

Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260, p. 214–216, 1993.

Stoll, M., Begerow, D., Oberwinkler, F., Molecular phylogeny of *Ustilago*, *Sporisorium*, and related taxa based on combined analyses of rDNA sequences. *Mycol. Res.*, 109 (3), p. 342–356, 2005.

Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G. van Rensburg, P., Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 91, p. 182-190, 2001.

Stringini, M., Comitini, F., Taccari, M., Ciani, M., Yeast diversity in crop-growing environments in Cameroon. *Int. J. Food Microbiology*, 127, p.184–189, 2008.

Stringini, M., Comitini, F., Taccari, M., Ciani, M., Yeast diversity during tapping and fermentation of palm wine from Cameroon. *Food Microbiology*, 26, p. 415–420, 2009.

Summerbell, R.C., Gueidan, C., Schroers, H., Hoog, G.S., Starink, M., Arocha Rosete, Y., Scott, J.A., *Acreonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Studies in Mycology*, 68, p. 139-162, 2011.

Sundara Rao, W.V.B. e Sinha, M.K., Phosphate dissolving organisms in the soil and rhizosphere. *Ind. J. Agric.Sci.* 33, p. 272-278, 1963.

Tadych, M., Bergen, M.S., Cicalese, J.J., Polashock, J.J., Vorsa, N., White Jr., J.F., Endophytic and pathogenic fungi of developing cranberry ovaries from flower to mature fruit: diversity and succession. *Fungal Diversity*, 54, p. 101–116, 2012.

Takashima, M., Sugita, T., Van, B.H., Nakamura, M., Endoh, R., Ohkuma, M., Taxonomic Richness of Yeasts in Japan within Subtropical and Cool Temperate Areas. *PlosOne*, 7, Issue 11, 2012.

Tang, J., Leung, A., Leung, C., Lim, B.L., Hydrolysis of precipitated phytate by three distinct families of phytases. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, p. 1316–1324, 2006.

Taylor, J.E., Hyde, K.D., Jones, E.B.G., Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. *New Phytol.*, 142, p.335-346, 1999.

Teather, R.M e Wood, P.J., Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterizations of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, p. 777-780, 1982.

Tenberge, K. B., Beckedorf, M., Hoppe, B., Schouten, A., Solf, M., von den Drieschln, M., In situ localization of AOS in host–pathogen interactions. *Microsc. Microanal.* 8 (Suppl. 2), 250–25, 2002.

Thompson, I. P., Bailey, M. J., Fenlon, J. S., Fermor, T. R., Lilley, A. K., Lynch, J. M., McCormack, P. J., McQuilken, M. P., Purdy, K. J., Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant Soil* 150:177–191, 1993.

Thongekkaew, J., Khumsap, A., Chatsa-nga, P., Yeasts in mixed deciduous forest areas of Phujong Nayoy National Park and their ability to produce xylanase and carboxymethyl cellulose. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, 34 (2), p. 157-163, 2012.

Thongekkaew, J., Ikeda, H., Masaki, K., Iefuji, H., An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 60, p. 140–146, 2008.

Thuita, M., Pypers, P., Herrmann, L., Okalebo, R.J., Othieno, C., Muema, E., Lesueur, D., Commercial rhizobial inoculants significantly enhance growth and nitrogen fixation of a promiscuous soybean variety in Kenyan soils. *Biol Fertil Soils*, 48, p.87–96, 2012.

Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Suzzi, G., Corsetti, A., Yeast biota associated to naturally fermented table olives from different Italian cultivars. *International Journal of Food Microbiology*, 161, p. 203–208, 2013.

Tonomura, K. & Tanabe, O., Localization of cell-bound  $\alpha$ -amylase in *Aspergillus oryzae* demonstrated by fluorescent-antibody technique. *J. Bacteriology*, 87, 1964.

Torsvik, V. e Ovreas, L., Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5, p.240–245, 2002.

Trindade, R.C., Resende, M.A., Silva, C.M., Rosa, C.A., Yeasts Associated with Fresh and Frozen Pulps of Brazilian Tropical Fruits. *System. Appl. Microbiol.* 25, p. 294–300, 2002.

Tsang, P. Differential Phytate Utilization in *Candida* species. *Mycopathologia* 172, p. 473–479, 2011

Tsavkelova, E. A. Klimova, S.Y., Cherdyntseva, T. A., Netrusov, A. I., Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 42, No. 2, p. 117–126, 2006.

Tsavkelova, E. A. Cherdyntseva, T. A., Netrusov, A. I., Botina, S. G., Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research* 162, p. 69 – 76, 2007.

Tseng, Y.H., Fang, T.J., Tseng, S.M., Isolation and Characterization of a Novel Phytase from *Penicillium simplicissimum*. *Folia Microbiol* 45 (2), p. 121-127, 2000.

Tuomisto, H., A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 1. Defining beta diversity as a function of alpha and gamma diversity. *Ecography*, 33, p. 2-22, 2010a.

Tuomisto, H. A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 2. Quantifying beta diversity and related phenomena. *Ecography*, 33, p. 23-45, 2010.

Vadkertiová, R., Molnárová, J., Vránová, D., Sláviková, E., Yeasts and yeast-like organisms associated with fruits and blossoms of different fruit trees. *Can. J. Microbiol.* 58, p.1344–1352, 2012.

Valente, P. et al., *Bandoniozyma* gen. nov., a Genus of Fermentative and Non-Fermentative Tremellaceous Yeast Species. *PlosOne*, v. 7, Issue 10, 2012.

van Kan, J.A.L., van 't Klooster, J. W., Wagemakers, C. A. M., Dees, D. C. T., van der Vlugt-Bergmans, C. J. B., Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10, 30–38, 1997.

Vieira, A.T., Terrones, M.G.H., Epoglou, A., Batista, A.C.F, Os princípios da química verde e suas aplicações na produção de biodiesel, em: Resumos do 4º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel: “Biodiesel: Combustível Ecológico”, editores, Pedro Castro Neto, Antônio Carlos Fraga - UFLA, p. 1227-1235, Varginha, 2007.

Vieira, M.L.A., Diversidade e bioprospecção de fungos endofíticos associados a plantas bioativas de diferentes ecossistemas brasileiros. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, pp. 132, 2012.

Vilela, D.,M., Pereira, G.V.M., Silva, C.F., Batista, L.R., Schwan, R.F., Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, 27, p. 1128-1135, 2010.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M., *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40, p.1–10, 2008.

Vujanovic, V., Mavragani, D., Hamel, C., Fungal communities associated with durum wheat production system: A characterization by growth stage, plant organ and preceding crop. *Crop Protection*, 37, p. 26 – 34, 2012.

Wang, L., Chi, Z., Wang, X., Liu, Z., Li, J., Diversity of lipase-producing yeasts from marine environments and oil hydrolysis by their crude enzymes. *Annals of Microbiology*, 57 (4), p. 495-501, 2007.

Wang, Q., Jia, J., Bai, F., *Pseudozyma hubeiensis* sp. nov. and *Pseudozyma shanxiensis* sp. nov., novel ustilaginomycetous anamorphic yeast species from plant leaves. *Int. J. of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, p. 289–293, 2006.

Warren, R. C., The effect of pollen on the fungal leaf microflora of *Beta vulgaris* L. and on infection of leaves by *Phoma betae*. *Neth. J. Plant Pathol.* 78:89–98, 1972.

