

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ISOLADOS  
DE CANA-DE-AÇÚCAR

LARINNE PAIVA VIÉ GAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MARÇO/2015

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ISOLADOS  
DE CANA-DE-AÇÚCAR

LARINNE PAIVA VIÉ GAS

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

ORIENTADOR: ARNOLDO ROCHA FAÇANHA.

COORIENTADORA: ANNA L. OKOROKOVA FAÇANHA.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MARÇO/2015

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ISOLADOS  
DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**LARINNE PAIVA VIÉ GAS**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Comissão Examinadora:

---

Ricardo E. Bressan-Smith – UENF/LMGV/CCTA

---

Meire Lélis Leal Martins – UENF/LTA/CCTA

---

Liane Cristina da Silva Ferreira Alvarenga – COAGRO

---

Arnoldo Rocha Façanha – LMGV/CCTA/UENF – Orientador

---

Anna L. Okorokova Façanha – LFBM/CBB/UENF – Coorientadora

## **A G R A D E C I M E N T O S**

A UENF pelo meu aprendizado durante meu mestrado e a CAPES pela concessão da bolsa durante esse período;

Aos meus orientadores: professora Anna L. Okorokova-Façanha e Arnaldo Rocha Façanha, por todos os ensinamentos, os conselhos e as oportunidades que me levaram a crescer profissionalmente;

A Géssika por toda força, amizade e incentivo me dado durante todo período de graduação. Além de me escutar nos momentos de desespero e por nunca ter me deixado desistir;

A Flávia Camilla, Maria Eliza e Júlia Fardim pela amizade, pelos momentos de conversa e risadas, e pela grande companhia todos os dias na bancada;

A Keilla, Lívia, Antônio e Layz por esclarecer minhas dúvidas e pela amizade durante meu período no laboratório, além das colaborações nos meus experimentos. Sem contar com as muitas risadas que demos juntos nesse período;

Aos meus colegas: Renan, Camila, Gabriel, Érika e Suzanna e aos demais amigos de bancada pela amizade, pelo agradável ambiente de trabalho e pelas brincadeiras nas horas vagas;

Aos técnicos do LFBM, Luís e Valéria por toda ajuda com meu material de trabalho;

E por fim, mas não menos importante:

A Deus, meu maior agradecimento por me dar paciência e equilíbrio nas horas necessárias e por toda força que me levou a continuar prosseguindo;

Aos meus pais, Fernando e Adriana meu grande agradecimento por que sem eles não poderia estar aqui, além de toda força, incentivo e investimento nos meus estudos;

A minha irmã, Larissa que me deu forças durante todo esse tempo acadêmico. Pela amizade e pelo carinho. E pelo incentivo de todos os dias e pela companhia na UENF;

A Kaysa, uma pessoa que me acompanhou durante esse período, me dando apoio se tornando uma grande amiga.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
SUMÁRIO	ii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Micro-organismos associados às plantas	3
2.1.1. Fungos endofíticos	5
2.2. A cana-de-açúcar	10
2.2.1. Fungos associados às plantas de cana-de-açúcar	12
2.3. Potencial biotecnológico dos endofíticos	13
2.3.1. Controle biológico	13
2.3.1.1. Leveduras <i>killer</i> no controle biológico	18
2.3.2. Uso de micro-organismos na promoção do crescimento vegetal	19
2.3.3. Potencial de micro-organismos na produção de enzimas hidrolíticas	23
2.3.3.1. Lipase	24
2.3.3.2. Celulase	25
2.3.3.3. Protease	27
2.3.3.4. Pectinase	29
3. OBJETIVO GERAL	30
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. Material Vegetal	31
4.2. Cepas isoladas	31
4.3. Preparação do meio de cultura e manutenção das cepas isoladas	31
4.4. Identificação das cepas de leveduras isoladas	32
4.4.1. Extração e quantificação do DNA total	32
4.4.2. Amplificação do material genômico	33
4.4.2.1 Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4	34
4.4.2.2. Amplificação utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4	34
4.4.3. Purificação dos <i>amplicons</i>	35
4.4.4. Sequenciamento e análise das sequências e homologia com banco de dados	35
4.5. Análise da promoção do crescimento de raízes milho	36
4.5.1. Produção dos inoculantes	36
4.5.2. Inoculação das sementes	36
4.6. Ensaio de bioatividade contra fungos filamentosos	37
4.8. Secreção de enzimas hidrolíticas em meio de cultura sólido	38
5. RESULTADOS	40
5.1. Identificação molecular e morfológica dos isolados de cana-de-açúcar	40

5.2. Atividade antagonista contra fungos filamentosos	45
5.3. Análise promoção do crescimento vegetal em meio sólido	57
5.4. Análise da degradação de enzimas hidrolíticas	60
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÕES	83
8. REFERÊNCIAS	85

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2:</b> Análise do crescimento dos isolados de cana-de-açúcar.	44
<b>Figura 3:</b> Ensaio antagonista <i>in vitro</i> contra <i>Colletotrichum limdemuthianum</i> .	49
<b>Figura 4:</b> Ensaio antagonista <i>in vitro</i> contra <i>Fusarium oxysporum</i> .	52
<b>Figura 5:</b> Inibição do crescimento de fungos filamentosos pela cepa RBG 105-17 isolada de cana-de-açúcar.	53
<b>Figura 6:</b> Ensaio antagonista <i>in vitro</i> contra <i>Penicillium decubens</i>	56
<b>Figura 7:</b> Análise do crescimento das raízes de milho na presença de leveduras	58
<b>Figura 8:</b> Análise do comprimento das raízes de milho.	59
<b>Figura 9:</b> Ensaio da degradação de celulase	62
<b>Figura 10:</b> Ensaio da degradação de lipase.	63
<b>Figura 11:</b> Mudanças morfológicas durante o crescimento da cepa RBG 105-17.	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Identificação molecular dos isolados de cana-de-açúcar.	42
<b>Tabela 2:</b> Análise da capacidade de secreção de enzimas hidrolíticas.	64
<b>Tabela 3:</b> Análise da degradação de lipase e quantificação dos halos.	65



## RESUMO

VIÉGAS, Larinne Paiva, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Março de 2015. Título: Potencial Biotecnológico de Isolados de Cana-de-Açúcar. Orientador: Prof. Arnaldo Rocha Façanha.

Todos os tecidos vegetais são habitados por micro-organismos denominados endofíticos. Associações planta - micro-organismos são dinâmicas e são consideradas de grande importância ecológica conferindo características vantajosas ao hospedeiro e ao micro-organismo.

Na agricultura o estudo de endofíticos no controle biológico de doenças causadas por fungos é importante, pois estes afetam grandes culturas impactando diretamente na economia, especificamente em se tratando de culturas de cana-de-açúcar.

Neste contexto, o objetivo foi explorar a microbiota presente nos tecidos vegetais de cana-de-açúcar como repositório de novas espécies e cepas de leveduras ainda não caracterizadas quanto ao seu potencial biotecnológico. O projeto integra um programa maior que visa especificamente isolamento, a seleção e a caracterização de espécies/cepas com capacidade de incrementar a produtividade e sustentabilidade agrícola da cultura da cana-de-açúcar. Pode-se observar que as leveduras analisadas possuem capacidade de atuarem no controle biológico contra fungos filamentosos, tais como *Furarium oxysporum*, *Colletotrichum limdemuttianum* e *Penicillium decubens*. As cepas de levedura isoladas de cana-de-açúcar (CBA 106-19, SPA 106-12 e 848 UFRJ) e a levedura *Yarrowia lipolytica* JM-12 foram capazes de promover o crescimento de raízes de milho. Outro potencial biotecnológico visto por essas cepas de levedura é que elas são capazes de produzir lipases, uma enzima de grande interesse industrial.

Palavras-chave: Leveduras, Controle Biológico, Promoção do Crescimento.

## ABSTRACT

VIÉGAS, Larinne Paiva, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2015. Title: Sugarcane Biotechnological Potential Isolates. Advisor: Prof. Arnaldo Rocha Façanha

All plant tissues are inhabited by microorganisms called endophytes, defined as organisms that live in the interior of the plant tissue without causing apparent damage for this host. Associations plant-microorganisms are dynamic and are considered ecologically important conferring advantageous characteristic to the host and microorganism.

In agriculture, the study of endophytes in the biological control of diseases caused by fungi and/or bacteria is important because they affect large crops directly impacting the economy, specifically in the case of crop of sugarcane, one of cultivation principal in Brazil, besides to minimize the use of chemical or physical methods which generate high costs which may affect the environment and food due to contamination by waste.

In this context, we aim to explore the microbiota present in plant tissues of sugarcane as a repository of new species and strains of yeasts still not characterized as to their biotechnological potential. The project is part of a larger program that specifically targets the isolation, selection and characterization of species/strains with capacity to increase agricultural productivity and sustainability of the culture of sugarcane. We can see that the yeast analyzed have the capacity to act in the biological control against filamentous fungi, such as *Furarium oxysporum*, *Colletotrichum lim dem uttianum* and *Penicillium decubens*. Yeast strains isolated from sugarcane (CBA 106-19, SPA 106-12 and 848 UFRJ) and the yeast *Yarrowia lipolytica* JM-12 were able to promote the growth of maize roots. Another potential biotechnological seen from these yeast strains is that they are capable of producing lipase, an enzyme of great industrial interest.

Keywords: Yeast, Biological Control, Plant Growth Promotion.

## 1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos associados a plantas possuem diversas características que tornam essa associação benéfica, dentre as quais pode citar: a produção de hormônios de crescimento e antibióticos, a proteção contra herbivoria (pela produção de alcaloides), entre outros. Os endofíticos especialmente por colonizarem praticamente todas as espécies de plantas são potenciais fontes de estudo para características de interesse fora e dentro da planta. White Jr. *et al.* (2002), acreditam que fungos produtores de hormônios de crescimento vegetal o fazem para modificar a fisiologia e estrutura da planta, visando à extração de nutrientes para si.

No trabalho de Varma *et al.* (1999), os autores estudaram o basidiomiceto *Piriformospora indica*, um endófito de raiz e afirmaram a capacidade desse endófito em promover o crescimento vegetal de *Zea mays*, *Nicotiana tabacum* e *Petroselinum crispum* L., uma vez que a inoculação do fungo nessas plantas, favorece o aumento de biomassa e, conseqüentemente, o crescimento vegetal.

O estudo de fungos endofíticos tem sido intensificado nos últimos anos e abrange principalmente a descrição de novas espécies, o potencial de utilização no controle biológico de fitopatógenos e a produção de metabólitos secundários com atividades biológicas diversas. No entanto, a interação e a possível função destes organismos em plantas de clima tropical ainda são pouco estudadas. A cana-de-açúcar é uma das principais culturas do Brasil e nos últimos anos está recebendo especial atenção devido à produção de etanol para uso como biocombustível. Um grande avanço no conhecimento das comunidades microbianas endofíticas desta planta tem sido alcançado, abrindo a possibilidade de estudo sobre as funções destes organismos na interação endofítica, bem como de seu potencial biotecnológico.

A produção de enzimas é citada na literatura como uma característica expressa por fungos endofíticos. Uma vez que a planta é colonizada por endófitos, ocorre a resposta de defesa bioquímica induzida. Como exemplo ao que ocorre na colonização da planta com *Cladosporium fulvum*, analisado por Osbourn (2001). Essa produção de enzimas em resposta à colonização do

endofítico, pode ter um papel fundamental na limitação de crescimento de endofíticos e/ou patógeno e na virulência dos mesmos (Boyle *et al.*, 2001; Arnold *et al.*, 2003; Schulz; Boyle, 2005).

O controle biológico realizado com uso de micro-organismos capazes de combater um determinado fitopatógeno por meio de competição ou produção de compostos antagônicos é uma ferramenta alternativa ao controle químico. Nesse contexto, micro-organismos endofíticos estão sendo descritos na literatura como benéficos às plantas hospedeiras, inclusive como potenciais controladores biológicos de fitopatógenos.

Da mesma forma que fitopatógenos, os endofíticos apresentam a capacidade de penetrar na planta e colonizar o hospedeiro de forma sistêmica ou localizada, ocupando o mesmo nicho ecológico dentro do hospedeiro. O controle biológico no Brasil tem um grande caminho a ser trilhado, com a biodiversidade tropical com um grande número de espécies ainda desconhecidas, adaptadas às condições ambientais brasileiras, com potencial para uso tecnológico no controle de doenças que acometem tais culturas.

A vantagem em se trabalhar com micro-organismos é a possibilidade de controle sobre os processos operacionais de maneira relativamente simples. Em comparação com as plantas, os fungos apresentam crescimento mais rápido em menor tempo e espaço. Além disso, as condições de cultivo (tempo, pH, nutrientes, temperatura, aeração) podem ser modificadas a fim de aumentar ou de direcionar a produção de metabólitos bioativos de interesse.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Micro-organismos associados às plantas

Os fungos representam um componente essencial da biodiversidade não apenas pelo grande número de espécies, mas também pela sua significância ecológica, evolutiva e socioeconômica (Desprez-Loustau *et al.*, 2007).

Como descrito por Hawksworth (1991), o número estimado de espécies de fungos é de 1,5 milhões, mas as estimativas subsequentes podem chegar até 9,9 milhões (Hawksworth, 2001). Entretanto, o número de espécies descritas até o momento é de aproximadamente 100 mil (Hawksworth, 2004), o que representa menos de 7% da diversidade total estimada, considerando a estimativa de 1,5 milhões de espécies (Hawksworth, 2001; Arnold *et al.*, 2003, Mueller e Schmit, 2007) um pequeno aumento de 5% na hipótese sugerida por Hawksworth (1991). No ritmo de novas espécies descritas que é de 1.000-1.200 fungos/ano (Hawksworth, 2000; Hawksworth, 2012), vai demorar mil anos para descrever 1 milhão de espécies desaparecidas se estas estimativas estiverem corretas (Mueller e Schmit, 2007).

As plantas podem ser consideradas como sendo um microecossistema complexo, onde diferentes nichos são explorados por uma variedade de micro-organismos. Estes nichos incluem as superfícies externas da planta, bem como os tecidos internos, nos quais diferentes micro-organismos podem coexistir. O habitat associado às plantas é um ambiente dinâmico, no qual diversos fatores podem afetar a estrutura e a composição das comunidades microbianas que colonizam os tecidos vegetais. Alguns destes fatores incluem mudanças sazonais, tipo do tecido vegetal e o estágio de desenvolvimento da planta (Mocali *et al.*, 2003; Kuklinski-Sobral *et al.*, 2004), espécie vegetal, diferentes variedades e tipo de solo (Dalmastri *et al.*, 1999; Kuklinski-Sobral *et al.*, 2004) e a interação com outros micro-organismos benéficos ou patogênicos (Lacava *et al.*, 2004).

Fungos que formam simbioses com plantas podem estar presentes na rizosfera, nas superfícies vegetais (epífitos) e no interior dos tecidos (endófitos) (Selosse e Tacon, 1998).

Todas as plantas incluindo algas, musgos, samambaias, coníferas e angiospermas em seus ecossistemas naturais são infestadas por fungos que não causam sintoma de doença (Rodríguez *et al.*, 2009). Fungos associados à planta são geralmente divididos em cinco principais grupos funcionais: micorrízicos, patogênico, epífitos, endofíticos e saprófagos. Os endofíticos interagem e se sobrepõem aos demais grupos que colonizam os tecidos das plantas (Porrás-Alfaro e Bayman, 2011).

Os fungos endofíticos vivem internamente (intercelular ou intracelular) de forma assintomática, ou seja, sem provocar sinais evidentes de dano ao tecido (Saikkonen *et al.*, 1998), em contraste com os parasitas que levam a doença e reduzem a aptidão da planta hospedeira.

A doença é a exceção nas interações planta – micro-organismo, que potencialmente podem ser consideradas como um estado de desequilíbrio de uma simbiose (Kogel, 2006; Rodríguez *et al.*, 2009). Em comparação com os patógenos já conhecidos, os endofíticos geralmente têm uma plasticidade fenotípica maior e assim mais opções do que os patógenos em termos de infecção, local e também ampla colonização, latência, virulência e patogenicidade. Esta plasticidade fenotípica é um motor de evolução desses organismos (Schulz e Boyle, 2005).

De todas as espécies conhecidas de fungos apenas cerca de 10% foram identificadas como causadores de doenças em plantas, sendo alguns destes fungos considerados como parasitas obrigatórios, estando associados ao hospedeiro durante todo seu ciclo de vida (Kahmann e Basse, 2001). Em cana-de-açúcar, por exemplo, os fungos patogênicos são bastante estudados, sendo descritos principalmente: *Colletotrichum falcatum*, agente causador da Podridão Vermelha; *Ustilago scitaminea*, agente causal do Carvão; *Leptosphaeria sacchari*, agente causal da Mancha Anelar; *Bipolaris sacchari*, agente causador da Mancha Ocular; *Puccinia melanocephala*, agente causador da Ferrugem; *Fusarium moniliforme*, agente causador da “Podridão de Fusarium” e “Pokkah-Boeng” e *Thielaviopsis paradoxa*, agente causador da Podridão do Abacaxi (Viswanathan, Sundar e Premkumari, 2003; Eriksson *et al.*, 2003). Na Florida, por exemplo, a ferrugem marrom, causada por *Puccinia*

*melanocephala*, e a ferrugem alaranjada, causada por *P. kuehnii*, são doenças de interesse agrônomico (Sood *et al.*, 2009).

Um tema comum nas discussões sobre endofíticos é que eles podem ser patógenos latentes ou quiescentes (Rosa *et al.*, 2011). Uma mudança no hospedeiro ou ambiente pode desencadear a patogenicidade em um endofítico que anteriormente era assintomática. O fato de a interação se tornar ou não uma interação patogênica vai depender, em parte, da escala de tempo em que a interação é observada (Schulz e Boyle 2005).

Embora o conhecimento da ecologia, história de vida e filogenia de fungos endofíticos tenha se acumulado rapidamente durante as duas últimas décadas, as questões básicas sobre a origem evolutiva, especiação e papel ecológico dos endofíticos ainda permanecem em grande parte sem resposta (Saikkomen *et al.*, 2004).

Segundo Strobel e Daisy (2003), a íntima relação evolutiva entre plantas e micro-organismos provavelmente iniciou-se há aproximadamente 100 milhões de anos com o surgimento das primeiras plantas na terra. Durante a evolução das plantas, associações mutualísticas com fungos endofíticos ocorreram e promoveram adaptações relacionadas à capacidade de defesa da planta contra o ataque de insetos, micro-organismos e animais herbívoros, através da produção de uma variedade de compostos secundários como alcalóides, terpenóides, esteróides e compostos aromáticos repelentes ou tóxicos a seus inimigos (Liu *et al.*, 2001).