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

Whittaker, R. H. Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs*, 30, p. 279–338, 1960.

Winkler, U. K. e Stuckmann, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of bacteriology*, Vol.138 (3), p. 663-70, 1979.

Wu, Z., Robert, V., Bai, F., Genetic diversity of the *Pichia membranifaciens* strains revealed from Rrna gene sequencing and electrophoretic karyotyping, and the proposal of *Candida californica* comb.nov. *FEMS Yeast Res*, 6, p. 305–311., 2006.

Wulff, E.G., van Vuurde, J.W.L., Hockenhull, J., The ability of the biological control agent *Bacillus subtilis*, strain BB, to colonise vegetable brassicas endophytically following seed inoculation. *Plant Soil* 255, 463–474, 2003.

Xiao, C., Chi, R., Pan, X., Liu, F., He, J., Rock phosphate solubilization by four yeast strains. *Ann Microbiol*, 63, p. 173–178, 2013.

Xin, G., Glawe, D., Doty, S.L., Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid-producing yeasts occurring in *Populus* trees, *Mycological Research*, Vol. 113, Issue 9, p. 973–980, 2009.

Yadav, V., Kumar, M., Deep, D.K, Kumar, H., Sharma, R., Tripathi, T., Tuteja, N., Saxena, A.K., Johri, A.K., A Phosphate Transporter from the Root Endophytic Fungus *Piriformospora indica* Plays a Role in Phosphate Transport to the Host Plant. *J. Biolog. Chemistry*, 285 (34), p. 26532–26544, 2010.

Yan, S. & Wu, G., Secretory pathway of cellulase: a mini-review. *Biotechnology for Biofuels*, 6, p. 177, 2013.

Zhang, H.W., Song, Y.C., Tan, R.X., Biology and chemistry of endophytes, *Natural Products Reports*, 23, p. 753–771, 2006.

Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L., Selection and evaluation of new antagonists for their efficacy against postharvest brown rot of peaches Postharvest Biology and Technology, 55, p.174–181, 2010.

Zhao, J.H., Bai, F.Y., Guo, L.D., and Jia, J.H., *Rhodotorula pinicola* sp. nov., a Basidiomycetous Yeast Species Isolated from Xylem of Pine Twigs, FEMS Yeast Res., vol. 2, no. 2, pp. 159–163, 2002.

Zhao, Y., Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. Annu. Rev. Plant Biol., 61, p. 49–64, 2010.

**APÊNDICE A: Frutos x Palmeiras x Período de coleta**

1ª Coleta 26/04/2011		2ª Coleta 02/05/2011		3ª Coleta 09/05/2011		4ª Coleta 16/05/2011		5ª Coleta 23/05/2011		6ª Coleta 30/05/2011	
Frutos	Planta	Frutos	Planta	Frutos	Planta	Frutos	Planta	Frutos	Planta	Frutos	Planta
F1	P1	F25	P1	F53	P1	F81	P1	F109	P1	F137	P1
F2		F26		F54		F82		F110		F138	
F3		F27		F55		F83		F111		F139	
F4		F28		F56		F84		F112		F140	
F5	P2	F29	P1	F57	P2	F85	P2	F113	P2	F141	P2
F6		F30		F58		F86		F114		F142	
F7		F31		F59		F87		F115		F143	
F8		F32		F60		F88		F116		F144	
F9	P3	F33	P2	F61	P3	F89	P3	F117	P3	F145	P3
F10		F34		F62		F90		F118		F146	
F11		F35		F63		F91		F119		F147	
F12		F36		F64		F92		F120		F148	
F13	P4	F37	P3	F65	P4	F93	P4	F121	P4	F149	P4
F14		F38		F66		F94		F122		F150	
F15		F39		F67		F95		F123		F151	
F16		F40		F68		F96		F124		F152	
F17	P5	F41	P4	F69	P5	F97	P5	F125	P5	F153	P5
F18		F42		F70		F98		F126		F154	
F19		F43		F71		F99		F127		F155	
F20		F44		F72		F100		F128		F156	
F21	P6	F45	P5	F73	P6	F101	P6	F129	P6	F157	P6
F22		F46		F74		F102		F130		F158	
F23		F47		F75		F103		F131		F159	
F24		F48		F76		F104		F132		F160	
F49	P7	F77	P7	F105	P7	F133	P7	F161	P7	F165	P7
F50		F78		F106		F134		F162		F166	
F51		F79		F107		F135		F163		F167	
F52		F80		F108		F136		F164		F168	

**APÊNDICE B:** Descrição das características macro morfológicas das leveduras isoladas dos frutos da macaúba.

<b>Morfotipo</b>	<b>Características</b>
<b>M1</b>	Branca, lisa, brilhante, borda lisa, cremosa
<b>M2</b>	Branca, lisa, sem brilho, borda lisa, cremosa
<b>M3</b>	Laranja, lisa, sem brilho, borda lisa, cremosa
<b>M4</b>	Salmão, lisa, brilhante, borda lisa, mucóide
<b>M5</b>	Rosa claro, borda filamentosa, centro elevado, cremosa
<b>M6</b>	Bege, rugosa, fosca, borda irregular, centro elevado, cremosa
<b>M7</b>	Amarelo/bege, lisa, mucóide
<b>M8</b>	Branca/bege, irregular, opaca, borda filamentosa, ponto branco no centro
<b>M9</b>	Branca perolada, lisa, brilhante, cremosa
<b>M10</b>	Bege, fosca, colônias grandes expansivas, cremosa
<b>M11</b>	Branca, achatada, opaca, borda brilhante, ponto no centro, cremosa
<b>M12</b>	Branca, lisa, opaca, cremosa
<b>M13</b>	Branca perolada, lisa, brilhante, achatada, cremosa
<b>M14</b>	Branco/bege, rugosa, borda filamentosa, aspecto de flor, cremosa
<b>M15</b>	Bege, rugosa, fosca, aspecto de "chantilly", cremosa
<b>M16</b>	Bege, fosca, borda filamentosa, cremosa
<b>M17</b>	Bege, lisa, brilhante, cremosa
<b>M18</b>	Amarela, rugosa, centro e borda elevados, cremosa
<b>M19</b>	Rosa/bonina, rugosa
<b>M20</b>	Branca, translúcida, lisa, borda regular, cremosa

**APÊNDICE C:** Relação de leveduras agrupadas segundo padrão de bandeamento obtido nos ensaios de PCR *fingerprinting* utilizando o iniciador GTG<sub>5</sub> (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3')

Leveduras agrupadas segundo padrão de bandeamento	Grupo pertencente
ENC106Ia, EN47I, EN49Ia, EN69Ia, EN75Ib, EN77I, EN81Ia, EN81IIa, EN102, EN114I, EN139I, EN145I, EN149I, EN153I, EN161I, 5IIa, 7I, 10, 16I, 18I, 29Ia, 35IIa, 38Ia, 41Ia, 41Ib, 46Ia, 51Ia, 53Ia, 57Ia, 59Ia, 59IVa, 61Ia, 71Ia, 73Ia, 77Ia, 90Ia, 92Ia, 93Ia, 97I, 109I, 117I, 121I, 125I, 130I, 133I, 145I, 149I, 156I, 85I, 101I, 6IIb, 8II, 8V, 9Ia, 13Ia, 14Ia, 14Ib, 17IVa, 17IVb, 19IIa, 19IIb, 35Ib, 88Ia, 115I, 136IIa, 1, 5IIb, 67IIa (68 isolados)	1
11Ia, 11Ib, 6IIa (3 isolados)	2
89Ia, 89Ib (2 isolados)	3
EN142IIa, EN142IIb, 31II, 144IIa (4 isolados)	4
19Ib, 36Ib, 81Ib, 6Ia, 8III, 9IIa (6 isolados)	5
6V, 8I, 11IV, 86IIb, 88IVa, 114IV, 136IIa, 151IIa, 87IVa, 26IIa, 59III (11 isolados)	6
72IIa, 81IIIa, 92IIa, 30IIa, 76IV, 35Ia, 37IIa, 38IIIa, 56II, 60III, 65IIb (11 isolados)	7
12Ia, 12Ib, 29IIb, 88IIIb (4 isolados)	8
13IIb, 126II, 14IIb, 14IIa (4 isolados)	9
88II, 116IVa, 116IVb (3 isolados)	10
2I, 2IIIb, 23IIb, 138II (4 isolados)	11
29IIIa, 29IIIb (2 isolados)	13
40IIa, 44IIa (2 isolados)	14
7V, 40III (2 isolados)	15
97III, 135IIa (2 isolados)	16
75IIa, 76IIIa (2 isolados)	17
102II, 106IIIa, 134IIIa, 141IIIa, 150IVa, 150IVb (6 isolados)	18
EN105IIa, EN105IIb (2 isolados)	19
141IVa, 141IIIb (2 isolados)	20

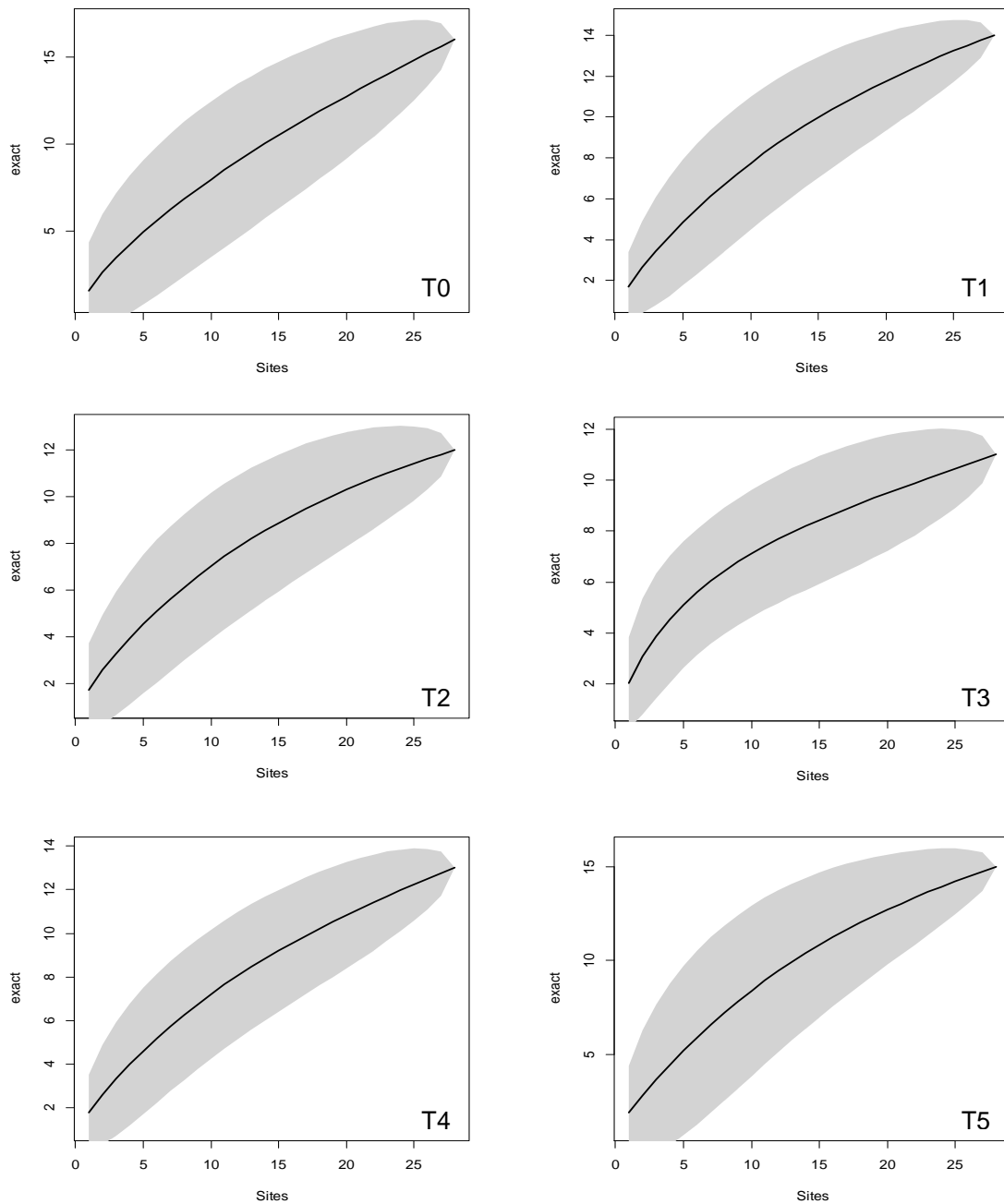


118III, 121III, 131IIa (3 isolados)	21
112III, 114IIIa (2 isolados)	22
149IIIa, 149IIIb (2 isolados)	23
EN81III, 5I, 81IVa, 115IVa, 115IVb, 141IIa, 141IIb, 150Va, 150Vb, 152IIa, 164IIIa, 11II, 18III, 47II, 51IIIa, 73II, 75IIIa, 76IIa (18 isolados)	24
85IIa, 90IIa, 92IIIa, 106IIa, 113IIIa, 142IIa, 81IIa, A (8 isolados)	25
ENC168, EN166Ia, EN168Ia (3 isolados)	26
102IIa, 165 (2 isolados)	27
152IV, 157IVa (2 isolados)	28
ENC46, EN44, EN53Ia, EN105Ia, EN58I, EN114II, EN142IIIb, 7II, 8IV, 11III, 13IV, 18II, 21I, 23I, 25Ia, 46Ib, 57IIa, 64Ia, 86Ia, 98II, 108IIb, 113I, 113IIIb, 165I, 87IVb, 75Ib, 127IIa, 136IIa, 149IIb, 150III, 160I, 84III, 89Ia, 89Ia, 16IIrec, 19Ia, 88Ib, 114IIb, 115IIIa, 143IIb, 57IIIa, 60IIa, 113IIa, 65IIa, 19Ib, 142IVa, 106IV, 115Va, 115Vb, 152IIb, 6IV, 23IIa, 82III, 83IIb, 84IIb, 87IIIa, 141Ib, 146II, 74II, 87I, 4, 13IIa, 105II, 142Vb, 51IV, 61II, 151IIIb, 51IIb, 57IVa, 84IIa, 115IIb, 100IIIa, 129III, 80II, 112II, 149IIa, 11V, 143IIb, 131IIb, 164IIa, 6III, 44IIIa, 129IIa, 145III, 7IV, 38II, 130II, 145II, 32III, 31V, 69II, 71IIa, 75IIIb, 118II, 150II, 119II, 25II, 138II, B, 69II, 65Ia, 81I, 107I, 30IIa, 25III, 89III, 31IV, 35III, 162I (109 isolados)	Padrões individuais