### **2.1.1. Fungos endofíticos**

Literalmente, a palavra endofítico significa “na planta” (*endo* - dentro; *fítico* - planta). O uso desse termo é tão amplo quanto a sua definição literal e o espectro de plantas hospedeiras potenciais e habitantes, incluindo bactérias, fungos, algas e insetos (Fröhlich e Hyde, 1999).

Muitas definições foram propostas para o termo endofítico, por exemplo, Petrini (1992) estudou principalmente os fungos e os definiu como micro-organismos que habitam, pelo menos por um período do seu ciclo de vida, os tecidos internos dos vegetais sem causar dano aparente. O termo “micro-

organismo endofítico” foi recentemente definido por Azevedo e Araújo (2007) e abrange todos aqueles micro-organismos que podem ou não crescer em meio de cultura e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais. Esta definição não inclui os formadores de nódulos, como bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, nem os fungos micorrízicos. Dessa maneira, Mendes e Azevedo (2007) propuseram a redefinição deste conceito, dividindo os endofíticos em dois tipos, sendo: a) Tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta e b) Tipo II, os que produzem estruturas externas à planta. É importante salientar que a distinção entre endofíticos, epífitos (aqueles que vivem sobre a superfície) e fitopatógenos (aqueles que causam doenças) é considerada de caráter didático.

Embora fungos endofíticos colonizem preferencialmente as raízes e o caule da planta hospedeira, alguns autores têm relatado a sua presença em sementes, desinfestadas superficialmente, de diversas espécies vegetais (Rudgers *et al.*, 2004; Majewska-Sawka e Nakashima, 2004; Jordaan *et al.*, 2006; Rudgers e Clay, 2007).

De modo geral, dois grupos de fungos endofíticos têm sido reconhecidos, refletindo diferenças nas relações evolutivas, taxonomia, planta hospedeira e funções ecológicas: endofíticos clavicipitáceos e endofíticos não clavicipitáceos. Os primeiros compreendem espécies pertencentes à família *Clavicipitaceae* (*Hypocreales*; *Ascomycota*), que formam simbioses quase que exclusivamente com gramíneas (*Poaceae*) de clima temperado. Estes fungos colonizam as plantas hospedeiras de modo sistêmico e várias espécies são transmitidas verticalmente por sementes para a próxima geração. Os fungos endofíticos clavicipitáceos são reconhecidos por potencializar a aptidão da planta hospedeira pela produção de substâncias alcaloides que inibem a herbívora por insetos, pela produção de metabólitos que estimulam o crescimento vegetal, e por conferirem tolerância à escassez hídrica, além de muitas espécies serem conhecidas pela produção de moléculas bioativas (principalmente dos gêneros *Cordyceps*, *Balansia*, *Epichloë/Neotyphodium*, *Claviceps* e *Myriogenospora*). Em contraste, os endofíticos não clavicipitáceos são um grande grupo que não tem sido bem definido taxonomicamente, mas a



maioria das espécies pertencentes aos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*, representados pelos gêneros *Alternaria*, *Arthrobotrys*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Coprineillus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phoma*, e muitos outros. (Scharf, Leuchtman e Spiring, 2004; Rosa *et al.*, 2011). No entanto, como já mencionado, os benefícios conferidos por estes fungos parecem depender da espécie da planta, do genótipo da planta e das condições ambientais (Kuklinski-Sobral *et al.*, 2004; Cheplick, 2006).

Os fungos endofíticos podem ter transmissão horizontal quando a transmissão do fungo é por esporos sexuais ou assexuais, ou por transmissão vertical, que é a transmissão sistêmica do fungo da planta mãe para planta filha via sementes (Saikkomen *et al.*, 2004). A transmissão vertical é considerada por promover relações benéficas para planta hospedeira (Mejiia *et al.*, 2008) e as mais comuns são o aumento da resistência a herbívoros e patógenos em gramíneas (Faeth e Fagan 2002). A transmissão vertical em endófitos sistêmicos parece reduzir concomitantemente a habilidade do fungo para infectar novos hospedeiros não infectados horizontalmente tanto por esporos assexuais ou sexuais (Saikkomen *et al.*, 2004). A maioria dos endofíticos de plantas lenhosas, e provavelmente muitas gramíneas, no entanto, é geralmente transmitida horizontalmente por esporos de planta para planta (Saikkomen *et al.*, 1998; Faeth, 2002). A estratégia de reprodução e transmissão para outros hospedeiros é bem reconhecida como fator importante relacionada com a virulência e agressividade (Saikkomen *et al.*, 1998; Faeth e Fagan 2002).

Há uma série de razões para que se aprofundem os estudos com endofíticos. Primeiro, a falta de informações para elucidar a base biológica dessas interações. Segundo, porque os endofíticos são vantajosos, pois muitos benefícios para a planta têm sido atribuídos, principalmente devido à capacidade desses micro-organismos produzirem metabólitos secundários que têm várias aplicações como no controle biológico de fitopatógenos, promoção de crescimento de plantas, indução de resistência sistêmica, drogas de uso farmacêutico como os antibióticos e agentes anticancerígenos (Melo, 2005).

As plantas proporcionam um nicho ecológico único para diversas comunidades simbióticas de micróbios que contribuem para vários benefícios,

tais como a maior eficiência fotossintética, nutrientes e uso da água, e tolerância ao estresse abiótico e biótico (Barrow *et al.*, 2008). Também podem promover o aumento da biomassa vegetal sob condições de estresse e mais especificamente proporcionam o aumento da biomassa radicular, possivelmente por induzir a planta hospedeira a produzir hormônios vegetais ou pela biossíntese de hormônios vegetais pelo próprio fungo, produção de componentes de interesse biotecnológico (como enzimas e fármacos) (Rodríguez *et al.*, 2009) tais como o ácido-3-indol-acético (AIA) e citocininas (Tan e Zou, 2001), e produção de componentes de interesse biotecnológico, como enzimas e fármacos (Azevedo *et al.*, 2000).

Esses micro-organismos desempenham um papel importante no aumento de respostas defensivas do hospedeiro contra patógenos (Herre *et al.*, 2007; El-Tarabily e Sivasithamparan 2006) e promovem uma resistência a herbívora pela produção de micotoxinas, incluindo várias classes de alcaloides (Rudgers *et al.*, 2004; Faeth e Fagan 2002; Faeth, 2002).

Sendo assim, se os endófitos aumentam a aptidão das plantas, aumentando a resistência a herbívoros, predadores de sementes, ou estresses abióticos ou através do aumento da habilidade de competitividade, então a frequência de plantas populadas deveria aumentar ao longo do tempo em populações de plantas (Saikkonen *et al.*, 1998).

De fato, os endófitos são constituintes, importantes da biodiversidade microbiana (Tan *et al.*, 2001). Cada vez mais eles estão sendo reconhecidos como um conjunto ecológico de micro-organismos que podem fornecer fontes de novos metabólitos secundários com atividades biológicas úteis (Tejesvi *et al.*, 2007).

Metabólitos secundários são os compostos produzidos pela planta e aparentemente não são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das mesmas. No entanto, seus papéis ecológicos têm sido extensivamente estudados e têm recebido maior atenção nos últimos anos. As plantas podem ser consideradas como uma biofábrica química para a biossíntese de uma enorme variedade de metabólitos secundários. Muitos destes produtos químicos são utilizados na produção de medicamentos, perfume, corantes e agrotóxicos, e são de importância comercial (Zhi-lin, 2007).

Dentre todas as classes de fungos, uma que merece destaque é a dos fungos endofíticos devido a grande diversidade química, ineditismo de moléculas e suas atividades biológicas (Tan e Zou, 2001). Muitos metabólitos secundários são provenientes de micro-organismos. Os metabólitos bioativos isolados de fungos endofíticos têm representado diversas classes químicas, incluindo alcaloides, flavonoides, fenilpropanoides, lignanas, peptídeos, esteroides, xantonas, fenóis, quinonas (Tan e Zou, 2001, Schulz; e Boyle, 2005).

Wiyakrutta *et al.*(2004) constataram que extratos de fungos endofíticos possuem atividade biológica contra *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum* e contra células de carcinoma epidermoide bucal humana e contra células de câncer de mama. Mais recente, Santiago *et al.*,(2012) mostraram que fungos endofíticos exibiram atividade biológica contra o parasita *Leishmania amazonensis*, contra células de câncer (mama, rim e melanoma). Portanto, há uma demanda geral para novos antibióticos, quimioterápicos agentes e agrotóxicos que são altamente eficazes, possuem baixa toxicidade, e têm um impacto ambiental menor (Strobel e Daisy, 2003).

Leveduras são micro-organismos predominantemente unicelulares, amplamente distribuídos na natureza e pertencentes ao reino *Fungi*. São caracteristicamente esféricas ou ovais. Apresentam parede celular, nutrição heterotrófica através da absorção de nutrientes, reprodução assexuada por brotamento ou fissão e ausência de motilidade e filamentos (Pelczar, 1997).

O potencial para explorar as leveduras é devido à capacidade destes micro-organismos em se multiplicar rapidamente, para a produção de antibióticos e enzimas de degradação da parede celular, para induzir resistência dos tecidos do hospedeiro, e para a produção de reguladores de crescimento de plantas (El-Tarabily e Sivasithamparam 2006).

Estimativas indicam que o número de plantas na terra é de aproximadamente 400.000 espécies (Joppa *et al.*, 2010) e considerando que todos os tecidos vegetais são habitados por micro-organismos endofíticos diferentes e que somente poucas espécies têm sido sistematicamente estudadas quanto à biologia de sua comunidade microbiana associada, deduz-se que esta área de estudo ainda está em aberto e com grande

promessa de novas descobertas importantes relacionadas à ecologia e à interação microbiana. Conseqüentemente, a oportunidade de encontrar novos micro-organismos endofíticos e benéficos entre a diversidade de plantas em diferentes ecossistemas e biomassa é considerável (Strobel, 2003; Strobel et al., 2004).

Grande parte dos estudos sobre micro-organismos endofíticos foi realizada principalmente a partir de plantas de clima temperado, no entanto, revisões recentes têm sido publicadas sobre a ocorrência e distribuição de endofíticos em plantas cultivadas e nativas de clima tropical e subtropical (Azevedo *et al.*, 2000; Azevedo e Araújo, 2007; Mendes e Azevedo, 2007; Pereira, Souza e Hanada, 2007). A diversidade de fungos nos trópicos é maior do que em regiões temperadas (Hawsworth, 2001).

Plantas de clima tropical são consideradas grandes reservatórios de micro-organismos endofíticos e a conservação e prospecção do uso da diversidade microbiana endofítica é diretamente dependente da conservação dos ecossistemas tropicais (Strobel e Daisy, 2003; Azevedo e Araújo, 2007). Considerando-se a presença de fungos endofíticos e a alta diversidade associada aos climas tropicais, a proporção sugerida para o número total de espécies de fungos seria de 33 espécies fúngicas para cada espécie vegetal (Arnold *et al.*, 2000; Gamboa, Laureano e Bayman, 2002). As taxas de colonização variam de < 1% a 41% de 2 mm<sup>2</sup> de fragmentos de folhas em três principais plantas de ecossistemas boreal e ártico para 90% em folhas na floresta tropical árvores (Porrás-Alfaro e Bayman, 2011).

## **2.2. A cana-de-açúcar**

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) engloba 30 espécies pertencentes à família *Poaceae* (EMBRAPA, 2014). Sua cultura é destaque no cenário agrícola brasileiro, sendo cultivada em vários tipos de ambientes (associação de clima e solo) (Maule, Mazza e Martha, 2001).

No Brasil, a cultura da cana-de-açúcar tem grande destaque no cenário agrícola e econômico, uma vez que o país é líder mundial na produção dessa cultura, com cerca de 680 milhões de toneladas produzidos em uma área

aproximada de 9,8 milhões de hectares na safra de 2015, envolvendo 1,3 milhões de empregos formais nos setores de cana, etanol e açúcar (IBGE, 2010).

A produção de cana-de-açúcar se concentra nas regiões Centro-Sul e Nordeste do Brasil. A área colhida com cana-de-açúcar em 2012 foi de 9.705.388 hectares no Brasil, sendo que 8.448.817 hectares na Região Centro-Sul incluindo São Paulo, o maior produtor, com 5.150.461 hectares e no estado do Rio de Janeiro com 117.892 hectares (UNICA, 2014).

Na safra 2012/13, o Brasil produziu aproximadamente 532 milhões de toneladas de cana, matéria-prima utilizada para a produção de 34 milhões de toneladas de açúcar e 21,3 bilhões de litros de etanol (UNICA, 2014). Indicando que o cultivo de cana-de-açúcar ainda permanece em constante ascensão.

A cultura de cana-de-açúcar ocupa uma área de 5,82 milhões de hectares no Brasil, onde tem grande importância devido à sua múltipla utilidade, podendo ser empregada "*in natura*", sob a forma de forragem, para alimentação animal, ou como matéria-prima para a fabricação de rapadura, melado, aguardente, açúcar e álcool. Na produção de açúcar e álcool, esta cultura gera subprodutos ou resíduos como bagaço, palha, melaço, torta de filtro e vinhaça, os quais têm grande importância econômica. O bagaço, por exemplo, tem sido utilizado como combustíveis, biomassa, veículo para ração animal, dentre outros (Fasanella, 2008).

Atualmente tem se relatado o uso cana-de-açúcar na produção do chamado etanol de segunda geração, que visa aproveitar todos os componentes químicos presentes na cana-de-açúcar (celulose, hemicelulose e lignina), tendo como matéria-prima o bagaço ou palha. Outras culturas além da de cana-de-açúcar, como o sorgo, milho, beterraba podem ser utilizadas na produção desse tipo de etanol, todavia o mais comum é o etanol feito a partir do bagaço e da palha da cana-de-açúcar (Martins *et al.*, 2014; Santos, 2013; Lofrano *et al.*, 2013).

Com o aumento da produção agrícola há uma necessidade de buscar técnicas que possibilitem o melhor estabelecimento da cultura. A engenharia genética em plantas é uma técnica exemplar que vem criando cultivares

geneticamente modificadas com características específicas para a resistência a herbicidas, insetos, patógenos e estresse ambiental. Estas características proporcionam o aumento na produção e redução de gastos com controle de doenças e insetos, proporcionando maior rendimento econômico (Liu *et al.*, 2005).

Entretanto, até o momento muito pouco foi avaliado sobre a interação entre fungos benéficos e cana-de-açúcar, e pouco se conhece sobre as comunidades fúngicas associadas a essa cultura. A maioria dos trabalhos realizados até o momento estudou fungos patogênicos, já que estes podem trazer grandes perdas na produção (Romão, 2010).

### **2.2.1. Fungos associados às plantas de cana-de-açúcar**

Fungos endofíticos são taxonomicamente e biologicamente diversos, mas todos compartilham o caráter de colonização interna dos tecidos vegetais sem causar dano aparente ao seu hospedeiro (Mejiía, *et al.*, 2008).

Micro-organismos raramente ocorrem em formas axênico (livre de qualquer outro organismo vivo) em seu habitat natural e habitats ecológicos. Os fungos endofíticos não são exceções, normalmente existem e têm suas funções dentro de um nicho de comunidades ricas e diversificadas de micro-organismos e macro-organismos. Estes nichos contêm uma multiplicidade de diferentes *crosstalk* entre os fungos endofíticos, entre bactérias endofíticas, vírus endofíticos e entre estes endófitos associados às plantas hospedeiras, sob várias pressões de seleção bióticas (como patógenos e alimentadores) e abióticas (como os fatores ambientais) (Kusari, Singh e Jayabaskaran, 2014 *a,b*; Kusari e Spiteller, 2001).

Poucos estudos têm avaliado a associação das plantas de cana-de-açúcar com fungos endofíticos e da rizosfera. Fungos endofíticos do Tipo I, aqueles que não produzem estruturas externas à planta, são os menos estudados em cana-de-açúcar, tanto em relação à diversidade como ao potencial no controle biológico e na promoção de crescimento (Romão, 2010).

Porém diversos trabalhos descrevem fungos patógenos que causam doenças na cana-de-açúcar, entre elas *Colletotrichum falcatum*, agente causal

da Podridão Vermelha, *Ustilago scitaminea*, agente causal do Carvão, *Leptosphaeria sacchari*, agente causal da Mancha Anelar, *Bipolaris sacchari*, agente causal da Mancha Ocular, *Puccinia melanocephala*, agente causal da Ferrugem, *F. moniliforme*, agente causal da "Podridão de *Fusarium*" e "Pokkah-Boeng" e *Thielaviopsis paradoxa*, agente causal da Podridão Abacaxi. (Asnaghi et al., 2001; Roboin et al., 2007; Singh, Somai e Pillay, 2004).

El-Amin e Saadabi (2007) isolaram um total de 23 espécies fúngicas, distribuídas em 16 gêneros sendo que: *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Curvularia* apresentaram alta frequência; *Mucor*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Trichoderma* e *Verticillium* foram observados em frequência moderada e, *Cunninghamella*, *Chaetomium*, *Botrytis*, *Humicola* e *Paecilomyces* em frequência baixa.

Já a comunidade de fungos leveduriformes da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar foi avaliada por Azeredo et al. (1998), a partir de canaviais situados nas proximidades de Campos, no Rio de Janeiro. Nesse trabalho, os autores relatam a predominância de leveduras do filo *Basidiomycetos*, sendo que os fungos *Cryptococcus laurentii*, *Debaryomyces hansenii* e *Fellomyces horovitziae* prevaleceram na comunidade da rizosfera.

## **2.3. Potencial biotecnológico de endofíticos**

### **2.3.1. Controle biológico**

Ao longo dos anos, a agricultura mundial cresceu em produtividade e área cultivada e a consequência foi o aumento do uso intensivo de agrotóxicos, que também sofreram grandes evoluções (Armas, 2006).

O Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos. As vendas anuais de agrotóxicos e afins no Brasil entre os anos de 2000 e 2012 tiveram um crescimento de 194,09% (IBAMA 2012). As vendas de defensivos acumuladas de janeiro a março de 2012 atingiram R\$ 2,3 bilhões, o que demonstra um acréscimo de 27% em comparação com o mesmo período de 2011, quando o montante foi de R\$ 1,8 bilhão. As vendas de defensivos são impulsionadas principalmente por culturas de cana-de-açúcar, algodão, milho e citros, no ano

de 2012 atingiram R\$ 2,3 bilhões demonstrando um acréscimo de 27% em comparação com ano de 2011. Infelizmente, o Brasil consome cada vez mais estes produtos, superando em 10% a do mercado mundial (M A P A 2014).