---

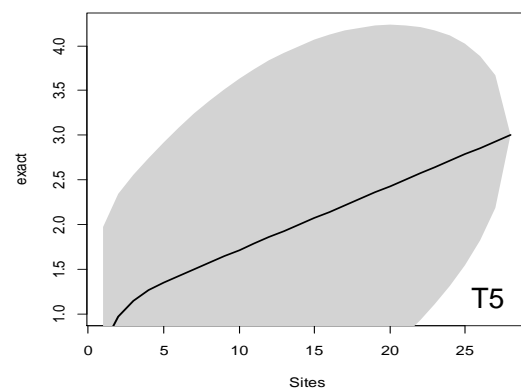
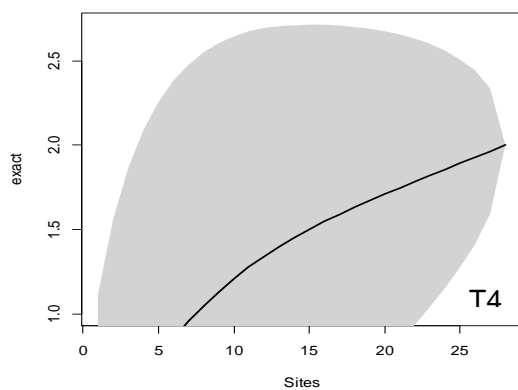
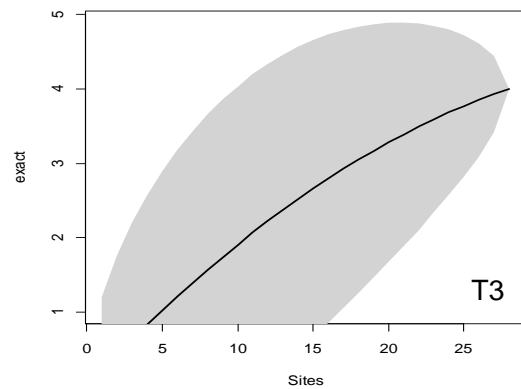
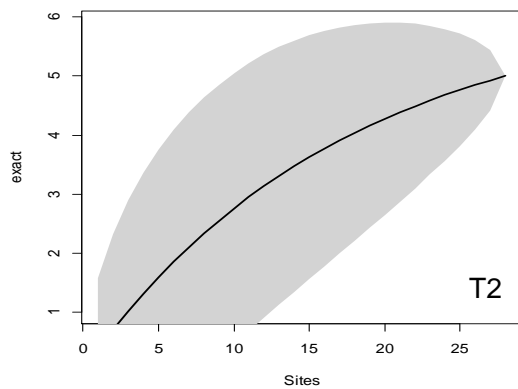
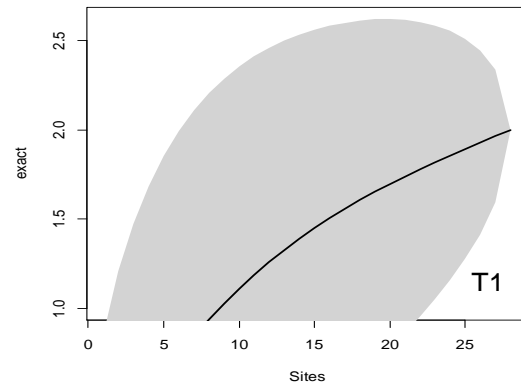
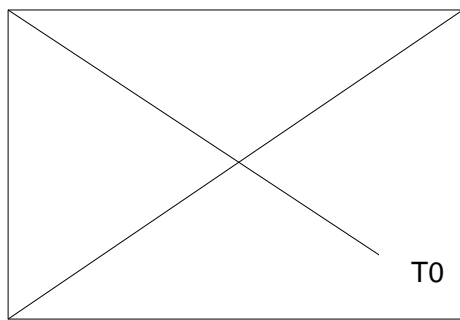
\* Grupo 12 inexistente.

**APÊNDICE D:** Curva de acumulação de espécies de leveduras epifíticas, para cada um dos períodos de coleta.



Foram consideradas as siglas T0 para o grupo de frutos levados diretamente ao laboratório depois de colhidos, T1, T2, T3, T4, T5, referem-se aos tempos de deposição dos frutos no solo antes do processamento: 7, 14, 21, 28 e 35 dias.

**APÊNDICE E:** Curva de acumulação de espécies de leveduras endofíticas, para cada um dos períodos de coleta. Foram consideradas as siglas T0 para o grupo de frutos levados diretamente ao laboratório depois de colhidos, T1, T2, T3, T4, T5, referem-se aos tempos de deposição dos frutos no solo antes do processamento: 7, 14, 21, 28 e 35 dias. A curva referente a T0 não foi obtida por possui apenas uma espécie.



**APÊNDICE F:** Comparação entre os valores de abundância naturais e os valores de abundância relativa de espécies epifíticas.

Espécies de leveduras isoladas	Valores de abundância naturais (UFC/fruto)						Valores de abundância relativa (%)					
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T0	T1	T2	T3	T4	T5
<i>Bandoniozyma complexa</i>	1,0E+05	0	1,4E+07	0	1,0E+07	0	0,069	0	1,688	0	0,421	0
<i>Bulleromyces nemorosus</i>	1,0E+06	0	0	0	0	0	0,687	0	0	0	0	0
<i>C. (Saccharomycopsis) amapae</i>	0	0	0	4,0E+05	1,0E+07	0	0	0	0	0,019	0,421	0
<i>Candida asiatica</i>	1,0E+05	0	0	0	0	0	0,069	0	0	0	0	0
<i>Candida boidinii</i>	0	4,0E+05	0	0	0	6,9E+06	0	0,111	0	0	0	0,081
<i>Candida californica</i>	0	0	0	1,0E+06	0	1,8E+06	0	0	0	0,049	0	0,021
<i>Candida carpophila</i>	0	3,0E+07	0	0	0	0	0	8,210	0	0	0	0
<i>Candida conglobata</i>	3,0E+07	0	3,0E+05	0	4,0E+05	0	20,412	0	0,036	0	0,017	0
<i>Candida cylindracea</i>	0	0	0	6,6E+07	8,9E+07	2,9E+08	0	0	0	3,186	3,722	3,342
<i>Candida natalensis</i>	0	0	1,0E+06	1,0E+05	0	0	0	0	0,119	0,005	0	0
<i>Candida sorboxylosa</i>	3,0E+05	4,0E+05	1,5E+06	1,7E+08	1,2E+08	7,9E+07	0,206	0,111	0,178	8,125	5,182	0,926
<i>Candida sp. 01</i>	1,0E+06	0	0	0	0	0	0,687	0	0	0	0	0
<i>Candida sp. 02</i>	0	0	0	1,1E+06	0	0	0	0	0	0,053	0	0
<i>Candida sp. 03</i>	0	0	0	0	0	1,2E+08	0	0	0	0	0	1,372
<i>Candida tallmaniae</i>	0	0	0	0	4,6E+08	7,3E+07	0	0	0	0	19,222	0,856
<i>Cryptococcus sp 02</i>	0	0	0	0	1,0E+05	0	0	0	0	0	0,004	0
<i>Cryptococcus sp. 01</i>	4,0E+05	0	2,0E+05	0	0	0	0,275	0	0,024	0	0	0
<i>Eballistra oryzae</i>	1,0E+05	0	0	0	0	0	0,069	0	0	0	0	0
<i>Fellomyces polyborus</i>	1,4E+06	0	1,1E+07	2,0E+06	7,0E+05	0	0,962	0	1,320	0,097	0,029	0
<i>Hannaella luteola</i>	0	2,0E+05	0	0	0	0	0	0,055	0	0	0	0
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	1,0E+06	5,5E+06	6,3E+06	7,7E+06	6,9E+06	2,9E+07	0,687	1,520	0,749	0,374	0,290	0,342
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	2,3E+07	2,0E+05	6,0E+05	3,6E+07	0	1,1E+08	15,464	0,055	0,071	1,745	0	1,301
<i>Metschnikowia sp</i>	1,0E+07	0	0	0	0	0	6,873	0	0	0	0	0

<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	7,5E+07	3,0E+08	8,0E+08	1,6E+09	1,7E+09	7,6E+09	51,340	81,783	95,279	79,882	70,107	89,367
<i>Occultifur externus</i>	0	0	0	0	4,0E+06	1,0E+06	0	0	0	0	0,168	0,012
<i>Ogataea sp</i>	0	0	0	0	1,0E+06	0	0	0	0	0	0,042	0
<i>Pichia kluyveri</i>	0	0	4,0E+05	0	0	0	0	0	0,048	0	0	0
<i>Pichia kudriavzevii</i>	0	1,8E+07	0	0	0	1,0E+05	0	4,921	0	0	0	0,001
<i>Pichia membranifaciens</i>	1,6E+06	1,0E+05	2,4E+06	8,9E+07	3,0E+06	1,1E+07	1,100	0,028	0,285	4,307	0,126	0,129
<i>Rhodotorula dairenensis</i>	0	1,0E+05	6,0E+05	0	0	7,0E+05	0	0,028	0,071	0	0	0,008
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0	8,0E+05	0	0	0	0	0	0,221	0	0	0	0
<i>Rhodotorula oryzae</i>	1,0E+06	0	0	0	0	0	0,687	0	0	0	0	0
<i>Rhodotorula sp.</i>	0	0	0	0	0	1,0E+06	0	0	0	0	0	0,012
<i>Sarocladium strictum</i>	0	0	0	0	1,0E+06	0	0	0	0	0	0,042	0
<i>Saturnispora sp.</i>	1,0E+05	2,0E+05	0	0	0	0	0,069	0,055	0	0	0	0
<i>Ustilago_sp</i>	0	1,0E+07	0	0	0	0	0	2,764	0	0	0	0
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0	0	0	2,0E+05	0	0	0	0	0	0,010	0	0
<i>Zygoascus hellenicus</i>	0	0	0	0	0	3,0E+07	0	0	0	0	0	0,352
Isolados não identificados	5,0E+05	5,0E+05	1,1E+06	4,4E+07	4,9E+06	1,6E+08	0,344	0,138	0,131	2,148	0,206	1,878
<b>Total</b>	<b>1,5E+08</b>	<b>3,6E+08</b>	<b>8,4E+08</b>	<b>2,1E+09</b>	<b>2,4E+09</b>	<b>8,5E+09</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**APÊNDICE G:** Resultados da aplicação de Modelos Lineares Generalizados (GLM) para avaliar possíveis associações entre tempo de deposição dos frutos de macaúba no solo e a palmeira da qual os frutos foram coletados na variação de riqueza e abundância das comunidades de leveduras associadas.

**Modelos lineares generalizados: endofíticos e epifíticos**

	Df	Deviance Resid.	Df Resid.	Dev	Pr(>Chi)
<b>Epifítico</b>					
<i>Abundância</i>					
NULL			41	0.20054	
Palmeira	6	0.029236	35	0.171303	0.1118
Tempo	5	0.08627	30	0.085033	<b>1.20E-05</b>
<i>Riqueza</i>					
NULL			158	1.3443	
Palmeira	6	0.1510	152	1.1933	<b>0.0071</b>
Tempo	5	0.0173	147	1.1760	0.8453
Palmeira:Tempo	30	0.2091	117	0.9669	0.7496
<b>Endofítico</b>					
<i>Abundância</i>					
NULL			36	0.76659	
Palmeira	6	0.085033	30	0.68155	0.6185
Tempo	5	0.169807	25	0.51175	0.1152
Palmeira:Tempo	8	0.179379	17	0.33237	0.3137
<i>Riqueza</i>					
NULL			36	1.50E-04	
Palmeira	6	3.64E-05	30	1.14E-04	0.1664
Tempo	5	1.44E-05	25	9.95E-05	0.6064

**APÊNDICE H.** Resultados do teste quantitativo de avaliação do potencial de produção de ácido indol-acético pelos isolados de levedura de palmeira macaúba.

Origem	Isolado	Identificação	Valor médio DO 600nm	Desvio padrão DO 600nm	Valor médio [AIA] µg/mL	Desvio padrão [AIA]	Relação [AIA] / DO 600nm
Epifítico	13 IV	<i>Bandoniozyma complexa</i>	0,55	0,09	20,55	1,05	37,33
Epifítico	64 I a	<i>Bandoniozyma complexa</i>	0,47	0	5,5	0,23	11,65
Epifítico	129 III	<i>Bandoniozyma complexa</i>	0,37	0,06	0,92	0,46	2,51
Epifítico	7 IV	<i>Bulleromyces nemorosus</i>	0,74	0,01	32,53	2,83	44,16
Epifítico	89 III	<i>Candida (Kurtzmaniella) natalensis</i>	0,67	0,12	7,52	0,88	11,21
Epifítico	106 IV	<i>Candida (Kurtzmaniella) natalensis</i>	0,66	0,01	8,1	0,04	12,27
Epifítico	25 I a	<i>Candida (Meyerozyma) carpophila</i>	0,98	0,03	7,85	1,53	8,03
Epifítico	29 III a	<i>Candida (Ogataea) boidinii</i>	1,08	0,02	34,43	5,44	31,82
Epifítico	31 II	<i>Candida (Ogataea) boidinii</i>	1,06	0,09	68,79	11,11	64,87
Epifítico	31 IV	<i>Candida (Ogataea) boidinii</i>	0,86	0,01	75,53	5,71	88,28
Endofítico	142 II a	<i>Candida (Ogataea) boidinii</i>	1,21	0,1	75,13	17,82	62,17
Epifítico	144 II a	<i>Candida (Ogataea) boidinii</i>	0,39	0,01	44,15	6,2	112,91
Epifítico	151 III b	<i>Candida (Ogataea) boidinii</i>	0,57	0,2	49,5	6,77	86,73
Epifítico	86 I a	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	0,73	0,09	10,16	1,84	13,97
Epifítico	87 I	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	0,87	0,16	106,73	17,5	122,49
Epifítico	112 II	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	0,8	0,04	8,23	0,39	10,24
Epifítico	112 III	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	1,03	0,09	11,78	0,41	11,39
Epifítico	114 II b	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	0,89	0,01	29,22	2,12	32,84
Epifítico	114 III a	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	0,98	0,05	25,85	1,44	26,47
Epifítico	115 III a	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	1,01	0,01	24,81	1,99	24,58
Epifítico	115 V a	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	0,81	0,07	6,78	2,32	8,33
Epifítico	141 IV a	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	0,84	0	26,59	2,27	31,65
Epifítico	150 III	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	0,38	0,05	4,7	0,88	12,48