Um dos fatos da cultura de cana-de-açúcar aumentar a demanda do uso de defensivos é que esta cultura é acometida por diversos patógenos (*Colletotrichum falcatum*, *Ustilago scitaminea*, *Leptosphaeria sacchari*, *Bipolaris sacchari*, *Puccinia melanocephala*, *Fusarium moniliforme* e *Thielaviopsis paradoxa*) como já citado anteriormente (Asnaghi *et al.*, 2001; Roboin *et al.*, 2007; Singh, Somai e Pillay, 2004). No Brasil, o fungo *Fusarium verticillioides* (agente causador da fusariose) é o principal fungo associado a sementes de milho. Além dos fungos *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton [Sin. *Diplodia maydis* (Berk.) Sacc.] e *S. macrospora* (Earle) Sutton [Sin. *D. macrospora* Earle in Bull], que também acometem essa cultura (Pinto, Oliveira e Fernandes, 2007).

O fungicida químico é um dos principais métodos de controle de doenças de plantas, sendo a única forma de controle para diversos problemas fitossanitários. Essas doenças causadas por fungos geram perdas consideráveis na agricultura e a aplicação dos fungicidas ainda tem sido considerado um dos métodos mais baratos e a maioria das abordagens comuns no controle (Liu *et al.*, 2001).

Devido à facilidade de aplicação e aos resultados imediatos obtidos, os fungicidas se tornaram amplamente difundidos em diversas culturas. Porém, estes produtos químicos costumam levar longos prazos para serem degradados causando alta toxicidade ao ser humano, aos animais domésticos, entre outros problemas (Ngampimoll e Kunathigan, 2008). Também podem causar a contaminação do ambiente, podendo contaminar solo, rios, lagos, lençóis freáticos, além de serem muitas vezes carcinogênicos (Cunha, 2013). Além dos impactos ambientais os defensivos podem gerar resistência de patógenos (Assumpção, 2008).

Desse modo, o controle de pragas e doenças por meio de processos biológicos tal como a utilização de micro-organismos entomopatogênicos ou aqueles que inibem/antagonizam outros micro-organismos patogênicos nas



plantas é uma alternativa que pode contribuir para reduzir ou eliminar o uso de produtos químicos em agricultura (Azevedo *et al.*, 2000).

A busca por tecnologias limpas e que não ofereçam riscos ao ambiente e ao ser humano é cada vez mais intensa. Uma das possibilidades refere-se ao emprego de micro-organismos como uma alternativa à utilização de agrotóxicos, ao serem aplicados agentes do controle biológico.

Controle biológico é a regulação de populações de organismos vivos como um resultado de interações antagônicas como parasitismo, predação e competição. Segundo Cook e Baker (1983), o controle biológico é a redução da soma de inóculo ou atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem. De acordo com Lima *et al.*, 2000), o controle biológico tem como premissa básica, manter a densidade populacional das espécies de pragas, associadas à agricultura, em níveis economicamente e ecologicamente aceitáveis.

De todos os defensivos apenas 1% é de agentes de controle biológico (macro e micro-organismos) entre US\$ 65-75 milhões. Em 2010, o Brasil tinha registrado 1339 agrotóxicos, sendo 18 à base de agentes de controle biológico (MAPA 2014). Uma das dificuldades para evolução do mercado de bioprodutos no Brasil é o alto custo para registro. Boa parte dos produtos microbianos registrados no Brasil é à base de bactérias, com destaque para *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e *aizawai* utilizados no controle de lagartas. Outras bactérias como o, *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* e a espécie de *Bacillus sphaericus* são usadas no controle de pernilongo em áreas urbanas. E no caso de fungos apenas, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* são utilizados para o controle de insetos e ácaros e o fungo *Trichoderma harzianum* para o controle de plantas estão registrados (Bettiole Morandi, 2009).

O antagonismo de micro-organismos tem sido atribuído principalmente por (i) competição por nutrientes, (ii) as alterações de pH no meio como resultado do crescimento acoplado de troca iônica ou produção orgânica de ácido, (iii) a produção de concentrações elevadas de etanol, (iv) secreção de compostos antibacterianos e liberação de antimicrobianos tais como toxinas *Killer* ou micocinas (Hatoum, Labrie e Fliss, 2012).

A habilidade destes micro-organismos em assimilar uma larga gama de compostos orgânicos, expande a sua capacidade de dispersão e sobrevivência em diferentes nichos ecológicos, podendo ser encontrados em ambientes terrestres (plantas, solo, animais, ar) e aquáticos (lagos, rios, mares). São integrantes da microbiota epifítica, endofítica, que ocupam, comumente, a superfície das folhas, casca, frutas, flores, tecidos necróticos, solo e a rizosfera (Coelho 2013).

As leveduras constituem um grupo microbiano com diferentes propriedades, que as caracterizam como potenciais candidatas ao controle de fitopatógenos destacando inúmeras vantagens para seu uso. Tais como: as leveduras possuem a capacidade de se reproduzir rapidamente, competem no local da infecção do patógeno por espaço e nutrientes. Ainda, são de fácil produção e manutenção em condições *in vitro*, podem ser manipuladas a fim de melhorar a utilização e eficácia, possuem fácil adaptação nutricional, não produzem esporos alérgicos ou micotoxinas e possuem capacidade de colonizar fermentos em tecidos de plantas (Robiglio *et al.*, 2011; Coelho, 2013). Algumas espécies de leveduras antagônicas são capazes de produzir enzimas hidrolíticas, produção de substâncias antibióticas e/ou degradadoras da parede celular do patógeno, e de apresentarem possível atuação como indutoras de resistência nas plantas e produzem toxinas killer (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006). Porém, as leveduras ainda têm pouca visibilidade como agentes de biocontrole de fitopatógenos fúngicos, em comparação com bactérias, actinomicetos, e antagonistas de fungos filamentosos (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006).

Arras *et al.* (2002) observaram uma rápida colonização do micélio de *Penicillium digitatum* por *Candida famata*, com ação lítica e fagocítica da levedura contra a hifa fúngica. A forte ligação de células de *Pichia guilliermondii* ao micélio de *Penicillium italicum* causou a degradação da parede celular da hifa próxima do local onde as células de leveduras se aderiram.

A atuação das leveduras no controle biológico se dá por meio da inibição de algum estágio do desenvolvimento da doença ou do ciclo de vida do fitopatógeno através de diferentes mecanismos. Estes agentes biológicos podem atuar na prevenção da infecção, na redução da colonização de tecidos

no hospedeiro, na redução da esporulação ou na sobrevivência do patógeno, podendo proporcionar diferentes níveis de controle (Punja e Utkhede, 2003; Cunha, 2013).

Diversas espécies de leveduras, tais como *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus albidus*, *Pantoea agglomerans* e *Metschnikowia fructicola*, são registradas, em muitos países, como agentes de controle biológico de variados fitopatógenos, dentre eles *Botrytis*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Monilia*, *Sclerotinia* e *Erwinia amylovora* (Bettiol *et al.*, 2009; Bettiol, 2011 e Droby *et al.*, 2009). Na maioria desses casos, as leveduras agem principalmente por competição de nutrientes e indução de resistência na planta (Fialho, 2004; Zanardo *et al.*, 2009).

As leveduras *Cryptococcus albidus* NPCC 1248, *Cryptococcus victoriae* NPCC 1263 e NPCC 1259 e *Pichia membranifaciens* NPCC 1250, foram testadas contra dois fungos causadores de doença pós-colheita de pera: *Penicillium expansum* (causador do mofo azul) e *Botrytis cinerea* (causador do mofo cinza). As cepas de levedura exibiram uma variedade de mecanismos diferentes, incluindo: a colonização de feridas, a inibição da germinação, a formação de biofilmes, secreção de toxinas *killer*, competição por nutrientes e secreção de enzimas hidrolíticas (protease, quitinase e glucanase) (Lutz *et al.*, 2013). Esses dados sugerem o potencial do uso de leveduras no controle biológico.

Apesar de todo o conhecimento sobre algumas funções das leveduras no ambiente, muito ainda há para ser descoberto, principalmente sobre o seu modo de ação em diferentes ambientes e no antagonismo a outros organismos (Rosa-Magri *et al.*, 2011). Além de o controle biológico ser uma alternativa aos fungicidas, sendo considerado promissor no manejo de inúmeras doenças (Yu *et al.*, 2012; Coelho, 2013).

A seleção de um antagonista é relativa a cada tipo de habitat, ou seja, as chances de eficiência aumentam quando há seleção de organismos provenientes do mesmo ambiente onde são utilizados (Bettiol, 1997). Principalmente porque essas leveduras apresentam capacidade de rápida reprodução e já estão naturalmente competindo por assimilação de nutriente

com outros micro-organismos (El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006; Rosa et al., 2011).

#### **2.3.1.1. Leveduras *killer* no controle biológico**

As leveduras apresentam a capacidade de secretar toxinas que são capazes de inibir o desenvolvimento de outros micro-organismos. Estas são denominadas de toxinas *killer*. A atividade *killer*, de acordo com Somers e Bevan (1969), corresponde à produção de proteínas de baixa massa molecular que são letais às leveduras e outras células sensíveis. Suas toxinas *killer* possuem massa molar que varia de 18 a 300 kDa, dependendo da espécie de levedura (Soares e Sato, 2000).

Esta capacidade de produção de toxinas *killer* é uma das características apresentadas pelas leveduras que contribuíram para que elas se tornassem micro-organismos modelo em diversos estudos de pesquisa básica (Magliani et al., 2008; Santo, Marquina e Peinado, 2000; Marquina, Santos, Peinado, 2002); Fuentesfria, 2007).

Diversos gêneros de leveduras como *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Ustilago*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Williopsis*, *Kluyveromyces* e *Zygosaccharomyces* são capazes de produzir toxinas *Killer*. Interessantemente, as linhagens de leveduras *killer* são imunes às suas próprias toxinas devido a um mecanismo de autoimunidade, mas podem ser sensíveis às toxinas de outras leveduras (Bajaj et al., 2012; Hu et al., 2013). De maneira geral, a atividade das toxinas *killer* é altamente sensível a fatores como pH, temperatura de incubação das leveduras, composição e propriedades físico-químicas do meio e concentração de células sensíveis. Normalmente, as toxinas expressam a atividade *killer* em valores de pH ácido que variam entre 4 e 5, e temperaturas entre 20 a 25°C (Izgu et al., 1997).

Toxinas *killer* específicas de leveduras representam um dos maiores potenciais de novos agentes antimicrobianos devido ao seu amplo espectro de atividade contra leveduras e fungos filamentosos, bactérias (Bajaj et al., 2012; Hatoum, Labrie e Fliss, 2012; Santiago et al., 2012). Aplicações

biotecnológicas dessas toxinas no controle biológico na agricultura envolvem atividade antifúngica contra deterioração de madeira, patógenos de planta, prevenção da deterioração aeróbica da silagem e combate da contaminação de leveduras em alimentos (Marquina, Santo e Peinado, 2002; Schmitt e Breinig, 2002).

Diferentes mecanismos podem afetar as células sensíveis às toxinas *killer* inibindo o crescimento e então promovendo a morte do micro-organismo alvo. Esses mecanismos podem ser por: (1) hidrólise ou inibição da síntese do principal componente da parede celular,  $\beta$ -1,3-glucano, (2) interrupção da divisão celular, bloqueando a síntese de DNA, (3) inibição de canais de  $Ca^{2+}$ , (4) influenciam no potencial de membrana plasmática, alterando o fluxo de íons e reduzindo pH e conseqüentemente causando extravasamento de íons potássio (K) e adenosina trifosfato (ATP), (5) formação de poros capazes de originar canais iônicos resultando em desestabilização do potencial eletroquímico da membrana, (6) atuam em bombas  $H^+$ -ATPase e (7) interferência no transporte de aminoácidos (Hatoum, Labrie e Fliss, 2012; Okorokova-Façanha *et al.*, 2002; Fazio, 2009; Guo *et al.*, 2013; de la Peña, 1981).

Portanto, as toxinas *killer* representam um potencial relevante no controle biológico, sendo uma alternativa promissora na prevenção e/ou no combate de inúmeras doenças que acometem a agricultura.

### **2.3.2. Uso de micro-organismos na promoção do crescimento vegetal**

Estudos recentes têm expandido a pesquisa sobre a biodiversidade, investigando os efeitos da diversidade no ponto do funcionamento do ecossistema com a presença simbiótica de micro-organismos. Desde modo, começaram a explorar se a microbiota simbiote das plantas pode influenciar nas relações entre diversidade e funcionamento dos ecossistemas (Rudgers *et al.*, 2004).

Há várias evidências indicando a existência de um número incalculável de micro-organismos benéficos que ocorrem no solo, na rizosfera ou colonizam

tecidos vegetais (os endofíticos), e que representam um incomensurável potencial latente para promoção do crescimento e da produtividade agrícola mundial (Azevedo *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2006).

Torsvik *et al.* (1990) estimaram que em 1 g de solo há 4000 bilhões de “unidade genômica” de bactérias diferentes baseado em reassociação de DNA-DNA. E aproximadamente 1% das bactérias pode ser cultivável em laboratório. Como as bactérias nem todos os fungos podem ser cultivados pelos métodos de laboratório (van Elsas *et al.*, 2000).

O funcionamento dos ecossistemas é fortemente regulado pela dinâmica microbiana do solo, uma vez que os micro-organismos do solo, sendo envolvidos em ciclos elementares de carbono, fósforo, nitrogênio, e outros, têm um papel na ciclagem de nutrientes, planta decomposição, formação do solo, remoção de toxinas, micorriza, bem como sendo capaz de influenciar o crescimento das plantas e susceptibilidade a patógenos (Dalmastri *et al.*, 1999; Kirk, 2004). A importância da diversidade microbiana do solo para o funcionamento dos ecossistemas agrícolas e naturais é ainda pouco compreendida (van der Heijden e Wagg, 2013).

As interações entre plantas e os componentes bióticos da composição da comunidade do solo interferem na produtividade da planta. As plantas influenciam na composição da comunidade de organismos do solo em torno das suas raízes, e essa comunidade de organismos por sua vez influencia no desempenho da planta, seja diretamente através de efeitos antagônicos ou mutualistas ou através de seus efeitos sobre a disponibilidade de nutrientes. (van de Voorde, van der Putten e Bezemer, 2012). Essas interações podem ser por micro-organismos do solo, tais como bactérias, fungos micorrízicos ou fungos patogênicos (Packer e Clay, de 2000; Klironomos, 2002; Kardol *et al.*, 2007), mas também por nematoides, protozoários (De Deyn *et al.*, 2003).

Os micro-organismos influenciam a composição e a quantidade de vários componentes dos exsudatos radiculares, por meio de seus efeitos no metabolismo das células da raiz, bem como no estado nutricional das plantas. Por outro lado, os exsudatos radiculares também influenciam no crescimento de bactérias e fungos que colonizam a rizosfera pela alteração do ambiente do

solo circundante, servindo como o substrato para crescimento seletivo dos micro-organismos (Cardoso e Nogueira, 2007).

Por ter vastas áreas agricultáveis e a maior parte do seu território na região tropical, o Brasil e todos da América Latina, mostram a sua agricultura gravemente afetada por pragas agrícolas (Azevedo *et al.*, 2000). Outro fato que afeta a produtividade agrícola é o crescimento populacional que está ligado com o decréscimo correspondente de terras aráveis, de água e de nutrientes. Devido a todas essas barreiras, para manter a produção de alimentos, o crescimento de novos cultivos que respondem ao aumento de insumos como práticas culturais melhoradas, fertilizantes e pesticidas químicos teve que ser estabelecido (Barrow *et al.*, 2008).

A maioria dos países tem tradicionalmente utilizado vários tipos de materiais orgânicos para manter ou melhorar a fertilidade e produtividade dos seus solos agrícolas (Ngampimoll e Kunathigan, 2008). Contudo, a utilização maciça de fertilizantes sintéticos e defensivos também está associada à eutrofização de aquíferos e reservatórios de água e à acidificação do solo. Além de ocorrer perda de qualidade do solo devido ao revolvimento da camada arável e remoção da matéria orgânica, aumento na concentração atmosférica de gases relacionados ao efeito estufa, em virtude da dependência da matriz energética do petróleo (Anuniação de Jesus, 2013).

Os micro-organismos podem promover o crescimento das plantas e a saúde através de uma série de mecanismos, incluindo a suplementação das plantas com nitrogênio fixado biologicamente, fitormônios, substâncias voláteis, compostos de defesa, e enzimas (Lonhienne *et al.*, 2013).

Um dos benefícios do biofertilizante é uma contribuição da população de micro-organismos disponíveis. Biofertilizante é vulgarmente referido como o fertilizante que contém micro-organismos vivos e espera-se que as suas atividades possam influenciar nos ecossistemas do solo e produzir substância suplementar para as plantas. Existem diferentes tipos de biofertilizantes disponíveis e suas diferenças são principalmente em matérias-primas utilizadas, formas de utilização e as fontes de micro-organismos. A aplicação do biofertilizante tem como objetivo funcionar como inóculo de micro-

organismos no solo e que ele ajude a estabelecer ou restabelecer os ecossistemas do solo (Ngampimoll e Kunathigan, 2008).

Medina *et al.* (2004) relataram que o aumento da biodiversidade microbiota fúngica em solos degradados pode ser obtida através da aplicação de bioinóculo microbiano composto de fungo micorrízico arbuscular e a levedura *Y. lipolytica*. A simples inoculação de *S. cerevisiae* em legumes estimulou a nodulação e colonização de raízes por FMA's, enquanto que outras leveduras de solo basidiomicetos inoculadas também foram capazes de aumentar o crescimento de FMA's (Fracchia *et al.*, 2000, Bobby *et al.*, 2007). A inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em solos degradados isoladamente resulta no aumento da fertilidade, mas bioinóculos combinando esses fungos com leveduras podem ter resultados ainda mais satisfatórios (Miller e Jastrow, 1992; Pflieger *et al.*, 1994).

Segundo a Lei nº 6894, de 16 de novembro de 1980, regulamentada pelo Decreto nº 4954, de janeiro de 2004, bioinoculante é o produto que contém micro-organismos com ação favorável ao crescimento de plantas (Bucher e Reis, 2008). A utilização do veículo adequado e a adição de materiais que favoreçam o bom desenvolvimento e a multiplicação dos microrganismos são fundamentais para alcançar o número mínimo de células viáveis ( $1 \times 10^9$  células/g ou mL do bioinoculante) exigido pelo MAPA.

A Embrapa Agrobiologia lançou, em 2008, o primeiro inoculante para cana-de-açúcar que é composto por um coquetel de 5 estirpes: *Herbaspirillum seropedicae* (BR11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR11281T), *Burkholderia tropica* (BR11366T) e *Azospirillum amazonense* (BR11145) (EMBRAPA, 2014). Em 2009, após sucessivas pesquisas desenvolvidas pela Embrapa Soja e a Universidade Federal do Paraná (UFPR) utilizando estirpes de *Azospirillum* na promoção de crescimento de milho e trigo, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) concedeu autorização das estirpes *A. brasilense* Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 para a produção de bioinoculantes para a cultura do milho, devido ao incremento que estas proporcionaram no rendimento de grãos de 24% a 30% em relação ao controle não inoculado (Hungria, 2011). O produto final foi um bioinoculante líquido comercial contendo *Azospirillum* e



moléculas protetoras para as condições tropicais, lançado em 2010 e capaz de incrementar o rendimento médio de grãos em 26%.

Lonhienne *et al.* (2013) constataram que a adição de leveduras *S. cerevisiae* vivas ou mortas para o solo fertilizado aumentou substancialmente o nitrogênio e fósforo do conteúdo das raízes e dos brotos de tomate (*Solanum lycopersicum*) e plantas de cana-de-açúcar jovens, e aumentou a relação raiz-parte aérea em ambas as espécies. Estes resultados suportam que as leveduras podem ser um biofertilizante de custo-benefício que melhora não só a nutrição das plantas, mas também o vigor das plantas durante a fase de crescimento inicial.

Mekki e Ahmed, (2005) observaram que a aplicação de adubo orgânico com a levedura *C. tropicales* resultou em um aumento no rendimento de grãos e atributos das plantas de soja e a porcentagem do óleo das sementes foi aumentada nas plantas tratadas somente com biofertilizante e também as tratadas com adubo orgânico e junto com levedura. Tefera *et al.*(2009) avaliaram o efeito da inoculação do fungo endofítico *Beauveria bassiana* em folhas, caules, e raízes de sorgo constatando que colonização de folhas e caules foram melhores do que raízes.

Os processos benéficos promovidos pelos micro-organismos endofíticos terão sucesso, desde que estes sejam capazes de estabelecerem-se endofiticamente no interior do vegetal, ocupando e se multiplicando nos tecidos do hospedeiro, superando os impedimentos físicos e químicos por ele estabelecidos, construindo assim, vias de infecção e sítios de colonização (Anuniação de Jesus, 2013).

### **2.3.3. Potencial de micro-organismos na produção de enzimas hidrolíticas**

Na natureza, os micro-organismos foram dotados de vastas potencialidades. Eles produzem uma variedade de enzimas, que têm sido exploradas comercialmente ao longo dos anos (Jayani, Saxena e Gupta, 2005). Os fungos são os mais importantes micro-organismos utilizados pela indústria na produção de enzimas (Aguiar e Menezes 2000).

Enzimas hidrolíticas, tais como proteases, amilases, lipases, DNAses, e xilanases têm diversos usos potenciais em diferentes áreas, tais como indústria de alimentos, aditivo, ciências biomédicas, e indústria química. A hemicelulase e celulase são exemplos de enzimas de grande importância devido à sua aplicação na degradação de biomassa.

Nesse trabalho, analisou a atividade das enzimas hidrolíticas: celulase, lipase, protease e pectina, as quais estão brevemente descritas a baixo.

#### **2.3.3.1. Lipase**

A principal função biológica da lipase (triacilglicerol acil hidrolases, E.C.3.1.1.3) é catalisar a hidrólise de longas cadeias de triacilglicerídeos. Ao contrário de muitas outras enzimas, as lipases demonstram níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos, o que facilita a catálise de muitas reações (Martins, Kalil e Costa, 2008).

Essas enzimas têm sido utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos, de detergentes, óleoquímica (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes) e para tratamento de resíduos oleosos provindos da indústria do couro e de papel (Coelho *et al.*, 2010).

As lipases têm sido extraídas de bactérias, plantas, actinomicetos e células animais. As microbianas são mais versáteis, devido à sua potente aplicação nas indústrias, como mencionado anteriormente. Estas enzimas podem catalisar várias reações tais como: hidrólise, interesterificação, esterificação, alcoólise e amilose (Jaeger e Ransa 1994; Sztajerh e Zbońska, 1988; Jaeger e Eggert, 2002; Karigar e Rao, 2011).

A produção de lipases pode ser influenciada por diferentes variáveis, como o micro-organismo produtor da enzima, as fontes de carbono e nitrogênio, a concentração de oxigênio dissolvido, a composição, temperatura e pH do meio, as condições de aeração e agitação e até mesmo a geometria do biorreator (Elibol e Ozer, 2000).

Alguns micro-organismos são conhecidos por acumular lipídios. Essas espécies capazes de fazê-lo em um nível correspondente a mais de 20% da

sua biomassa são descritas como oleaginosas. *Y. lipolytica* é um exemplo de uma levedura oleaginosas capaz de acumular lipídios em quantidade correspondendo a 50% de seu peso seco. Um dos mais importantes produtos secretados por este micro-organismo é a lipase. (Beopoulos *et al.*, 2009; Beopoulos, Nicaud e Gaillardini, 2011).

*Y. lipolytica* é um micro-organismo com diferentes aplicações biotecnológicas. É um fungo aeróbio, dimórfico que se destaca devido à sua capacidade de crescer em ambientes hidrofóbicos. A levedura *Y. lipolytica* JM-12 é frequentemente isolada de diferentes tipos de alimentos (queijos, linguiça, etc), a partir dos solos, esgoto, e naturais ambientes, tais como campos de petróleo (Barth e Gaillardin, 1997).

Essa levedura é capaz de utilizar substratos hidrofóbicos (por exemplo, alcanos, ácidos graxos e óleos) eficientemente como uma fonte única de carbono. Sua superior capacidade de acumular lipídios quando cultivadas sobre estes substratos está provavelmente relacionada com saliências formadas na superfície das células, facilitando a absorção de substratos hidrofóbicos do meio (Beopoulos *et al.*, 2008; Beopoulos, Nicaud e Gaillardini, 2011).

#### **2.3.3.2. Celulase**

Existe um interesse mundial no potencial de comercialização do uso de celulases em meios alimentícios e também na conversão química e biológica de materiais lignocelulolíticos. Recentemente tem aumentado as pesquisas voltadas para os mecanismos enzimáticos da celulose e os problemas envolvidos na conversão direta da biomassa em produtos úteis por meio de enzimas isoladas ou de micro-organismos lignocelulolíticos (Baldrian e Valášková 2008; Dimarogona, Topakas e Christakopoulos, 2012).

Os componentes principais dos materiais lignocelulolíticos são celulose (40-50%), hemicelulose (20-40%) e lignina (20-30%), proteínas, lipídios, pectina, açúcares solúveis e minerais são componentes menores (Horn *et al.*, 2012). Atualmente, os maiores usos da lignocelulose concentram-se nas polpas e indústrias de papel, proteína para ração, em meios tecnológicos de

alimentação, além de poderem gerar energia através da produção de etanol. Enzimas lignocelulolíticas também têm um potencial significativo na indústria química, de combustível, de comida, cerveja e vinho, animal, têxtil, celulose e papel e na agricultura (Alvira *et al.*, 2009; Arantes e Saddler, 2010; Castro, 2010; ).

As celulosas são enzimas de importância econômica e são vendidas em grande volume tendo diferentes aplicações industriais, como por exemplo, no processamento do amido, produção de ração animal, fermentação de grãos para produção de álcool, extração de suco de frutas e vegetais, polpa e indústria de papel e indústria têxtil. Atualmente a mais importante aplicação para celulasas é o bio-branqueamento da polpa na indústria de papel, a produção da polpa dissolvida, o tratamento de água residual e a reciclagem dos resíduos do papel (Deswal *et al.* 2011; Dashtban *et al.*, 2010).

Uma grande variedade de fungos e bactérias consegue degradar esse material lignocelulósico usando uma bateria de enzimas hidrolíticas e oxidativas. Em geral, os fungos que decompõem substâncias lignocelulósicas ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes. Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulasas, entretanto apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, diversos substratos são utilizados com o objetivo de se induzir e/ou medir a atividade do complexo lignocelulolítico total, tais como: algodão, papel filtro, carboximetil celulose e resíduos agrícolas (Aguar e Menezes, 2000). Ligninolíticas fungos podem ser usados para a remediação dos poluentes na água e no solo (Novotný *et al.*, 2004).

A degradação do complexo lignocelulósico para libertar celulose pode ser conseguida com a ajuda de micro-organismos: fungos de degradação branca, degradação marrom e degradação branda ou macia. Esses fungos degradadores são taxonomicamente variados e pertencem principalmente à classe Basidiomycetes (Sarkar *et al.*, 2012). Os fungos de degradação branda e degradação branca têm sido extensivamente estudados enquanto degradação marrom não tem sido muito estudada (Deswal *et al.* 2011).

Os basidiomicetos responsáveis pela degradação branca da madeira selecionam a lignina presente na parede celular, deixando a celulose praticamente intacta, mas variam consideravelmente com o tipo de ataque à lignina, com os polissacarídeos da madeira e a velocidade com o qual atuam na remoção da lignina (Filho, 2008). *Ceriporiopsis subvermispora*, *Phlebia spp.*, *Physisporinus rivulosus*, *Dichomitus squalens*, *Trametes versicolor*, *Heterobasidium annosum*, *P. chrysosporium* e *Irpex lacteus*, são alguns exemplos (Dashtban et al., 2010).

Os fungos de degradação marrom promovem a degradação dos polissacarídeos celulose e hemicelulose, e deixam a lignina intacta. Com essa característica, o material restante desse processo tem uma coloração amarronzada e de aparência. Esses fungos representam somente 6% da classe Basidiomicetos degradadores de madeira (Lee e Moon 2003). Alguns exemplos de fungos de degradação marrom: *Postia placenta*, *Laetiporus portentosus*, *Piptoporus betulinus* and *Gloeophyllum trabeum* (Dashtban et al., 2010).

Os fungos de degradação branca geralmente pertencem às classes Ascomycetos e Deuteromicetos, esses fungos podem causar degradação na madeira em uma forma suave, de aparência úmida (Jørgensen et al., 2005; Filho, 2008).

Fungos são considerados os mais importantes micro-organismos utilizados pela indústria na produção de enzimas, e os principais celulolíticos produtores de celulasas incluem: *Trichoderma reesei* (também denominado *Trichoderma viride*), *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulverulentum* (também denominado *Chrysosporium lignorum*), *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriensis*, *Aspergillus sp*, *Schizophyllum m sp*, *Chaetomium sp* e *Humicola sp* (da Silva et al., 1993).

#### **2.3.3.3. Protease**

As enzimas proteolíticas têm papel metabólico essencial e funções de regulação de muitos processos biológicos e também oferecem uma ampla gama de aplicações biotecnológicas tais como aplicações industriais de

alimentos, de couro, de detergentes e de farmacêuticos (Sabotič e Kos, 2012; Karigar e Rao, 2011).

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de proteínas totais. Essas enzimas representam um dos três maiores grupos de enzimas industriais e são responsáveis por cerca de 60% da venda total mundial de enzimas (Rao *et al.*, 1998; Sumantha, Larroche e Pandey 2006).

As proteases microbianas representam aproximadamente 40% do total mundial em vendas de enzima (Rao *et al.*, 1998). As proteases de origem microbiana são preferidas uma vez que elas possuem quase todas as características desejadas para o sua aplicação biotecnológica e são diretamente secretadas no meio de fermentação, o que facilita os processos de recuperação (Gupta *et al.*, 2002). Proteases extracelulares de leveduras são também relevantes em processos biotecnológicos tais como na estabilização de cervejas e vinhos, alimentos, produtos farmacêuticos (Ogrydziak, 1993).

Os fungos possuem uma maior variedade de enzimas do que as bactérias. Como exemplo, fungo *Aspergillus oryzae* produz proteases ácida, neutra, e as alcalinas. (Rao *et al.*, 1998). Espécies de *Penicillium* também são descritas por produzirem proteases neutras (Dahot, 1993; Germano *et al.*, 2003). Proteases neutras de fungos são um importante componente de preparações comerciais de proteases fúngicas, as quais têm aplicações em panificação, processamento de alimentos, modificação de proteína, indústrias de alimentos para animais e farmacêutica (Sumantha, Larroche e Pandey, 2006).

Contudo, a maioria das proteases produzidas por fungos são proteases ácidas, as quais compõem o grupo de maior interesse para a indústria de alimentos e farmacêutica podendo ser amplamente dividida em dois grupos: (i) enzimas semelhantes à pepsina, produzidas por *Aspergillus*, *Penicillium*, *Neurospora* e *Rhizopus* e (ii) enzimas semelhantes à renina, produzidas por *Endothia* e *Mucor*. Dentre os relatos de produção de proteases por leveduras, pode citar as espécies *Candida humicola*, *Candida pulcherrima*, *Leucosporidium antarcticum*, *Aureobasidium pullulans* e *Cryptococcus sp.* (Chaud, 2014).

#### 2.3.3.4. Pectinase

A pectina é formada por ácidos pectínicos solúveis em água com grau variável de grupos metil-éster (Uenojo e Pastore, 2007). Matérias pécnicas representam 0,5 - 4,0% do peso fresco de material vegetal. As pectinases são produzidas principalmente na natureza por saprófitos e patógenos de plantas (bactérias e fungos) para a degradação da parede celular das plantas (Solbak *et al.*, 2005; Uenojo e Pastore, 2007).

Pectinase é um termo bem conhecido para a preparação comercial de enzimas que quebram a pectina, um substrato de polissacarídeo, encontrado na parede celular de plantas e contribuiu para a firmeza e estrutura dos tecidos vegetais (Jacob e Prema, 2006; Akhter *et al.*, 2011). Essas enzimas são uma parte integrante de indústrias de sucos (clarificação e extração), indústrias têxteis, maceração de folhas de chá, processamento de tecido de algodão, processamento do vinho, extração de petróleo, bem como em várias aplicações biotecnológicas (Alkorta *et al.*, 1998; Solbak *et al.*, 2005; Jacob e Prema, 2006; Angayarkanni *et al.*, 2002; Kashyap *et al.*, 2001).

As duas principais fontes de enzima pectinase são plantas e micro-organismos, sendo que a fonte microbiana de pectinase é cada vez mais importante, as quais são responsáveis por 25% do global de alimentos venda enzima (Jayani, Saxena e Gupta, 2005).

Os fungos filamentosos são os mais frequentemente usados na produção comercial de pectinase (Banu *et al.*, 2010), sendo que o fungo *Aspergillus Níger* é o principal nas preparações comerciais de pectinases (Singh *et al.*, 1999). Porém, uma grande variedade de cepas de bactérias e de levedura também é capaz de produzir enzimas pécnicas (Akhter *et al.*, 2011).

### 3. OBJETIVOS

Investigar a microbiota presente nos tecidos vegetais de cana-de-açúcar quanto ao seu potencial biotecnológico.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificação molecular dos isolados de cana-de-açúcar através da análise em bancos de dados por meio de BLAST;
- Avaliar o potencial *in vitro* dos isolados de cana-de-açúcar no controle biológico dos fungos filamentosos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium decumbens*;
- Avaliar o potencial dos isolados de cana-de-açúcar em produzir enzimas hidrolíticas: lipase, celulase, protease e pectinase;
- Avaliar o potencial de leveduras em promover o crescimento *in vitro* de raízes de milho.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Cepas isoladas

Um total de 21 cepas de levedura previamente isoladas de três variedades de cana-de-açúcar *Saccharum s pp.* (CB56155, RB867515 e SP803280) no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia (Fortunato, 2011) foi utilizado neste trabalho (Tabela 1). A nomenclatura das cepas é referente ao trabalho de Fortunato, 2011.

**Tabela 1:** Leveduras isoladas de três variedades de cana-de-açúcar usadas no trabalho

Variedades		
RB 867515	CB 56155	SP 803280
RBG 205-12	CBA 205-10	SPA 205-07
RBG 205-16	CBA 106-17	SPA 106-05
RBG 205-20	CBA 106-19	SPA 106-08
RBG 205-21	CBA 106-21	SPA 106-09
RBG 105-07	CBA 106-23	SPA 106-12
RBG 105-09	CBA 106-24	SPA 106-13
RBG 105-14		SPG 105-06
RBG 105-17		
Total de isolados: 21		

### 4.2. Preparação do meio de cultura e manutenção das cepas isoladas

As cepas de leveduras isoladas, foram mantidas/conservadas em placas de Petri e tubo inclinado contendo o meio de cultivo *Sabouraud* sólido (20g D(+) glicose; 10g peptona especial; 17g ágar em 1L). A cada 3 meses foi feito um novo repique e posteriormente foram submetidas ao controle de esterilidade em estufa por 48h. As colônias foram mantidas em estufa a 30°C para crescimento das mesmas por 72 horas e só então conservadas em refrigerador a 4°C. Para os demais procedimentos em laboratório que

necessitem de crescimento das cepas de levedura em meio líquido foi utilizado o meio *Sabouraud* líquido (10g peptona micológica; 20g dextrose em 1L).

O meio de cultivo YED sólido (1% de glicose, 1% de extrato de levedura e 50mg/mL de lisina, leucina e uracila, 3% ágar em pH 4,5) foi usado para a manutenção da levedura *Yarrowia lipolytica* JM-12.

### **4.3. Identificação das cepas de leveduras isoladas**

#### **4.3.1. Extração e quantificação do DNA total**

As cepas isoladas das três variedades de cana-de-açúcar estudadas foram submetidas à análise molecular para a determinação taxonômica com base nas suas sequências de DNA ribossomal.

A extração do DNA genômico foi realizada segundo protocolo #6 (Isolamento em larga escala de DNA a partir de células de levedura) do kit de extração de DNA *Easy-DNA™ Kit* (Invitrogen).

As células de levedura foram crescidas em meio *Sabouraud* sólido e uma colônia isolada foi transferida para o 25 mL de meio *Sabouraud* líquido onde foram crescidas a 30°C por 18h.

Resumidamente, a extração foi dividida em três etapas. Na primeira etapa de lavagem das células, 10 mL da cultura foram adicionados em um tubo falcon de 15 mL e centrifugados em 4000 × g por 10 min a 4°C e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 10 mL de água ultrapura estéril no *pellet* e suavemente homogeneizado, e centrifugado 4000 × g por 10 minutos a 4°C, e foi descartado novamente o sobrenadante. O *pellet* foi ressuspenso em 2 mL de solução SCDE (1 M de sorbitol, 10 mM de citrato de sódio pH 5,8, 1 mM de EDTA, 10 mM de DTT) e foi incubado em 37°C durante 1h.

Na seguinte etapa de isolamento do DNA, foram adicionados 3,5 mL da Solução A do kit de extração de DNA (*Easy-DNA™ Kit*) nas células e em seguida homogeneizado em *vortex* por 1 segundo e incubadas por 10 minutos a 65°C. Após esse tempo, foram adicionados 1,5 mL da Solução B do kit de extração de DNA e homogeneizado em *vortex* por 1 minuto. Posteriormente

foram adicionados 5 mL de clorofórmio e o homogeneizado em *vortex* até diminuir a viscosidade e então centrifugado em  $1000 \times g$  por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para separar as fases. Cuidadosamente foi descartada a parte superior (fase aquosa) em um novo tubo.