Origem	Isolado			Identificação	Valor médio DO 600nm	Desvio padrão DO 600nm	Valor médio [AIA] µg/mL	Desvio padrão [AIA]	Relação [AIA] / DO 600nm
Epifítico	164	II	a	<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	0,4	0,11	12,54	0,68	31,6
Epifítico	84	III		<i>Candida (Pichia) californica</i>	0,33	0,01	9,91	0,49	30,21
Epifítico	149	II	b	<i>Candida (Pichia) californica</i>	0,18	0,01	1,21	0,46	6,7
Epifítico	88	II		<i>Candida (Saccharomyces) amapae</i>	0,65	0,06	32,87	0,98	50,87
Epifítico	116	IV	a	<i>Candida (Saccharomyces) amapae</i>	0,46	0,08	12,07	0,22	26,03
Epifítico	6	II	b	<i>Candida (Yadamazyma) conglobata</i>	0,02	0	0	0	0
Epifítico	11	I	a	<i>Candida (Yadamazyma) conglobata</i>	0,68	0,1	33,77	2,21	49,95
Endofítico	53	I	a	<i>Candida (Yadamazyma) conglobata</i>	0,89	0,04	1,59	0,2	1,78
Epifítico	57	II	a	<i>Candida (Yadamazyma) conglobata</i>	0,63	0,05	4,62	1,19	7,29
Epifítico	127	II	a	<i>Candida (Yadamazyma) conglobata</i>	0,84	0,22	22,38	6,85	26,77
Epifítico	113	I		<i>Candida (Yamadazyma) tallmaniae</i>	0,86	0,01	37,7	4,92	43,58
Epifítico	141	I	b	<i>Candida (Yamadazyma) tallmaniae</i>	0,72	0,01	38,5	2,83	53,21
Epifítico	162	I		<i>Candida (Yamadazyma) tallmaniae</i>	1,07	0,02	17,49	1,14	16,29
Epifítico	7	II		<i>Candida asiatica</i>	0,66	0,08	37,87	1,92	57,07
Epifítico	6	V		<i>Candida sorboxylosa</i>	0,73	0,24	31,89	0,14	43,58
Epifítico	8	I		<i>Candida sorboxylosa</i>	0,56	0,02	42,26	7,49	75,04
Epifítico	11	IV		<i>Candida sorboxylosa</i>	0,95	0,27	27,54	4,16	29
Epifítico	25	II		<i>Candida sorboxylosa</i>	0,96	0,12	7,13	0,93	7,46
Epifítico	26	II	a	<i>Candida sorboxylosa</i>	0,92	0,05	47,38	15,2	51,68
Epifítico	57	III	a	<i>Candida sorboxylosa</i>	0,83	0,07	25,4	1,33	30,69
Epifítico	59	III		<i>Candida sorboxylosa</i>	1,07	0,09	0	0	0
Epifítico	60	II	a	<i>Candida sorboxylosa</i>	0,71	0,01	11,33	1,26	15,87
Epifítico	81	II	a	<i>Candida sorboxylosa</i>	0,81	0,02	12,98	0,08	15,99
Epifítico	85	II	a	<i>Candida sorboxylosa</i>	0,68	0	13,23	0,03	19,42
Epifítico	86	II	b	<i>Candida sorboxylosa</i>	0,92	0,06	46,47	2,79	50,32



Origem	Isolado	Identificação	Valor médio DO 600nm	Desvio padrão DO 600nm	Valor médio [AIA] µg/mL	Desvio padrão [AIA]	Relação [AIA] / DO 600nm
Epifítico	87 IV a	<i>Candida sorboxylosa</i>	0,51	0,04	12,88	0,61	25,14
Epifítico	88 IV a	<i>Candida sorboxylosa</i>	0,55	0,11	27,26	4,27	49,39
Epifítico	90 II a	<i>Candida sorboxylosa</i>	0,71	0,05	71,63	4,48	100,45
Epifítico	92 III a	<i>Candida sorboxylosa</i>	0,4	0,05	16,74	1,16	41,39
Epifítico	106 II a	<i>Candida sorboxylosa</i>	0,66	0,02	10,29	0,39	15,54
Epifítico	113 II a	<i>Candida sorboxylosa</i>	0,57	0,06	11,91	0,54	21,02
Epifítico	113 III a	<i>Candida sorboxylosa</i>	0,72	0,04	23,31	0,83	32,19
Epifítico	114 IV	<i>Candida sorboxylosa</i>	0,52	0,02	12,18	1,38	23,57
Epifítico	115 II b	<i>Candida sorboxylosa</i>	0,57	0,14	14,9	2,34	26,27
Epifítico	136 II a	<i>Candida sorboxylosa</i>	0,57	0,18	9,43	1,18	16,62
Epifítico	142 II a	<i>Candida sorboxylosa</i>	0,48	0,02	7,61	0,77	15,79
Epifítico	149 III a	<i>Candida sorboxylosa</i>	0,76	0,06	48,85	4,62	63,88
Epifítico	151 II a	<i>Candida sorboxylosa</i>	1	0,04	14,08	2,38	14,07
Epifítico	23 I	<i>Candida sp 01</i>	0,32	0,36	25,02	0	78,68
Endofítico	44	<i>Candida sp.01</i>	0,9	0,02	34,93	1,04	38,73
ENC	46	<i>Candida sp.01</i>	0,74	0,06	20,77	2,38	28,22
Epifítico	89 I a	<i>Candida sp.02</i>	0,67	0,11	9,35	0,67	13,88
Epifítico	143 II b	<i>Candida sp. 03</i>	0,22	0,03	13,57	0,63	61,61
Endofítico	105 I a	<i>Candida stellimalicola</i> (clado irmão <i>Starmera</i> )	0,81	0,02	9,69	0,15	12
Epifítico	51 II b	<i>Cryptococcus sp 01</i>	0,53	0,11	12,89	0,56	24,34
Epifítico	51 IV	<i>Cryptococcus sp 01</i>	0,32	0,171841	5,66	0,77	17,41
Epifítico	61 II	<i>Cryptococcus sp 01</i>	0,11	0,01	6,67	0,52	61,98
Epifítico	74 II	<i>Cryptococcus sp 01</i>	0,63	0,02	7,52	1,35	11,89
Epifítico	130 II	<i>Cryptococcus sp. 02</i>	0,16	0,02	6,19	1,17	38,61
Epifítico	21 I	<i>Eballistra oryzae</i>	0,69	0,12	19,44	0,12	28,05
Epifítico	4	<i>Fellomyces polyborus</i>	0,81	0,15	30,93	2,07	38,42