Na última etapa de precipitação do DNA, foram adicionados 10 mL de etanol 100% gelado e homogeneizado rapidamente, e incubado por 30 minutos no gelo. Posteriormente, foi centrifugado a  $4000 \times g$  por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e o etanol descartado. Foram adicionados 5 mL de etanol 80% gelado e misturado com inversão dos tubos até ficar homogêneo e então novamente submetidos à centrifugação a  $4000 \times g$  por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , e o etanol removido. Os tubos foram deixados secar ao ar livre por 5 minutos para evaporação total do etanol. Então o *pellet* foi ressuscitado em 100  $\mu\text{L}$  de tampão TE (tampão EDTA) do kit de extração de DNA com 2  $\mu\text{L}$  de RNase 2 mg/mL para uma concentração final de 40  $\mu\text{L}/\text{mL}$  e incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para um microtubo e estocado a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Após a extração, para se estimar a concentração do DNA foi utilizado o aparelho NanoDrop.

#### **4.3.2. Amplificação do material genômico**

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram feitas utilizando o Kit *Platinum® PCR SuperMix High Fidelity*, um mix contendo anticorpo anti-Taq DNA polimerase,  $\text{Mg}^{2+}$ , desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs), Taq DNA polimerase recombinante, e *Pyrococcus* species *GB-D* term estável polimerase.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TAE 1x (2 M Tris, 1 M ácido acético, 0,05 M EDTA), eluídos durante aproximadamente 2 horas a 100V. Os géis foram corados com solução de brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em um sistema de foto-documentação de gel.

#### 4.3.2.1 Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4

Para o sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA utilizando os iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') segundo Lachance *et al.* (1999). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo: 2 µL de DNA, 1 µL de cada iniciador NL1 e NL4 10 µmol<sup>-1</sup>, 45 µL do o *Platinum® PCR SuperMix High Fidelity* e 1 µL de água deionizada estéril. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 54°C por 25 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos, seguida por extensão final a 72°C por 10 minutos.

#### 4.3.2.2. Amplificação utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4

Os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') foram utilizados para amplificação da região ITS do rDNA, conforme descrito por White *et al.* (1990). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µL contendo 2 µL de DNA, 1 µL de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 µmol<sup>-1</sup>, 45 µL do o *Platinum® PCR SuperMix High Fidelity* e 1 µL de água deionizada estéril. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador. O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento a 55°C e 1 minuto de extensão a 72°C, e uma extensão final por 5 minutos a 72°C.



**Figura 1:** Representação esquemática dos genes ribossomais fúngicos contendo as áreas alvo de iniciadores NL1-NL4 e ITS1-ITS4 usados neste estudo.

#### 4.3.3. Purificação dos amplicons

Os amplicons são submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e cada banda separadamente é cortada e então submetida à purificação. A purificação de DNA de gel de agarose foi estabelecido pelo fabricante do *Kit Illustra™ GFX™ PCR and Gel Band Purification* (GE Healthcare).

#### 4.3.4. Sequenciamento e análise das sequências e homologia com banco de dados

Os fragmentos amplificados que foram purificados foram sequenciados na Unidade de Experimentação Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Para a identificação das cepas de leveduras isoladas de cana-de-açúcar, as sequências de DNA foram analisadas comparativamente via BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) contra a base de dados do GenBank no NCBI (National Center For Biotechnology Information), que utiliza o método heurístico para encontrar o melhor score de alinhamentos locais entre as sequências submetidas e o banco de dados. Dessa forma foram consideradas as sequências que apresentaram os mais altos valores de similaridade (99% -100%).

#### **4.4. Análise da promoção do crescimento de raízes de milho**

##### **4.4.1. Produção dos inoculantes**

As cepas utilizadas foram CBA 106-19, SPA 106-12 e 848 UFRJ, as quais foram consideradas sendo as mais promissoras do crescimento vegetal segundo algumas características prévias descritas por Fortunato, 2011 e a levedura *Yarrowia lipolytica* JM -12

A produção do inoculante fungíco foi realizada a partir da obtenção de colônias isoladas das leveduras (CBA 106-19, SPA 106-12, 848 UFRJ *Yarrowia lipolytica* JM -12) e crescidas em pré-inóculo contendo 10 mL de meio de cultivo líquido *Sabouraud* e mantidas sob agitação (250 rpm, por  $\pm$  24 h a 30°C). O pré-inóculo obtido foi utilizado para produzir um volume maior de inoculante, crescido por 18h sob as mesmas condições. O experimento foi feito utilizando 6 diferentes combinações de inóculos de leveduras ( $DO_{600nm}$  inicial = 0,1): 1. *Yarrowia lipolytica* JM -12, 2. CBA106-19 + SPA 106-12, 3. *Yarrowia lipolytica* JM -12 + CBA106-19 + SPA 106-12, 4. 848 UFRJ, 5. 848 UFRJ + CBA106-19 + SPA 106-12, 6. Meio de cultivo estéril.

##### **4.4.2. Inoculação das sementes**

Sementes de milho da variedade UENF 506-11 foram cedidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (Pesagro-Rio) do Polo de Itaocara. Previamente as sementes foram desinfetadas por meio de imersão em solução de hipoclorito de sódio (50%) por 30 minutos, lavadas com água destilada estéril 2 vezes e seguida imersão em álcool 70% por 5 minutos e, seguida de 4 lavagens consecutivas com água destilada esterilizada. Após desinfecção, as sementes de milho foram embebidas por 3h em água estéril.

Posteriormente as sementes foram incubadas por 1h em 6 diferentes combinações de inóculos de leveduras (descrita no item 3.5.1.). Em seguida, as sementes foram transferidas com auxílio de pinça esterilizada, para placas de Petri, contendo meio de cultura YED – 1% Ágar em pH 4,5. As sementes foram crescidas por 7 dias no escuro em estufa a 30°C.

#### 4.5. Ensaio de bioatividade contra fungos filamentosos

As linhagens fúngicas utilizadas nos ensaios de antagonismo foram: *F. oxysporum*, *C. lindemuthianum* e *P. decumbens*.

Estes fungos foram cedidos pela professora Valdirene Moreira Gomes do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-Organismos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e foram crescidos em meio *Sabouraud* sólido a 30 °C durante 15 dias. Após esse período foi feito disco dos fungos que foram mantidos em solução salina (NaCl 0,15 mM) na geladeira.

A atividade antagonista contra os fungos filamentosos foi baseada na metodologia descrita por Pallu 2010. Resumidamente, o teste foi avaliado pelo método da cultura pareada, a qual consiste no confronto direto, em meio de cultura sólida, do antagonista (levedura isolada de cana-de-açúcar) e do fungo filamentoso.

Um disco do fungo filamentoso foi adicionado na metade da placa de Petri contendo o meio de cultura e então crescido até aproximadamente alcance da metade da placa (aproximadamente 7 a 9 dias). Após esse período foi adicionado um *spot* contendo a cultura das cepas de levedura isoladas de cana-de-açúcar. As cepas de leveduras foram adicionadas posteriormente, devido ao crescimento mais lento do fungo filamentoso garantindo que as cepas de levedura, com crescimento mais acelerado, não tivessem a viabilidade do crescimento comprometido.

A determinação da bioatividade das leveduras isoladas de cana-de-açúcar foi através da formação do halo de inibição do crescimento. Os experimentos foram realizados com 3 repetições com duplicata do *spot* das culturas de levedura em cada placa.

#### **4.6. Ensaio s quantitativos da degradação de enzimas hidrolíticas em meio de cultura sólido**

A utilização de meio sólido para detecção de enzimas em fungos, teve como base o trabalho de Hankin e Agnostakis (1975) e Pallu (2010).

Foram realizados ensaios semiquantitativos em meio de cultura sólido para avaliar a capacidade de secreção enzimática pelas cepas isoladas de cana-de-açúcar das seguintes enzimas: lipase, protease, celulase e pectinases.

Foram realizados inóculos (*spot* equivalente a 20  $\mu$ L), das culturas crescidas em *Sabouraud* a 30°C durante 24h. Os inóculos foram adicionados no centro de placas de Petri contendo 20 mL de cada meio de cultura específico para cada enzima analisada e então crescidos a 30°C por 7 dias.

Para a produção de lipase, foi utilizado meio de cultura contendo peptona (10g); NaCl (5g); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,1 g); ágar (15 g) em 1000 mL de água destilada (pH 6,0). Para avaliar a atividade da enzima, 10 mL de Tween 20 (Sigma) foi esterilizado separadamente e adicionados ao meio de cultura previamente autoclavado (Sierra, 1957). A atividade lipolítica é detectada pelo aparecimento de um precipitado visível, resultante da deposição de cristais de sais de cálcio formados pelos ácidos graxos liberados devido à ação enzimática e formação de um halo furta-cor ao redor da colônia (Gopinath; Anbu; Hilda, 2005).

Para a produção de protease foi utilizado meio de cultura Ágar nutriente (Difco). Uma solução de gelatina 2% (Sigma) esterilizada separadamente e adicionada ao meio Ágar nutriente na proporção de 5 mL para cada 100 mL de meio de cultura. A atividade gelatinolítica é detectada pela formação de uma zona clara ao redor das colônias, em comparação à opacidade do ágar (Gopinath; Anbu; Hilda, 2005).

Para produção de celulase, o meio ágar contendo: sacarose 30,0 g, nitrato de sódio 3,0 g, de sulfato de magnésio 0,5 g, cloreto de potássio 0,5 g, sulfato de ferro (III) 0,01 g, hidrogenofosfato dipotássico 1,0 g, ágar-ágar 13,0 g/L, pH 7,0) com 1% de celulose (Sigma) em água destilada foi autoclavado (Gopinath; Anbu; Hilda, 2005).



A secreção de pectinases foi avaliada em meio de cultura contendo extrato de levedura (1g), pectina cítrica (5g), 500 mL de solução de sais (2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2 g  $\text{FeSO}_4$ ; 1 mg  $\text{CaCl}_2$ ;  $10 \mu\text{g}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ;  $10 \mu\text{g}$   $\text{MnSO}_4$ ;  $70 \mu\text{g}$   $\text{ZnSO}_4$ ;  $50 \mu\text{g}$   $\text{CuSO}_4$ ;  $10 \mu\text{g}$   $\text{MoO}_3$  para cada 1000 mL de água destilada), 500 mL de água destilada e 15 g de Ágar (Hankin e Agnostakis, 1975). A atividade pectinolítica é determinada pela formação de uma zona clara ao redor da colônia após a adição de uma solução de brometo hexadeciltrimetilamônia (1%) durante 15 min, (Hankin e Agnostakis, 1975).

A produção enzimática foi realizada em triplicata. A produção das enzimas analisadas (lipase, protease, celulase e pectinases) foi através das características descritas nas metodologias. Para as que deram teste positivo, foram medidos os diâmetros perpendiculares tanto da colônia quanto do halo de degradação.

## 6. DISCUSSÃO

A diversidade de micro-organismos existentes na Terra é excepcional. Esses organismos são encontrados habitando seres vivos, ar, água, solo, comprovando a versatilidade desses seres em se desenvolverem em habitats, por muitas vezes, inóspitos (Maki, 2006). Os fungos compreendem aproximadamente 72.000 espécies descritas, entretanto a verdadeira escala de diversidade de fungos é um debate aberto e recorrente (Arnold *et al.*, 2000).

Nesse trabalho foi dada continuidade ao trabalho de Fortunato (2011) que isolou e caracterizou 21 micro-organismos isolados de cana-de-açúcar como sendo leveduras, realizando a identificação molecular desses isolados através do sequenciamento de regiões conservadas específicas para fungos. Os iniciadores são para: região D1/D2 da subunidade maior do 28S DNA ribossomal (iniciadores NL1-NL4) e região 5.8S DNA ribossomal (iniciadores ITS1-ITS4). As sequências obtidas foram comparadas em banco de dados de DNA usando análise de BLAST (Tabela 1). Apesar de ambos os iniciadores serem bem descritos na literatura (Fujita *et al.*, 2001; El-Sharoud *et al.*, 2009), o intuito de se utilizar os dois pares de primers nesse trabalho foi de garantir uma identificação mais exata para os isolados de cana-de-açúcar, podendo comparar as identificações obtidas com os seguimentos amplificados.

Todas as cepas foram capazes de ser identificadas por ambos os pares de primers, exceto as RBG 205-20 e CBA 106-17 que apenas foram caracterizadas pelos iniciadores ITS1-ITS4, fato que foi causado pelo baixo rendimento de material a ser sequenciado, provavelmente ocorrido pela perda de material genético durante as etapas anteriores ao sequenciamento. A levedura *Y. lipolytica* JM-12 também foi analisada apenas para os iniciadores ITS1-ITS4 e esta levedura foi utilizada como uma cepa controle na identificação das demais cepas, já que é uma espécie que possui o genoma conhecido (Kegg Genome, 2015; Dujon *et al.*, 2004).

Comparando as identificações das sequências obtidas por BLAST é possível observar que para ambos os pares de iniciadores a maioria das identificações de espécies foi equivalente. Exceto para as cepas CBA 106-19 (NL1-NL4: *Candida fermentati* e ITS1-ITS4: *Meyerozyma guilliermondii*), CBA

106-21, CBA 105-23, SPA 106-08, SPA 106-13 e SPA 205-07 (NL1-NL4: *Meyerozyma guilliermondii* e ITS1-ITS4: *Meyerozyma caribbica*), SPA 106-12 (NL1-NL4: *Candida akabanensis* e ITS1-ITS4: *Candida sp.*). Porém, para as cepas CBA 106-21, CBA 105-23, SPA 106-08, SPA 106-13 e SPA 205-07 a identificação de gênero foi equivalente para todas como *Meyerozyma*.

*Meyerozyma guilliermondii* (anamorfo *Candida guilliermondii*) e *Meyerozyma caribbica* (anamorfo *Candida fermentati*) estão intimamente relacionados como espécies geneticamente heterogêneas *M. guilliermondii*. (Romí *et al.*, 2014). *M. guilliermondii* é uma espécie de levedura amplamente isolada a partir de diversos ambientes naturais (Corte *et al.*, 2015), tais como estações de tratamento de águas residuais (Lahav *et al.*, 2002), a partir de superfícies de insetos (Suh e Blackwell, 2004), feridas de milho (Nout *et al.*, 1997) e muitas vezes isoladas de frutas com alta densidade relativamente de açúcar como abacaxi (Chanprasartsuk *et al.*, 2010), uvas e vinho (Chavan *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010).

Portanto, os resultados podem comprovar que ambos os pares de iniciadores foram capazes de identificar as leveduras isoladas de cana-de-açúcar. Segundo a identificação obtida pelos primers ITS1-ITS4, as 5 cepas foram identificadas como: *Rhodotorula mucilaginosa* (RBG 105-07, RBG 104-14, RBG 205-21, CBA 106-24 e SPA 106-05), 2 como *Hanseniaspora vineae* (RBG 105-09 e RBG 205-12), 2 como *Candida parapsilosis* (RBG 205-16 e RBG 205-20), 1 como *Candida sp.* (SPA 106-12), 5 como *Meyerozyma guilliermondii* (CBA 106-17, CBA 106-19, CBA 205-10, SPA 106-09, SPG 105-06) e 5 como *Meyerozyma caribbica* (CBA 106-21, CBA 105-23, SPA 106-08, SPA 106-13 e SPA 205-07). Portanto, prevalência das cepas de levedura isolada de cana-de-açúcar foi o gênero *Meyerozyma* (50%).

É possível que a cepa RBG 105-17, previamente caracterizada por Fortunato (2011) como sendo uma cepa de levedura, seja uma cepa de bactéria, já que a amplificação pelos primers específicos para identificação de fungos não foi efetiva neste isolado. Para caracterizá-la será necessário analisar o gene ribossomal 16S específico para identificação de bactérias, o que será feito futuramente.

A levedura *C. tropicalis* foi encontrada em cascas de cana-de-açúcar em aterros na Nigéria e, sendo as espécies mais frequentemente isoladas (Olasupo *et al.*, 2003).

Azeredo *et al.* (1998) caracterizaram as comunidades de leveduras associadas de cana-de-açúcar (folhas, caules e rizosfera) durante as diferentes fases de desenvolvimento da planta no Brasil e encontraram espécies de *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*, *R. mucilaginosa* e *Debaryomyces hansenii*. *Candida pseudointermedia*, *C. tropicalis*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia guilliermondii*, *S. cerevisiae* e *Trichosporon asahii* como isolados predominantes.

Espécies de *Candida*, *Rhodotura* e *Hanseniaspora* também foram encontradas nas variedades de cana-de-açúcar utilizadas nesse trabalho, porém espécies de *Cryptococcus* não foram encontradas. *Cryptococcus* também foram encontradas em isolados de cana-de-açúcar da UFRJ como relatado por Fortunato (2011).

A maioria das leveduras pertence ao filo Ascomiceto, com 75% das cepas de leveduras isoladas, sendo que apenas as cepas identificadas como *R. mucilaginosa* são pertencentes ao Basidiomiceto (25%).

Diferente do visto por Lim tong *et al.* (2014), que observaram que 69% das leveduras pertenciam ao filo Ascomicetos e 31% ao filo Basidiomicetos, incluindo a levedura *R. mucilaginosa*. As espécies predominantes de leveduras da rizosfera de culturas de cana-de-açúcar na Tailândia foram *Candida akabanensis*, *C. tropicalis*, *H. guilliermondii*, *M. caribbica* e *R. mucilaginosa*, além de espécies de *Pichia* e *Cryptococcus*.

Na figura 2, é analisado o crescimento em meio sólido dos microorganismos isolados. As cepas caracterizadas *R. mucilaginosa* (RBG 105-07, RBG 104-14, RBG 205-21, CBA 106-24 e SPA 106-05) apresentam uma coloração rosada vista em todos os isolados. A cepa RBG 105-17 possui um crescimento diferenciado das demais cepas, nota-se que há presença de uma cápsula gelatinosa, ou uma estrutura similar, que cresce na colônia.

Interessantemente, a cepa RBG 105-17 possui a capacidade de alterar a morfologia na presença de diferentes meios de cultivo (Figura 11) indicando que o isolado reage a diferentes condições nutricionais. A cepa RBG 15-17 é

capaz de crescer formando uma espécie de cápsula gelatinosa em meio sólido *Sabouraud* (ágar, glicose e peptona) (Figura 11A) e quando esta cepa é crescida no meio YED (ágar, extrato de levedura, glicose e aminoácidos lis, leucina) o crescimento é de forma vertical, aparentando ser como uma coluna (Figura 11B). No teste para determinação do potencial destas cepas em produzir enzimas hidrolíticas (Tabela 2), também foi possível observar a mudança de morfologia pela cepa RBG 105-17. Quando foi crescida no meio específico para detecção de protease (ágar nutriente e solução gelatina 2%) a colônia ficou com a borda completamente ramificada (Figura 11C) enquanto no meio específico para detecção de celulase (ágar, sacarose, celulose) a cepa cresceu espalhada no meio, sem definição específica de colônia individual (Figura 11D), lembrando que nestes dois últimos casos a levedura foi inoculada em forma de *spot*.

Já foi visto que *Bacillus subtilis* é capaz de mudanças de morfologia dependendo das condições do meio de cultivo (Ohgiwari, Matsushita e Matsuyama, 1992). Há indícios de que este isolado de cana-de-açúcar seja um *Bacillus* (dados não mostrados), o que explicaria esta capacidade de mudança morfológica.

O setor agrícola desempenha um papel de extrema importância para o Brasil. O país desponta como o terceiro maior produtor mundial de alimentos, com destaque para a produção de soja, cana-de-açúcar, milho, café e laranja (Fao, 2009). O atual modelo empregado na produção agrícola vem ocasionando inúmeros problemas de ordem ambiental e social. A aplicação ostensiva de agroquímicos para o controle de pragas e doenças agrícolas tem causado a contaminação de solos, rios e lençóis freáticos, seleção de estirpes resistentes a diversas moléculas químicas, supressão de organismos essenciais à ciclagem de nutrientes e intoxicação de trabalhadores e consumidores. As culturas de soja, milho e cana-de-açúcar respondem por aproximadamente 70% do total de agrotóxicos utilizados no Brasil (IBAMA, 2009).

Atualmente são conhecidos cerca de 8 mil espécies de fungos fitopatogênicos, que podem causar cerca de 100 mil tipos de doenças diferentes em plantas (Tristão *et al.*, 2012). Levando em consideração a

necessidade de se buscar alternativas viáveis ao uso de agroquímicos e dos problemas decorrentes de sua utilização indiscriminada o controle biológico de micro-organismo pela ação direta de outro micro-organismo tem aumentado em importância (Cook e Baker, 1983).

Cana-de-açúcar e milho, respectivamente usados no isolamento de leveduras (Tabela 1) e na análise da promoção do crescimento vegetal (Figura 7), são culturas que podem ser infectadas por um grande número de fungos fitopatogênicos. Patógenos de cana-de-açúcar podem ser *Colletotrichum falcatum*, *Ustilago scitaminea*, *Leptosphaeria sacchari*, *Bipolaris sacchari*, *Puccinia melanocephala*, *Fusarium moniliforme*, *Thielaviopsis paradoxa* (Viswanathan, Sundar e Premkumari, 2003; Eriksson *et al.*, 2003; Sood *et al.*, 2009). E em milho já foram identificados os seguintes gêneros de fungos *Alternaria sp.*, *Phoma sp.*, *Cladosporium sp.*, *Aspergillus sp.* e *Nigrospora sp.* *Rhizopus sp.* e *Fusarium sp.* (Branção *et al.*, 2002).

*Penicillium sp.* e *Fusarium sp.* são também agentes importantes causadores de doenças em soja e trigo (Branção *et al.*, 2002) levando a perdas de produtividade e conseqüentemente afetando a economia. O gênero *Colletotrichum* também é relacionado como parasitas de centenas de angiospermas, sendo a antracnose uma das doenças de maior importância para muitas plantas cultivadas, sendo de ocorrência comum em hortaliças solanáceas, como o pimentão (*Capsicum annum*), pimenta (*Capsicum spp.*) e jiló (*Solanum gilo*) (Tozze Junior *et al.*, 2006).

Nesse estudo foi avaliada a atividade fungistática dos isolados de cana-de-açúcar (maioria leveduras) contra os fungos filamentosos *C. limdemuthianum*, *F. oxysporum* e *P. decubens* (Figura 3, 4 e 6, respectivamente).

Foi possível observar que dentre as 21 cepas isoladas de cana-de-açúcar apenas uma cepa (RBG 105-17) foi capaz de inibir fortemente o crescimento do fungo filamentoso *C. limdemuthianum* após 7 dias de cultivo na presença do mesmo (Figura 3). Todavia, esta cepa é de bactéria, ao contrário do que previamente foi descrito por Fortunato (2011).

As cepas de levedura identificadas como *R. mucilaginosa* (RBG 105-07, RBG 105-14, RBG 205-21, SPA 106-05 e CBA 106-24), *H. vinea* (RBG 205-12

e RBG 105-09) *M. guilliermondii* (CBA 205-10), 848 UFRJ (*Candida cf. sorbophila*) e *Y. lipolytica* JM-12 mostraram não ser efetivas no controle biológico de *C. lim demuthianum* já que as mesmas foram completamente sobrepostas pelo crescimento micelial do fungo, portanto não havendo nenhum tipo de alteração e/ou inibição do crescimento do *C. lim demuthianum* (Figura 3).

Ao contrário, as cepas identificadas como espécies de *Candida* (RBG 105-16, RBG 205-20 e SPA 106-12), espécies de *Meyerozyma* (CBA 106-17, CBA 106-19, CBA 106-21, CBA 106-23, SPA 106-08, SPA 106-09, SPA 106-13, SPA 205-07 e SPG 105-06, exceto CBA 205-10) não foram completamente sobrepostas pelo crescimento do *C. lim demuthianum* durante o mesmo período de tempo, indicando que de alguma forma essas cepas de leveduras são capazes de controlar o crescimento de *C. lim demuthianum* (Figura 3).

Coda (2013) avaliou 158 cepas de levedura quanto à atividade antifúngica contra o fungo *Penicillium roqueforti* e apenas as cepas de *M. guilliermondii* mostraram atividade *in vitro* afetando a germinação de conídios. A levedura *M. guilliermondii* representa uma fonte microbiana atraente para aplicações tecnológicas, sendo largamente utilizada para a produção de proteína terapêutica humana, fermentação de alimentos e controle biológico (Walker, 2011).

Rabelo de Lima *et al.* (2012) notaram que cepas de leveduras, especialmente *M. guilliermondii*, promoveram uma redução significativa no crescimento micelial e na germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*. Dado que corrobora para o controle do crescimento do fungo filamentososo pelas espécies de *Meyerozyma* analisadas nesse estudo.

Outro fungo que merece atenção no controle biológico são as espécies de *Fusarium* e diversos trabalhos vêm sendo descritos (Alabouvette, Lemanceau e Steinberg 1993; Schisler *et al.*, 1995; Fathi e El-Nady, 2008; Shanmugam *et al.*, 2011). Em testes de campo, Schisler *et al.* (2002) notaram que espécies de leveduras *Cryptococcus sp.* foram capazes de inibir o crescimento de *Fusarium graminearum* (agente causador da fusariose do trigo). Walker *et al.* (1995) observaram que as leveduras *S. cerevisiae* e *P. anomala* inibiram o crescimento de *Fusarium equiset.* *S. cerevisiae* e também foram

capaz de inibir o crescimento de *F. oxysporum* (El-Sayed Shalaby *et al.*, 2008). Contudo, não há nenhum trabalho descrito caracterizando isolados de cana-de-açúcar quanto ao seu potencial conjunto no controle biológico e na promoção do crescimento vegetal.

*F. oxysporum*, um constituinte normal das comunidades de fungos presentes na rizosfera, foi relatado como o responsável por diversas doenças em diferentes culturas incluindo milho (Nally *et al.*, 2013; Fravel, Deahl e Stommel, 2005).

Logo, a atividade dos isolados de cana-de-açúcar foi verificada contra o fungo *F. oxysporum*. É possível observar que de forma semelhante ao *C. lindemuthianum* apenas a cepa RBG 105-17 foi capaz de inibir significativamente o fungo *F. oxysporum* (Figura 4). E as cepas CBA 106-19, CBA 106-24 e RBG 205-12 (*M. guilliermondii*, *R. mucilaginosa* e *H. vinea*, respectivamente) foram capazes de exercer alguma proteção contra o contato direto com fungo filamentosos, não sendo totalmente sobrepostas pelo crescimento do mesmo. As demais cepas analisadas foram completamente sobrepostas pelo crescimento micelial do fungo, indicando que estas não possuem atividade antifúngica sobre o mesmo (Figura 4).

Não é surpresa que micro-organismos, tais como fungos, são capazes de produzir moléculas bioativas, tendo em vista que esses organismos vivem em ecossistemas complexos onde competem e se comunicam com outros organismos que vão desde bactérias, fungos, algas, protozoários (Brakhage e Schroeckh, 2011).

A capacidade de mudança morfológica pela cepa RBG 105-17, curiosamente também foi notada quando esta foi crescida na presença dos fungos filamentosos *F. oxysporum* (Figura 5A e 5B), *C. lindemuthianum* (Figura 5C e 5D). É provável que seja uma resposta ao estresse causado pela presença do fungo, ou proteção, ou por aquisição de nutrientes já que o ambiente se tornou competitivo. Tais respostas provavelmente servem para garantir a sobrevivência do organismo levando em consideração as interações microbianas existentes em ecossistemas naturais.

As leveduras são utilizadas frequentemente para o controle biológico de fungos filamentosos patogênicos em frutos. Doenças pós-colheitas são



também um problema considerável para comerciantes e conseqüentemente para economia, geralmente resolvido com uso de fungicidas (Li *et al.*, 2011). Tristão *et al.* (2012) avaliaram o potencial de leveduras no controle biológico de doenças observando que tempo de prateleira do abacaxi aumentou em seis dias, reduzindo a incidência de lesão na presença das leveduras *S. cerevisiae* e *Pseudozyma flocculosa*.

*Penicillium spp.* é importante fungo causador de doenças de frutos pós-colheita e deterioração de grãos de cereais armazenados, as quais geram perdas consideráveis. A atividade antagonista contra o fungo *P. decubens* foi avaliada e indicada na figura 6.

O isolado RBG 105-17 (capaz de inibir *F. oxysporum* e *C. lim demuthianum*) não foi capaz de inibir o crescimento de *P. decubens*. Partindo do pressuposto que esta cepa é de bactéria, este fenômeno seria justificado já que espécies de *Penicillium* são bem conhecidas em produzir Penicilina cuja ação é bactericida (Figura 6).

A inibição do crescimento de *P. decubens* foi pelas leveduras de *Candida* (RBG 205-16 e RBG 205-20), que quando crescidas na presença mostraram certa capacidade de inibir o crescimento do mesmo do fungo. Espécies de *Candida* parecem ser capazes de interferir no crescimento de espécies de *Penicillium*: *Penicillium expansum* (Coelho *et al.*, 2010) e *Penicillium roqueforti* (Druvefors e Schnürer, 2004).

Na figura 6, também mostra que as leveduras *R. mucilaginosa* (RBG 205-21, RBG 104-14, CBA 106-24 e RBG 105-07) também promoveram certa inibição no crescimento de *P. decubens*. Li *et al.* (2011) viram que maçãs tratadas com *R. mucilaginosa* diminuíram significativamente o diâmetro do mofo (causado por *P. expansum*), inibindo a germinação e sobrevivência de esporos, em comparação com os frutos de controle, e quanto maior a concentração de *R. mucilaginosa*, melhor a eficácia do biocontrole. O trabalho de Druvefors e Schnürer (2004) também mostra a inibição de *Penicillium* por *R. mucilaginosa*.

Os dados geram indicativos que as cepas de levedura descritas como espécies de *R. mucilaginosa* possam de forma similar inibir a germinação de *Penicillium*, porém apenas ensaios mais detalhados, por exemplo testes em

meio líquido, avaliando a germinação de esporos, como feito por Ribeiro *et al.* (2007) poderão confirmar a efetiva capacidade dessas leveduras.

Nota-se que a cepa *Y. lipolytica* JM-12 não interferiu no crescimento dos fungos filamentosos, *C. lindemuthianum*, *F. oxysporum* e *P. decubens*, (Figura 3, 4 e 6, respectivamente). Corroborando com esses já foi relatado que espécies de *Y. lipolytica* não interferiram no crescimento de *P. roqueforti* (Druvefors e Schnürer, 2004). *Y. lipolytica* também teve seu crescimento influenciado pela levedura *Mrakia frigida* 2E00797 (isolada de sedimentos marinhos da Antártica) (Hua *et al.*, 2010) e pela levedura marinha *Wickerhamomyces anomalus* (Guo *et al.*, 2013). Indicando que espécies de *Y. lipolytica*, incluindo a utilizada nesse estudo (*Y. lipolytica* JM-12) é uma levedura que tem seu crescimento influenciado pela ação de outros micro-organismos.

Interessantemente, a cepa RBG 105-09 (*H. vineae*) e a SPG 105-06 (*M. guilliermondii*) promoveram um crescimento diferenciado do fungo *P. decubens*. É possível observar visualmente que o fungo teve uma germinação de esporos aumentada, em comparação com o crescimento em conjunto com as demais cepas de levedura e também com a cultura controle (apenas o fungo filamentoso) (Figura 6). O trabalho de Schisler *et al.* (1995), os quais analisando o potencial de 29 leveduras para controle biológico, observaram que 3 cepas de leveduras foram capazes de aumentar a germinação de esporos da espécie em *F. sambucinum*.

O potencial dos endofíticos na agricultura inclusive no controle biológico vem aumentando (da Silva, 2013). O controle biológico de patógenos de plantas usando micro-organismos como agentes antagonistas é atualmente considerado um importante componente do manejo integrado de culturas agrícolas (Ryu *et al.*, 2014).

Os dados apresentados nesse trabalho sugerem que micro-organismos isolados de cana-de-açúcar podem ser capazes de serem utilizados no controle biológico. Principalmente a cepa RBG 105-17 pode ser considerada possível agente de controle de doenças fitopatogênicas, incluindo as que acometem as culturas de cana-de-açúcar. Trabalhos futuros visam analisar o mecanismo de ação usado pela cepa RBG 105-17 para afetar o crescimento de fungos

filamentosos. Portanto, a utilização desses isolados poderá reduzir consideravelmente o uso de pesticidas em diversas culturas de interesse econômico.

Conforme Hancock & Millar (1965), a atividade patogênica de alguns fungos está diretamente relacionada com sua capacidade de produzir enzimas degradadoras da parede celular.

No trabalho de Bastos (2004) foi feito um *screening* da capacidade de isolados do fungo *Crinipellis pernicios*a (causador da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro e cupuaçuzeiro) em produzir enzimas extracelulares, mostrando que esse fungo é capaz de produzir enzimas tais como celulase, lipase e protease, porém não é capaz de produzir pectinase.

Da mesma maneira que a capacidade de produzir enzimas hidrolíticas na eficiência de fungos patogênicos (Naturatat *et al.*, 2014), os fungos endofíticos precisam ultrapassar a barreira da parede celular para colonizar os tecidos internos. Assim, a produção dessas enzimas pelos fungos endofíticos seria de grande importância. Além dos fungos serem considerados os mais importantes micro-organismos utilizados pela indústria de produção de enzimas (Bortolazzo, 2011), sendo industrialmente valorizados porque essas enzimas normalmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação (Carvalho *et al.*, 2005)

Dentre as enzimas hidrolíticas de maior interesse estão as lipases, que são biocatalisadores versáteis capazes de catalisar diferentes reações, tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito (Najjar *et al.*, 2011). A atividade de lipase em bactérias, leveduras e fungos, mostra que cerca de 25% destes micro-organismos analisados foram considerados produtores de lipase (Hou e Johnston 1992; Hou, 1997; Nicaud. 2012).

Neste trabalho, a capacidade da produção de lipases pelos isolados de cana-de-açúcar e a levedura *Y. lipolytica* JM-12 foi avaliada ao aparecimento de um halo translúcido furta-cor. De acordo com Hankin e Anagnostakis (1975), o halo opaco é proveniente da formação de cristais de cálcio do ácido láurico, liberado pela ação da enzima ou pela completa degradação dos sais lipídicos em meios contendo sorbitol monolaurato (Tween 20) como substrato lipídico.

Nesse trabalho também foi possível observar a precipitação de cristais de cálcio nas cepas que tiveram capacidade de degradar lipídios (Figura 10).

Dentre as 24 leveduras analisadas, 21 cepas (88%) foram capazes de produzir esta enzima (Tabela 2). As cepas *Y. lipolytica* JM-12 e SPA 106-05 (*R. mucilaginosa*) foram as que degradaram lipase em maior escala do que as demais cepas (Tabela 3).

*Y. lipolytica* vem chamando a atenção de pesquisadores devido ao seu enorme potencial biotecnológico na produção de vários tipos de metabólitos, dentre os metabólitos produzidos um dos mais importantes é a lipase devido às suas aplicações tecnológicas amplas nos alimentos, farmacêuticas e de detergentes áreas de produção (Gonçalves, Colen, e Takahashi, 2014; Nicaud, 2012).

*Y. lipolytica* é considerada uma levedura oleaginosa, tendo capacidade de estocar e produzir lipídios. Em média, essas leveduras acumulam lipídios em quantidade correspondendo a 40% da sua biomassa. Em condições em que existe limitação de nutrientes, a acumulação de lipídios pode atingir valores que excedam 70% da sua biomassa. Estas características permitem que *Y. lipolytica* JM-12 esteja entre os micro-organismos promissores para a produção de biodiesel (Gonçalves, Colen, e Takahashi, 2014. Beopoulos *et al.*, 2009)

Nesse trabalho notou-se que as leveduras identificadas como *Candida* (RBG 205-16, SPA 106-12, RBG, 205-20 e 848 UFRJ) e *Rhodotorula* (SPA 106-05, RBG 105-07, RBG 104-14, RBG 205-21 e CBA, 106-24) também foram capazes de produzir lipase (Tabela 3). Espécies de *Candida* e *Rhodotorula* também são consideradas leveduras oleaginosas. Os teores de lipídios acumulados pelas espécies de *Rhodotorula* podem chegar até 72% da biomassa (Beopoulos *et al.* 2009).

Outro produto de interesse mundial no potencial de comercialização é a celulase. Segundo Leschine (1995), a celulose é considerada o biopolímero mais abundante do ambiente terrestre. Usada em meios alimentícios e também na conversão química e biológica de materiais lignocelulóticos (Chen *et al.*, 2012 Dashtban *et al.*, 2010).

Desse modo, foi avaliada a capacidade da degradação de celulose por leveduras (Tabela 2) e observado que com base no método utilizado não houve produção de celulase por nenhuma das leveduras.

Diversos fatores podem ter influenciado nesses resultados. Dentre eles, as espécies isoladas de cana-de-açúcar são a maioria pertencente ao filo Ascomycetos (Tabela 1), cuja classificação é de fungos de degradação branda (Jørgensen et al., 2005; Filho, 2008). Para além do tipo de fungo, a produção de celulase também é grandemente influenciada por componentes do meio, especialmente carbono e nitrogênio, fontes minerais e fatores físicos, tais como pH, temperatura e umidade (Lynd et al., 2002). Fatores que também podem ter contribuído para ausência de produção de celulose pelas leveduras estudadas.