Origem	Isolado	Identificação		Valor médio DO 600nm	Desvio padrão DO 600nm	Valor médio [AIA] µg/mL	Desvio padrão [AIA]	Relação [AIA] / DO 600nm	
Epifítico	13	II	a	<i>Fellomyces polyborus</i>	0,35	0,15	28,46	1,99	80,33
Epifítico	14	II	a	<i>Fellomyces polyborus</i>	0,2	0,24	17,85	0	90,57
Epifítico	98	II		<i>Fellomyces polyborus</i>	0,34	0,17	3,98	0,84	11,75
Epifítico	105	II		<i>Fellomyces polyborus</i>	0,34	0,04	3,44	0,15	10,01
Epifítico	126	II		<i>Fellomyces polyborus</i>	1,04	0,01	28,07	0,76	26,94
Epifítico	80	II		<i>Hannaella luteola</i>	0,22	0,04	11,06	1,41	50,06
Epifítico	38	II		<i>Hannaella luteola</i>	0,22	0,27	20,57	0	91,83
Epifítico	75	II	a	<i>Hanseniaspora clermontiae</i>	0,41	0,04	8,2	0,54	19,98
Epifítico	76	III	a	<i>Hanseniaspora clermontiae</i>	0,47	0,03	9,54	1,07	20,11
Epifítico	7	V		<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,67	0,02	33,43	1,93	49,58
Epifítico	30	II	a	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	1,1	0,08	38,37	2,2	34,73
Epifítico	37	II	a	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,56	0,06	7,82	0,42	13,96
Epifítico	38	III	a	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,8	0,09	20,46	1,3	25,73
Epifítico	40	III		<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,84	0,01	48,58	2,64	57,64
Epifítico	56	II		<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,84	0,06	10,68	1,9	12,72
Epifítico	60	III		<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,92	0	6,94	0,58	7,58
Epifítico	65	II	b	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,77	0,01	15,9	0,31	20,56
Endofítico	72	II	a	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,92	0,08	12,41	3,45	13,45
Epifítico	76	IV		<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,57	0,01	11,06	2,17	19,24
Epifítico	81	III	a	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,62	0,02	11,14	0,7	18
Epifítico	92	II	a	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,77	0,03	7,65	0,34	9,97
Epifítico	102	II		<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,7	0,18	11,56	2,38	16,52
Epifítico	106	III	a	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,7	0,04	24,56	0,76	34,93
Epifítico	118	III		<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,29	0,05	11,45	0,5	39,36
Epifítico	121	III		<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,4	0,08	9,42	0,76	23,38
Epifítico	131	II	a	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,38	0,01	14,64	2,91	38,94
Epifítico	134	III	a	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,34	0,04	14,4	1,5	42,21

Origem	Isolado			Identificação	Valor médio DO 600nm	Desvio padrão DO 600nm	Valor médio [AIA] µg/mL	Desvio padrão [AIA]	Relação [AIA] / DO 600nm
Epifítico	141	III	a	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	0,29	0,04	15,68	3,68	54,86
Epifítico	150	IV	b	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	1,34	0,01	7,59	0,26	5,64
Epifítico	12	I	b	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0,55	0,01	34,52	1,19	62,33
Epifítico	29	II	b	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0,49	0,06	19,67	0,48	39,78
Epifítico	88	III	b	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0,4	0,02	15,72	2,97	39,12
Epifítico	97	III		<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0,9	0,03	14,99	2,24	16,67
Epifítico	108	II	b	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0,95	0,01	32,37	1,06	33,93
Epifítico	135	II	a	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0,54	0,02	19,44	0,03	36,06
Epifítico	142	IV	a	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1,3	0,03	19,11	1,75	14,69
Epifítico	150	II		<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0,62	0,19	22,67	1,38	36,77
Epifítico	11	III		<i>Metschnikowia sp</i>	0,76	0,34	31,17	3,41	41,08
Epifítico	1			<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,95	0,03	34,23	3,24	36,04
Epifítico	2	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,08	0,01	31,76	1,08	29,42
Epifítico	2	III	b	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,3	0,03	28,33	1,74	95,4
Epifítico	5	II	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,9	0,27	33,54	1,63	37,31
Epifítico	6	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,95	0,03	34,49	0,49	36,31
Epifítico	7	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,67	0,05	36,08	0,73	53,54
Epifítico	8	II		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,93	0,12	4,87	2,18	5,21
Epifítico	8	III		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,92	0,14	31,52	0,62	34,21
Epifítico	8	V		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,94	0,09	34,75	2,36	36,79
Epifítico	9	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,01	0,05	43,88	3,46	43,32
Epifítico	9	II	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,52	0,04	0	0	0
Epifítico	10			<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,57	0,05	32,82	0,85	57,79
Epifítico	11	V		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,87	0,13	35,75	1,48	40,86
Epifítico	13	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,89	0,02	37,54	2,56	42,38
Epifítico	14	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,45	0,06	26,43	5,56	59,36
Epifítico	16	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,38	0,43	23,23	0	60,66

Origem	Isolado			Identificação	Valor médio DO 600nm	Desvio padrão DO 600nm	Valor médio [AIA] µg/mL	Desvio padrão [AIA]	Relação [AIA] / DO 600nm
Epifítico	16	II	r	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,69	0	22,35	0,65	32,57
Epifítico	17	IV	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,64	0,13	13,95	1,15	21,7
Epifítico	18	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,73	0,04	23,67	0,36	32,52
Epifítico	18	II		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,77	0,05	23,37	4,18	30,34
Epifítico	19	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,04	0,08	25,6	2,54	24,62
Epifítico	19	II	b	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,13	0,04	32,08	3,17	28,37
Epifítico	23	II	b	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,98	0,03	0	0	0
Epifítico	29	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,19	0,11	13,25	5,92	11,15
Epifítico	35	I	b	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,95	0,03	22,58	0,19	23,75
Epifítico	35	II	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1	0,02	21,64	1,68	21,75
Epifítico	36	I	b	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1	0,07	23,27	2,31	23,36
Epifítico	38	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,81	0,05	7,04	2,04	8,67
Epifítico	41	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,89	0,01	22,6	0,71	25,38
Epifítico	46	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,96	0,11	18,07	1,66	18,84
Endofítico	47	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,86	0,17	9,09	1,24	10,59
Endofítico	49	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,02	0,09	19,31	0,08	18,93
Epifítico	51	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,76	0,226325	16,07	3,61	21,16
Epifítico	53	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,81	0,16	11,81	1,27	14,5
Epifítico	57	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,8	0,15	10,02	1,21	12,48
Epifítico	59	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,89	0,08	4,44	0,21	4,97
Epifítico	59	IV	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,86	0,05	19,53	1,47	22,58
Epifítico	61	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,66	0,03	11,15	0,71	16,83
Epifítico	65	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,88	0,09	11,74	0,24	13,29
Epifítico	67	II	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,54	0,26	18,35	10,99	33,92
Endofítico	69	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,73	0,1	12,5	2,49	17,17
Epifítico	71	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,84	0,21	12,56	1,85	14,87
Epifítico	73	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,01	0,13	10,45	0,86	10,35