Outra capacidade enzimática analisada pelas leveduras nesse estudo foi a de degradação de pectina, a qual não foi possível verificar nas mesmas (Tabela 2). As pectinases são produzidas naturalmente por plantas, fungos filamentosos, leveduras e bactérias e a seleção de isolados capazes de sintetizar enzimas adequadas é fundamental para o seu uso industrial (Uenojo e Pastore 2006).

Contudo, a produção de pectinases é também afetada por diferentes fatores tais como, os componentes do meio de crescimento, particularmente a fonte de carbono (tipo e concentração) e a presença de indutores (pectina e derivados) (Blandino et al., 2001), além de condições de processo como o suprimento de oxigênio, o pH, a temperatura, o teor de inóculo (Bravo et al., 2000) e o corante de revelação enzimática (Hankin e Anagnostakis, 1975; Uenojo e Pastore, 2006) Portanto, é possível que as condições de cultivo não sejam ótimas para a produção/detecção de pectinase pelas cepas avaliadas.

Nesse trabalho também não foi possível detectar a produção de protease pelas leveduras analisadas (Tabela 2). Para as cepas (RBG 105-07, RBG 105-14, RBG 205-21, CBA 106-24 e SPA 106-05) identificadas como *R. mucilaginosa* não têm relatos na literatura quanto à produção de proteases extracelulares (Chaud, 2014). Apesar de esta levedura possuir uma ampla distribuição em ambientes terrestres, aquáticos e marinhos, sendo encontrada também em ambientes extremos (Libkind et al., 2008; Vaz et al., 2011; Duarte et al., 2010).

A secreção de enzimas proteolíticas não é uma propriedade comum para leveduras (Charoenchai *et al.*, 1997; Chi *et al.*, 2009), contudo novos gêneros de leveduras têm sido explorados por muitos cientistas quanto à produção de proteases ácidas, embora estes relatem uma atividade enzimática ainda baixa (Mandujano-González *et al.*, 2013; Gogliettino *et al.*, 2014). As proteases extracelulares de leveduras são também relevantes em processos biotecnológicos (estabilização de cervejas e vinhos, alimentos, produtos farmacêuticos e outros) (Ogrydziak, 1993). Além disso, de acordo com Gupta *et al.* (2002), proteases microbianas apresentam ainda o diferencial de serem, em geral, extracelulares e diretamente secretadas no meio de fermentação, o que facilita os processos de recuperação.

Naturatat *et al.* (2014) verificaram a produção de enzimas celulase e protease por fungos endofíticos de arroz, no qual apenas as leveduras *Pseudozyma rugolosa* e *Pseudozyma antarctica* foram capazes de produzir protease e *Cryptococcus flavus* foi capaz de produzir celulase. Contudo, nenhuma dessas espécies foi identificada nesse trabalho (Tabela 1).

A falta de atividade proteolítica desse trabalho pode ter ocorrido também pelas condições de cultivo. É possível que as cepas (RBG 205-16, RBG 205-20, SPA 106-12, 848 UFRJ) identificadas como gênero de *Candida* fossem capazes de produzir proteases em meios específicos. Tal como visto pela levedura *Candida pulcherrima* em meio carente de aminoácidos e sulfato de amônio (Charoenchai *et al.*, 1997) e a levedura *Candida humicola* em meio enriquecido com BSA (*Bovine Serum Albumin*) (Ray *et al.*, 1992).

Diversos trabalhos ressaltam a importância de bactérias na promoção do crescimento vegetal, por isso são classicamente denominadas bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR- *plant growth promoting rhizobacteria*) (Herrmann e Lesueur, 2013; Pereira e Castro, 2014; Rosas *et al.*, 2009). Fungos micorrízicos também são extensivamente estudados quanto aos seus benefícios no crescimento de plantas (Miller e Jastrow, 1992; Vassilev *et al.*, 2001; Boby *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2004.). Porém, na literatura a importância das leveduras na promoção do crescimento vegetal ainda é relatada.

A inoculação dessas com micro - organismos benéficos pode constituir em uma alternativa para melhorar a disponibilidade e assimilação de água e nutrientes, promovendo o crescimento vegetal (de Freitas, 2000; Khalid *et al.*, 2004). Leveduras assim como as bactérias podem ser promotoras do crescimento vegetal, sendo denominadas leveduras promotoras do crescimento vegetal (PGPY - *growth-promoting yeast*) (Medina *et al.*, 2004).

Nesse trabalho, foi analisada *in vitro* a capacidade destas leveduras durante o crescimento de raízes de milho (Figura 7). Para os testes de crescimento vegetal, as leveduras CBA 106-19 (*Meyerozyma guilliermondii*) e SPA 106-12 (*Candida sp.*) e 848 UFRJ (*Candida cf. sorbophila*) isoladas de cana-de-açúcar e a levedura *Y. lipolytica* JM-12 já que se tem descrito que espécies de *Y. lipolytica* é uma PGPY (Medina *et al.*, 2004).

É possível notar que após sete dias de crescimento todos os inóculos contendo as combinações de leveduras foram capazes de promover o crescimento das raízes laterais de milho em comparação com controle (Figura 7).

Os dados mostrados na figura 8B, confirmam a promoção do crescimento de raízes laterais pelos diferentes inóculos das leveduras. No tratamento controle não houve crescimento de raízes superfinais (indicando pelos radiculares) até 0,25 cm de comprimento, porém raízes mais espessas foram encontradas (entre 1,25 cm e 1,5 cm). Apesar do comprimento total de raízes (Figura 8A) não ter sido influenciado pelos diferentes inóculos, é possível concluir que as leveduras foram capazes de modificar a arquitetura das raízes de milho induzindo o aparecimento de raízes mais finas.

Sun *et al.* (2014) observaram que o número de raízes laterais de *Arabidopsis* são aumentadas quando estas são inoculadas com leveduras capazes de produzir AIA (*Hannaella coprosmaensis* e *Ustilago esculenta*). Os dados também mostraram que pH é uma variável ambiental que influencia biossíntese AIA, mostrando que a maioria das leveduras analisadas não foi capaz de crescer em pH alcalino (9,0) e dentre as que cresceram nenhuma foi capaz de produzir AIA. Além disso, a cepa *Candida sp.*(JYC072) foi a levedura que mais produziu AIA quando analisou o pH ácido (4,0), o qual é considerado o mais propício para a produção de AIA.

Nesse trabalho, o meio de cultivo utilizado para a germinação das sementes de milho tem pH 4,5, logo é propício para a produção de AIA pelas leveduras utilizadas na preparação dos inóculos.

As leveduras CBA 106-19 (*Meyerozyma guilliermondii*) e SPA 106-12 (*Candida sp.*), 848 UFRJ (*Candida cf. sorbophila*), *Y. lipolytica* JM-12 são conhecidas por produzir AIA (Fortunato, 2011; Dutra, 2010). A capacidade de produção de AIA por leveduras endofíticas de cana-de-açúcar também foi relatada por Naturatat *et al.* (2012) e Lim tong *et al.* (2014). Nassar *et al.* (2005) constataram que as leveduras isoladas de raízes de milho são capazes de produzir AIA.

Sendo assim, é altamente provável que o aumento das raízes laterais promovidas pelas cepas CBA 106-19, SPA 106-12, 848 UFRJ e *Y. lipolytica* JM-12 tenha ocorrido pela produção exógena de AIA no meio de cultivo e que consequentemente induziu o crescimento nas raízes de milho. E a AIA é considerada como um regulador chave na formação de raízes laterais (Ditengou *et al.*, 2008, Laskowski *et al.*, 2008; Nibau, Gibbs e Coates, 2008). Além da produção de AIA por micro-organismos ser considerada uma boa fonte de biofertilizantes (Sasikala e Ramma 1998).

É importante esclarecer que a absorção de nutrientes e água pelas raízes é de responsabilidade das raízes mais finas, incluindo os pelos radiculares, o qual incrementa a superfície de contato solo-planta (Nibau, Gibbs e Coates, 2008). Na figura 8, observa-se também que há um aparecimento desses pelos radiculares em comparação ao controle (na ausência de inóculos) sugerindo que as raízes inoculadas com essas leveduras serão capazes de aumentar sua capacidade de captar nutrientes e água e consequentemente ter um crescimento mais promissor.

A expansão das células e o crescimento celular podem ser induzidos pela ação das auxinas (Rayle e Cleland, 1972). Acredita-se que as AIA podem aumentar a taxa de extrusão de  $H^+$  pela estimulação de  $H^+$ -ATPases preexistentes na membrana plasmática e/ou síntese de novas  $H^+$ -ATPases. O mecanismo do crescimento ácido postula que o crescimento celular induzido por AIA estaria diretamente relacionado com a acidificação do apoplasto provocada pelo aumento da atividade de  $H^+$ -ATPases. Essa acidificação



levaria a ativação de enzimas específicas aumentando a plasticidade da parede celular, necessário para a expansão da célula (Cleland, 1995).

As  $H^+$ -ATPases (bombas de  $H^+$ ) são enzimas transmembranares capazes de hidrolisar ATP, gerando energia e um gradiente eletroquímico que está diretamente envolvido em dois mecanismos fundamentais para o desenvolvimento vegetal. O gradiente eletroquímico gerado pela  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática está diretamente envolvido com dois mecanismos fundamentais do desenvolvimento vegetal: (i) a energização de sistemas secundários de translocação de íons fundamentais para a absorção de macro e micronutrientes e (ii) o aumento da plasticidade da parede celular para possibilitar o processo de crescimento e a divisão da célula vegetal (Façanha et al., 2002).

Já é conhecido que a levedura *Y. lipolytica* JM-12 é capaz de estimular  $H^+$ -ATPase na presença de AIA (Dutra, 2010). Portanto, é provável que a auxina produzida pelas leveduras utilizadas nos inóculos esteja estimulando as  $H^+$ -ATPase e conseqüentemente promovendo o crescimento das raízes de milho. Assim, as leveduras CBA 106-19 (*Meyerozyma guilliermondii*) e SPA 106-12 (*Candida sp.*) e 848 UFRJ (*Candida cf. sorbophila*) isoladas de cana-de-açúcar e a levedura *Y. lipolytica* JM-12 podem ser utilizadas em bioinóculos visando aumentar a produção agrícola.

## 7. CONCLUSÕES

- As leveduras isoladas de cana-de-açúcar foram identificadas como *Rhodotorula mucilaginosa*, *Hanseniaspora vineae*, *Candida parapsilosis*, *Candida sp.*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Meyerozyma caribbica*;
- Os isolados promoveram três diferentes tipos de crescimento dos fungos filamentosos *F. oxysporum* e *C. lim dem uthianum*: 1) inibição significativa com halo de inibição evidente, 2) o crescimento micelial do fungo sobrepõe o crescimento das leveduras e 3) o crescimento micelial do fungo não sobrepõe o crescimento das leveduras;
- A cepa bacteriana RBG 105-17 inibe significativamente o crescimento dos fungos *F. oxysporum* e *C. lim dem uthianum*, porém não inibiu *P. decubens*. Além de possuir uma mudança de morfologia durante o crescimento na presença dos fungos filamentosos *F. oxysporum* e *C. lim dem uthianum* e em diferentes meios de cultivo;
- As leveduras que exercem efeito brando no crescimento dos fungos filamentosos (não sobrepondo as colônias de levedura) são espécies de *Candida* e espécies de *Meyerozyma* contra *C. lim dem uthianum*, *M. guilliermondii*, *R. mucilaginosa* e *H. vinea* contra *F. oxysporum* e as *R. mucilaginosa* e espécies de *Candida* *P. decubens*. Portanto, podendo ser agentes no controle biológico;
- As leveduras CBA 106-19 (*Meyerozyma guilliermondii*) e SPA 106-12 (*Candida sp.*), 848 UFRJ (*Candida cf. sorbophila*) e *Yarrowia lipolytica* JM-12 foram capazes de promover o crescimento das raízes laterais de milho em comparação com controle. Logo, podem ser utilizadas como inoculantes;

- 21 leveduras foram capazes de produzir lipases, incluindo *Yarrowia lipolytica* JM-12 e *Rhodotorula mucilaginosa* (SPA 106-05) que tiveram maior atividade enzimática;
- Não foi possível detectar a atividade enzimática de celulase, protease e pectinase em nenhum dos isolados analisados.

## 8. REFERÊNCIAS

**AGUIAR, C., MENEZES, T.J.B., CEPPA, B.** (2000) Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. 18(1):5770.

**ALEXANDRINO, A.M., FARIA, H.G., SOUZA, C.G.M., PERALTA, R.M.** (2007) Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas. 27(2): 364-368.

**AKHTER, N., MORSHED, M.A., UDDIN, A., BEGUM, F., SULTAN, T., AZAD, A.K.** (2011) Production of Pectinase by *Aspergillus niger* Cultured in Solid State Media. International Journal of Biosciences (IJB). 1(1):33-42

**ALABOUVETTE, C., LEMANCEAU, P. & STEINBERG, C.** (1993) Recent Advances in the Biological Control of *Fusarium* Wilts. *Pestic. Sci.* 37:365-373.

**ALKORTA, I., GARB, C., LLAMA, M. J. AND SERRA, J.L.** (1998) Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry.* 33(1): 21-28.

**ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M., NEGRO, M.J.** (2010) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology.* 101:4851-4861.

**ANUNCIÇÃO DE JESUS, J.** (2013) Potencial Biotecnológico de Actinobactérias e Bactérias Diazotróficas Endofíticas para Crescimento de Plantas. Tese de mestrado na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências, Campos dos Goytacazes.

**ANGAYARKANNI, J., PALANISWAMY, M. AND SWAMINATHAN, K** (2002) Improvement of Tea Leaves Fermentation with *Aspergillus* spp. Pectinase. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 94(4): 299-303.

**ARANTES, V. AND SADDLER, J.N.** (2010) Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels.* 3(4):1-11.

**ARMAS, E.D.** (2006) Biogeodinâmica de herbicidas utilizados em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) na sub-bacia do rio Corumbataí. Tese defendida na Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" em Ecologia de Agroecossistemas. Piracicaba 2006

**ARRAS, G., SCHERM, B., MIGHELI, Q.** (2002) Improving biocontrol activity of *Pichia guillermoidii* against post-harvest decay of oranges in commercial packing-houses by reduced concentrations of fungicides. *Biocontrol Science and Technology*. 12:(5)547-553.

**ARNOLD, A.E., MEJÍA, L.C., KYLLO, D., ROJAS, E.I., MAYNARD, Z., ROBBINS, N., AND HERRE, E.** (2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS* 100(26):15649-15654.

**ARNOLD, A. E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A.** (2000) Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*, Oxford, 3:267-274.

**ASNAGHI, C., D'HONT, A., GLASZMANN, J. C., ROTT, P.** (2001) resistance of sugarcane cultivar R570 to *Puccinia melanocephala* isolates from different geographic locations. *Plant Disease*, st paul, 85: 282-286.

**ASSUMPÇÃO, L.C.** (2008) Diversidade da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja e o seu potencial biotecnológico. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

**AZEREDO, L.A.I., GOMES, E.A.T., MENDONÇA-HAGLER, L.C., HAGLER, A.N.** (1998) Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil *Internatl Microbol* 1:205-208.

**AZEVEDO, J. L., MACCHERONI, W.; PEREIRA, J. O., ARAÚJO, W. L.** (2000) Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, Valparaiso, 3:1-36.

**AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.** (2007) Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S.K. (Ed.). *Fungi: multifaceted microbes*. Boca Raton: CRC Press, 6:189-207.

**BAJAJ, B. K., RAINA, S AND SINGH, S.** (2013) Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. J. Basic microbiol, 53:645–656.

**BALDRIAN, P., & VALÁŠKOVÁ, V.** (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. FEMS Microbiol. Rev 32: 501–521.

**BANU, A.R., DEVI, M.K., GNANAPRABHAL, G. R., PRADEEP B.V. AND PALANISWAMY, M.** (2010) Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. Indian Journal of Science and Technology. 3(4):377–381.

**BARROW, J.R., LUCERO, M. E., REYES-VERA, I. AND HAVSTAD, K.M.** (2008) Do symbiotic microbes have a role in plant evolution, performance and response to stress? Communicative & Integrative Biology 1(1):69–73, 2008

**BARTH, G., GAILLARDIN, C.** (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica* JM-12. FEMS Microbiol Rev. 19: 219–237.

**BASTOS, C.N.** (2004) Produção de Enzimas Extracelulares por *Crinipe llis pernicioso*. Fitopatol. Bras. 30(3):286-288.

**BEOPOULOS, A., MROZOVA, Z, T. F., LE DALL, M.T., HAPALA, I., PAPANIKOLAOU, S., CHARDOT, T., NICAUD, J.M.** (2008) Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica* JM-12 Appl Environ Microbiol. 74:7779–7789.

**BEOPOULOS, A., NICAUD, J.M. GAILLARDIN, C.** (2011) An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. Appl Microbiol Biotechnol. 90:1193–1206.

**BEOPOULOS, A., CHARDOT, T., NICAUD, J. M.,** (2009). *Yarrowia lipolytica* JM-12: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid ACCUMULATION. BIOCHIMIE. 91:692–696.

**BETTIO L, W.** (2011) Situação e desafios para a regulamentação de agentes de biocontrole na América do sul. Embrapa Meio Ambiente - v simpósio de controle biológico.

**BETTIO L, W. E MORANDI, M. A. B.** (2009) Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna – São Paulo. 1ª edição. 334 páginas.

**BETTIO L, W ., TRATCH, R., GALVÃO, J.A.H.** (1997) Controle de doenças de plantas com biofertilizantes. Jaguariúna: EMBRAPA CNPMA. 22 p. (EMBRAPA-CNPMA. Circular Técnica, 02).

**BLANDINO, A., DRAVILLAS, K., CANTERO, D., PANDIELLA, S. S. AND WEBB, C.,** (2001) Utilization of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. *Process Biochemistry*. 37:497-503.

**BRAVO, C. E. C., CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L.,** (2000). Determinação de Condições Ideais para Produção de Poligalacturonase por *Kluyveromyces Marxianus*. *Ciênc. agrotec.*, 24 (Edição Especial), pp.137- 152.

**BORTOLAZZO, N.G.** (2011) Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação defendida na Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" em Microbiologia Agrícola. Piracicaba.

**BOBY, V.U, BALAKRISHNA, A.N, BAGYARAJ, D.J.** (2007) Effect of combined inoculation of an AM fungus with soils yeast on growth and nutrition of cowpea in sterilized soil. *J. Agric. Sci.* 3:423-429.

**BOYLE, C.; GOTZ, M.; DAMMANN-TUGEND, U.; SCHULZ, B.** (2001) Endophyte-host interactions III. Local vs. systemic colonization. *Symbiosis, Rehovot*. 31:259-281.

**BRANÇÃO, N., NUNES, C.D.M., GASTAL, M.F., RAUPP, A.A.A., PORTO, M.P., WENDT, W.** (2002) Ocorrência de Fungos em Sementes de Sorgo, Milho. Soja e Trigo. Comunicado Técnico Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

**BRAKHAGE, A.A., SCHROECKH, V.** (2011) Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genetics and Biology*. 48:15–22.