Origem	Isolado	Identificação		Valor médio DO 600nm	Desvio padrão DO 600nm	Valor médio [AIA] µg/mL	Desvio padrão [AIA]	Relação [AIA] / DO 600nm	
Endofítico	75	I	b	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1	0,06	14,75	1,14	14,78
Epifítico	75	I	b	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,7	0,04	10,47	0,95	14,95
Epifítico	77	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,61	0,17	7,6	0,69	12,44
Endofítico	77	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,98	0,22	13,99	5,45	14,27
Epifítico	81	I	b	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,56	0,05	10,53	1,51	18,93
Epifítico	85	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,35	0,05	23,17	0,17	65,44
Epifítico	88	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,71	0,13	26,68	1,75	37,6
Epifítico	90	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,7	0,06	14,92	1,88	21,23
Epifítico	92	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,86	0,27	14,74	0,25	17,22
Epifítico	93	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,9	0,12	12,36	0,57	13,78
Epifítico	97	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,95	0,25	5,59	0,46	5,89
Epifítico	101	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,89	0,02	22,2	3,54	24,89
Endofítico	102			<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,88	0,04	12,53	0,33	14,16
ENC	106	I	a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,84	0,04	10,87	1,52	12,95
Epifítico	109	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,68	0,11	9,91	2,38	14,55
Endofítico	114	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,57	0	35,38	0,96	62,33
Epifítico	115	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,05	0,07	13,73	0,14	13,05
Epifítico	117	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,08	0,18	10,18	0,7	9,43
Epifítico	121	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,69	0,03	11,82	0,61	17,01
Epifítico	125	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,75	0,27	11,39	1,03	15,13
Epifítico	130	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,04	0,31	10,22	2,23	9,84
Epifítico	133	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,92	0,2	11,88	3,33	12,89
Epifítico	138	II		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,39	0,04	8,57	1,66	21,82
Endofítico	139	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,23	0,01	11,49	0,97	9,35
Endofítico	145	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,92	0,25	12,2	0,04	13,21
Epifítico	145	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,13	0,04	13,63	1,29	12,05
Endofítico	149	I		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,72	0	5,7	1,65	7,91

Origem	Isolado		Identificação	Valor médio DO 600nm	Desvio padrão DO 600nm	Valor médio [AIA] µg/mL	Desvio padrão [AIA]	Relação [AIA] / DO 600nm
Epifítico	149	I	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,57	0,07	9,53	0,44	16,79
Endofítico	153	I	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,33	0,02	11,43	1,26	8,6
Epifítico	156	I	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,58	0	12,41	0,62	21,39
Endofítico	161	I	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,22	0,04	10,23	0,67	8,4
Endofítico	166	I a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,98	0,18	10,95	0,27	11,16
Endofítico	168	I a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,17	0,01	27,96	3,32	23,96
ENC	168		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,18	0,01	11,76	0,48	9,93
Endofítico	69	II	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,81	0,14	15,02	1,38	18,51
Endofítico	81	I a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,23	0,04	17,42	2,27	14,19
Endofítico	81	II a	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,58	0,1	14,39	3,17	25
Epifítico	107	I	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,89	0,03	12,67	1,39	14,27
Endofítico	158	I	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,54	0,01	15,64	2,02	29,01
Epifítico	160	I	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,01	0,24	12,29	1,55	12,16
Epifítico	165		<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,99	0,18	12,89	0,04	13,05
Epifítico	129	II a	<i>Occultifur externus</i>	0,17	0	4,02	0,52	23,81
Epifítico	145	III	<i>Occultifur externus</i>	0,41	0,09	0	0	0
Endofítico	105	II a	<i>Ogataea sp.</i>	0,7	0,05	1,14	0,31	1,63
Epifítico	118	II	<i>Ogataea sp.</i>	0,55	0,11	5,39	0,81	9,84
Epifítico	57	IV a	<i>Pichia kluyveri</i>	0,73	0,06	12,77	1,93	17,5
Endofítico	142	III b	<i>Pichia kluyveri</i>	1,2	0,04	35,26	2,85	29,3
Epifítico	40	II a	<i>Pichia kudriavzevii</i>	0,91	0,12	9,36	0,63	10,34
Epifítico	44	II a	<i>Pichia kudriavzevii</i>	0,37	0,41	26,2	0	71,42
Epifítico	146	II	<i>Pichia kudriavzevii</i>	0,58	0	21,35	1,69	36,61
Epifítico	5	I	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,73	0,24	36,39	1,37	49,73
Epifítico	6	IV	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,81	0,15	32,49	3,17	40,35
Epifítico	11	II	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,79	0,21	33,26	6,24	41,95
Epifítico	18	III	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,48	0,07	33,45	3,42	70,25

Origem	Isolado	Identificação	Valor médio DO 600nm	Desvio padrão DO 600nm	Valor médio [AIA] µg/mL	Desvio padrão [AIA]	Relação [AIA] / DO 600nm
Epifítico	47 II	<i>Pichia membranifaciens</i>	1,04	0,05	118,66	20,19	113,92
Epifítico	51 III a	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,83	0,01	62,77	1,56	75,93
Epifítico	73 II	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,71	0,01	14,84	0,71	20,85
Epifítico	75 III b	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,62	0,04	10,75	2,37	17,38
Epifítico	76 II a	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,73	0,06	13,51	0,81	18,63
Endofítico	81 III	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,53	0	32,6	2	61,36
Epifítico	81 IV a	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,37	0,09	24,9	5,65	67,84
Epifítico	82 III	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,38	0,09	23,87	7,69	63,45
Epifítico	87 III a	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,65	0,22	28,22	10,43	43,37
Epifítico	115 IV a	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,69	0,06	37,64	1,32	54,58
Epifítico	141 II a	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,73	0,1	13,33	0,53	18,16
Epifítico	150 V b	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,5	0,01	20,5	0,14	41,36
Epifítico	152 II b	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,89	0,14	22,17	0,62	24,81
Epifítico	164 III a	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,4	0,01	24,08	0,71	59,48
Epifítico	83 II b	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,44	0,07	21,09	6,45	47,74
Epifítico	84 II b	<i>Pichia membranifaciens</i>	0,48	0,13	26,81	9,12	55,58
Epifítico	31 V	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	0,97	0,07	40,97	5,23	42,19
Epifítico	69 II	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	0,92	0,07	220,49	4,6	238,65
Epifítico	71 II a	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	0,55	0,04	18,21	2,45	33,35
Epifítico	152 IV	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	1,33	0,02	22,51	1,75	16,95
Epifítico	157 IV a	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	0,5	0,02	63,9	4,4	126,66
Epifítico	44 III a	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0,72	0,07	2,41	1,87	3,34
Epifítico	6 III	<i>Rhodotorula oryzae</i>	0,3	0,03	28,26	1,2	95,18
Epifítico	145 II	<i>Rhodotorula sp.</i>	0,88	0,05	21,23	4,28	24,24
Epifítico	119 II	<i>Sarocladium strictum</i>	0,55	0,06	6,72	0,66	12,23
Epifítico	8 IV	<i>Saturnispora sp</i>	1,02	0,01	40,29	0,2	39,43
Epifítico	25 III	<i>Saturnispora sp.</i>	1,15	0,09	31,94	0,89	27,81

Origem	Isolado		Identificação	Valor médio DO 600nm	Desvio padrão DO 600nm	Valor médio [AIA] µg/mL	Desvio padrão [AIA]	Relação [AIA] / DO 600nm
Epifítico	32	III	<i>Saturnispora sp.</i>	0,77	0,1	55,49	0,5	72,14
Endofítico	114	II	<i>Saturnispora sp.</i>	0,49	0	14,17	0,42	28,79
Epifítico	35	III	<i>Ustilago sp.</i>	0,33	0,05	26,9	2,2	82,73
Epifítico	100	III a	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0,92	0	11,88	0,27	12,89
Epifítico	142	V b	<i>Zygoascus hellenicus</i>	1,15	0,14	13,6	0,98	11,8