**CASTRO, A.M.** (2010) Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais *Quim. Nova*. 33(1):81-188.

**CARDOSO, E.J.B.N. and NOGUEIRA, M.A.** (2007) Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. Capítulo 5: Microbiana e na Nutrição de Plantas. Instituto Agronômico Campinas, SP.

**CHANPRASARTSUK, O.O., PRAKITCHAIWATTANA, C., SANGUANDEEKUL, R., FLEET, G.H.,** (2010) Autochthonous yeasts associated with mature pineapple fruits, freshly crushed juice and their ferments; and the chemical changes during natural fermentation. *Bioresour. Technol.* 101:7500-7509.

**CHAROENCHAI, C., FLEET, G.H., HENSCHKE, P.A., TODD, B.E.N.,** (1997) Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* 3:2 – 8.

**CHAUD, L.C.S.** (2014) Estabelecimento de condições de cultivo de leveduras isoladas na Antártica visando à produção de proteases. Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de microbiologia aplicada.

**CHAVAN, P., MANE, S., KULKARNI, G., SHAIKH, S., GHORMADE, V., NERKAR, D.P., SHOUCHE, Y., DESHPANDE, M.V.** (2009). Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. *Food Microbiol.* 26: 801-808.

**CHEPLICK, G. P.** (2006) Costs of fungal endophyte infection in *Lolium perenne* genotypes from Eurasia and north africa under extreme resource limitation. *Environmental and Experimental Botany, Oxford,* 60:02–210.

**CHI, Z., CHI, Z., ZHANG, T., LIU, G., LI, J. & WANG, X.** (2009) Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. *Biotechnol Adv.* 27: 236–255.

**CODA, R., RIZZELLO, C.G., CAGNO, R.D., TRANI, A., CARDINALI, G., GOBBETTI, M.** (2013) Antifungal activity of *Meyerozyma guilliermondii*: Identification of active compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long-term storage of wheat bread. *Food Microbiology.* 33:243-251.

**COELHO, I. L.** (2013) Potencial de leveduras no biocontrole da resinose do coqueiro, causada por *Ceratocystis paradoxa*. Dissertação apresentada ao



programa de pós-graduação em fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

**COELHO, A.R., NÓBREGA, G.M.A., PAGNOCCA, F.C., HOFFMANN, F.L., HARADA, K., HIROOKA, E. Y.** (2010) Evaluation of potential antagonism in yeasts, seeking biocontrol of spoilage by *Penicillium expansum*. *Semina: Ciências Agrária, Londrina*. 32(1):1879-1892.

**COOK, R. J. & BACKER, K. F.** (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens. *St. Paul, Aps*, 539.

**CORTE, L. DICAGNO, R., GRONEWALD, M., ROSCINI, L., COLABELLA, C., GOBBETTI, A., CARDINALI, G.** (2015) Phenotypic and molecular diversity of *Meyerozyma guilliermondii* strains isolated from food and other environmental niches, hints for an incipient speciation. *Food Microbiology*. 48:206-215.

**COURI, S. & FARIAS, A.** (1987). Fermentação semi-sólida e seleção de fungos filamentosos produtores de enzimas pectinolíticas. *SHEB. 3. Anais. Maringá: UEM*.

**CUNHA, T.** (2013) potencial de leveduras isoladas do solo e do filoplano de plantas cítricas no biocontrole de doenças de pós-colheita de citros. Dissertação Apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**DALMASTRI, C.; CHIARINI, L.; CANTALE, C.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONO, S.** (1999) Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. *Microbial Ecology, New York*, 38:273–284.

**DASHTBAN, M., SCHRAFT, H., SYED, T.A., QIN, W.** (2010) Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int J Biochem Mol Biol*. 1(1):36–50.

**DA SILVA, E.P.** (2013) Caracterização de Bactérias Endofíticas e Isolamento do Fitopatógeno *Exserohilum turcicum* de Milho Crioulo (*Zea mays* var. Rosado). Relatório de estágio apresentado ao curso de Graduação em Agronomia, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Engenheiro.

**DA SILVA, R., YIM, D.K., AND PARK, Y. K.** (1993) Application of Thermostable Xylanases from *Humicola sp.* for Pulp Improvement. Journal of Fermentation and Bioengineering. 77(1):109–111.

**DE DEYN, G.B., RAAIJMAKERS, C.E., ZOOMER, H.R., BERG, M.P., RUITER, P.C., VERHOEF, H.A., T. BEZEMER, M. & VAN DER PUTTEN, W.H.** (2003) Soil invertebrate fauna enhances grassland succession and diversity.

**DESPREZ-LOUSTAU, M.L., ROBIN, C., BUÉE, M., COURTECUISSÉ, R., GARBAYE, J., SUFFERT F., SACHE, I. AND RIZZO, D. M.** (2007) The fungal dimension of biological invasions. TRENDS in Ecology and Evolution 22(9).

**DESWAL, D., KHASA, Y.P., KUHAD, R.C.** (2011) Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis sp.* RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresource Technology*. 102: 6065–6072.

**DE LA PEÑA, P., BARROS, F., GASCÓN, S., LAZO, P.S. AND RAMOS, S.** (1981) Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry. 256:10420-10425.

**DIMAROGONA, M., TOPAKAS, E., CHRISTAKOPOULOS, P.** (2012) Cellulose degradation by oxidative enzymes. 2(3):1-8.

**DITENGOU, F.A., TEALE, W.D., KOCHERSPERGER, P., FLITTNER, K.A., KNEUPER, I., VAN DER GRAAFF, E., NZIENGUI, H., PINOSA, F., LI, X., NITSCHKE, R., LAUX, T. AND PALME, K.** (2008) Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. PNAS. 105(48).

**DUARTE, E.S., ASSIS, N.R.F., CHICATA, F.F.S. L., COSTA, R.V., VIANA, J.H.M E MARRIEL, I. E.** (2010) Prospecção de comunidade bacteriana para biocontrole de *Colletotrichum sublienum*, agente causal da antracnose do sorgo. XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. CD-Rom.

**DUJON B., SHERMAN, D., FISCHER, G., DURRENS, P., CASAREGOLA, S., LAFONTAINE, I. et al.** (2004) Genome evolution in yeasts. Nature. 430(6995):35-44.

**DRUVEFORS, U.A. AND SCHNÜRER, J.** (2005) Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. *FEMS Yeast Research*. 5:373–378.

**EL-AMIN, A.-N.; SAADABI, A. M. A.** (2007) Contribution to the knowledge of soil fungi in Sudan rhizosphere mycoflora of sugarcane at Kenana sugar Estate. *International Journal of Botany, Islamabad* 3:97–102.

**ELIBOL, M. AND OZER, D.** (2000) Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*. 36:325–329.

**EL-TARABILY, K. A. AND SIVASITHAMPARAM, K.** (2006) Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*, 47:25–35.

**ERIKSSON, O.E.; HAWKSWORTH, D.L.** (2003) *Saccharicola*, a new genus for two species on sugar cane. *Mycologia, Lancaster*, 95:(3) 426-433.

**EL-SHAROUD, W.M., BELLOCH, C., PERIS, D. AND QUEROL, A.** (2009) Molecular identification of yeasts associated with traditional Egyptian dairy products. *Journal of Food Science*. 1-6.

**FAÇANHA, A.R.; FAÇANHA, A.R.; OLIVARES, F.L.; VELLOSO, A.C.X.; BRAZ-FILHO, R.; SANTOS, G.A. & CANELLAS, L.P.** (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento de prótons. *Pesq. Agropec. Bras.*, 37:1301-1310.

**FAETH, S. H. AND FAGAN, W. F.** (2002) Fungal Endophytes: Common Host Plant Symbionts but Uncommon Mutualists. *Integ, and Comp. Biol.* 42:360–368.

**FAETH, S. H.** (2002) Are endophytic fungi defensive plant mutualists? – *Oikos* 98:25–36.

**FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS** (2009) Agricultural production: primary crops. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 10 março. 2015.

**FASANELLA, C.C.** (2008) Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente. Dissertação defendida na Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” em Microbiologia Agrícola. Piracicaba.

**FAZIO, M. L. S.** (2009) Caráter “killer” e antagonismo de leveduras aplicadas no biocontrole de fitopatógenos micotoxigênicos em fruta. TESE Apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista (USP).

**FICKERS, P., J NICAUD, M., GAILLARDIN, C., DESTAIN, J., THONART, P.** (2004). Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica* JM-12. *J. Appl. Microbiol* 96(4):742–749.

**FICKERS, P., FUDALEJ, F., LE DALL, M.T., CASAREGOLA, S., GAILLARDIN, C., THONART, P., NICAUD J.M.** (2005b). Identification and characterisation of LIP7 and LIP8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica* JM-12. *Fung Genet and Biol.* 42:264–274.

**FICKERS, P., BENETTI, P.H., WACHÉ, Y., MARTY, A., MAUERSBERGER, S., SMIT, M.S., NICAUD, J.M.** (2005a). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica* JM-12, and its potential applications. *FEMS Yeast Res.* 5(6-7):527–43.

**FICKERS, P., MARTY, A., NICAUD, J. M.** (2011). The lipases from *Yarrowia lipolytica* JM-12: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* 29:632–644.

**FILHO, J.M.M.A.** (2008) Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação defendida na Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” em Microbiologia Agrícola. Piracicaba.

**FORTUNATO, G.C.** (2011) Caracterização de leveduras isoladas da cana-de-açúcar *Saccharum spp.*. Monografia desenvolvida no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

**FRACCHIA, S., GODEAS, A., SCERVINO, J.M., SAMPEDRO, I., OCAMPO, J.A., FREITAS, J.R** (2000) Yield and N assimilation of winter wheat *Triticum aestivum* L., var. Norstar inoculated with rhizobacteria. *Pedobiologia.* 44:97–104.

**FRAVEL, D.R., DEAHL, K.L., STOMMEL, J.R.** (2005) Compatibility of the biocontrol fungus *Fusarium oxysporum* strain CS-20 with selected fungicides. *Biological Control*. 34(2):165–169.

**FRÖHLICH, J.; HYDE, K. D.** (1999) Biodiversity of palm fungi in the tropics: Are global fungal diversity estimates realistic? *Biodiversity and Conservation*, London, 8:977–1004.

**FUENTEFRIA, A. M.** (2007) Bioprospecção de leveduras killer com potencial para aplicação em biotipagem de microrganismos patogênicos humanos. Tese Defendida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**FUJITA, T.H.S.I., SENDA, Y., NAKAGUCHI, S.** (2001) Identification of Yeast Strains Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection Multiplex PCR Using Internal Transcribed. *J. Clin. Microbiol.* 39(10):3617

**GUO, F. J., MA, Y., XU, H. M., WANG, X. H., CHI, Z. M.** (2013) A novel killer toxin produced by the marine-derived yeast *Wickerhamomyces anomalus* YF07B. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103:737–746.

**GAMBOA, M.A., LAUREANO, S. & BAYMAN, P.** (2002) Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? *Mycopathologia* 156: 41–45.

**GERALDA-SILVA, E.; BORGES, M. F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H. e SCHWAN, R. F.** (2005) Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*. 5:859–865.

**GERMANO, S., PANDEY, A., OSAKU, C.A., ROCHA, S.N., SOCCOL, C.R.** (2003) Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 32:246–251.

**GUPTA, A. AND KHARE, S.K.** (2007) Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Enzyme and Microbial Technology*. 42:11–16.

**GUPTA, R., BEG, Q.K., KHAN, S., CHAUHAN, B.** (2002) An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 60:381–95.

**G O G L I E T T I N O , M . , R I C C I O , A . , C O C C A , E . , R O S S I , M . , P A L M I E R I , G . AND B A L E S T R I E R I , M .** (2014) A New Pepstatin-Insensitive Thermopsin-Like Protease Overproduced in Peptide-Rich Cultures of *Sulfolobus solfataricus* . Int. J. Mol. Sci.15:3204–3219.

**G O N Ç A L V E S , F . A . G . , C O L E N , G . AND T A K A H A S H I , J . A .** (2014) *Yarrowia lipolytica* JM -12 and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry. 14 pages

**G O P I N A T H , S . C . B . , A N B U , P . , H I L D A , A .** (2005) Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. Mycoscience. 46:119-126.

**H A N C O C K , J . G . & M I L L A R , R . L .** (1995) Association of cellulolytic, proteolytic, and xylolytic enzymes with southern antracnose, spring black stem, and stemphylium leaf spot of alfafa. Phytopathology 55:356-360.

**H A N K I N , L . AND A N A G N O S T A K I S , S . L .** (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia. 65:597-607.

**H A T O U M , R . , L A B R I E , S . AND F L I S S , I .** (2012) Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. Frontiers In microbiology.

**H A W K S W O R T H , D . L .** (1991) The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. Mycological Research, Cambridge, 95:641-655,

**H A W K S W O R T H , D . L .** (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research, Cambridge, 105:1422-1431.

**H A W K S W O R T H , D . L .** (2012) Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? Biodivers Conserv, 21:2425–2433.

**K E G G G E N O M E .** Disponível em: D [http://www.kegg.jp/kegg-bin/show\\_organism?org=yli](http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_organism?org=yli). Acessado em 20 de Março de 2015.

**H E E R D , D . , Y E G I N , S I R M A . , T A R I , C . , F E R N A N D E Z - L A H O R E , M .** (2012) Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. In solid-state fermentation: A comparative study. Food and Bioproducts processing, 90:102–110.

**HERRE, E. A., MEJÍA, L.C., KYLLO, D. A., ROJAS, E., MAYNARD, Z.** (2007) Ecological Implications of Anti-Pathogen Effects of Tropical Fungus Endophytes and Mycorrhizae. *Ecology*, 88(3):550–558.

**HORN, S.J., VAAJE-KOLSTAD, G., WESTERENG, B. AND EIJSINK, V.G.H.** Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*. 5(45):1–12.

**HOU, C.T. AND JOHNSTON, T.M.** (1992) Screening of Lipase Activities with Cultures from the Agricultural. *JAOC S*. 69(11):1097-1088.

**HOU, C.T.** (1997) Characterization of New Yeast Lipases. *JAOC S*, 74(11):1391-1394.

**HUA, M.X., CHI, Z., LIU, G.L., BUZDAR, M.A., CHI, Z.M.** (2010) Production of a novel and cold-active killer toxin by *Mrakia frigidam* 2E00797 isolated from sea sediment in Antarctica. *Extremophiles*. 14:515–521.

**HU, R. Y., LEE, C. F., YOU, Y. C., CHOU, H. C.** (2013) Analysis of cancer cell death in hepatoma cell line after the treatment of lethal culture extract from *Taiwan barnettozyma spp.* *Biomarkers and Genomic Medicine*, 5:92-95.

**IBAMA** (2010) Produtos Agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil Uma abordagem ambiental. Em : [http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade\\_Ambiental/produtos\\_agrototoxicos\\_comercializados\\_brasil\\_2009.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/produtos_agrototoxicos_comercializados_brasil_2009.pdf). Acessado em 10/03/2015.

**IBAMA** (2012) Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins. Em : [http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade\\_Ambiental/boletim%20de%20comercializacao\\_2000\\_2012.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/boletim%20de%20comercializacao_2000_2012.pdf). Acessado em 10/03/2015.

**IBGE.** (2010) Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, IBGE, Em : <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/defaulttab.shtm>, Acessado em 10/03/2015.

**IZGU, F., ALTINBAY, D., YUCELIS, A.** (1997) Identification and killer activity of yeasts contaminating starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in the Turkish baking industry. *Food Microbiology*. 14(2):125-131.

**JACOB, N. AND PREMA, P.** (2006) Influence of mode of fermentation on production of polygalacturonase by a novel strain of *Streptomyces lydicus*. *Food Technol. Biotechnol.* 44:263-267.

**JAEGER, K.E.,\*, RANSA, S., DIJKSTRA, B.W., COLSON, C., VAN HEUVEL, M. AND MISSET, O.** (1994) Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews.* 15:29-63.

**JAYANI, R.S, SAXENA, S., GUPTA, R.** (2005) Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry.* 40:2931-2944.

**JOPPA, L. N., ROBERTS, D. L. AND PIMM, S. L.** (2010) How many species of flowering plants are there?. *Proceedings of the Royal Society of London, B, Biological Sciences,* 278: 554 - 559.

**JORDAAN, A., TAYLOR, J.E., ROSSENKHAN, R.** (2006) Occurrence and possible role of endophytic fungi associated with seed pods of *Colophospermum mopane* (Fabaceae) in Botswana. *South African Journal of Botany, Amsterdam.* 72:245-255.

**JØRGENSEN, H., MØRKEBERG, A., KROGH, K.B.R., OLSSON, L.** (2005) Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme and Microbial Technology.* 36:42-48.

**KARIGAR, C.S. AND RAO, S.S.** (2011) Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. *Enzyme Research.*

**KARDOL, P., CORNIPS, N.J., VAN KEMPEN, M.M.L., 1 J. M. BAKX-SCHOTMAN, T. AND VAN DER PUTTEN, W.H.** (2007) Microbe-mediated plant-soil feedback causes historical contingency effects in plant community assembly. *Ecological Monographs.* 77(2):147-162.

**KHALID, A., ARSHAD, M. AND ZAHIR, Z.A.** (2004) Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology.* 96:473-480.

**KAHMANN, R.; BASSE, C.** (2001) Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. *Current Opinion in Microbiology, Oxford,* 4:374-380.



**KASHYAPA, D.R., VOHRAA, P.K., CHOPRAA, S., TEWARIB, R.** (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*. 77(3): 215–227.

**KIRK, J.L., BEAUDETTE, L.A., HART, M., MOUTOGLIS, P., KLIRONOMOS, J. N., LEE, H., TREVORS, J.T.** (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58:169–188.

**KLIRONOMOS, J.N.** (2002) Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature*. 417:67-70.

**KOGEL, K.H., FRANKEN, P. AND HÜCKELHOVEN R.** (2006) Endophyte or parasite – what decides? *Current Opinion in Plant Biology*. 9:358–363.

**KUKLINSKY-SOBRAL, J., ARAÚJO, W.L., MENDES, R., GERALDI, I.O., PIZZIRANI-KLEINE, A.A. AND AZEVEDO, J.L.** (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology* 6(12):1244–1251.

**KUSARI, S. AND SPITELLER, M.** (2001) are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? *Nat. Prod. Rep.*, 28: 1203–1207.

**KUSARI, S., SINGH, S. AND JAYABASKARAN, C.** (2014a) Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. *Trends in Biotechnology*, 32(6): 297-303.

**KUSARI, S., SINGH, S. AND JAYABASKARAN, C.** (2014b) Rethinking production of taxol® (paclitaxel) using endophyte biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 32(6): 304-311.

**LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J.L.** (2004) Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, 39:55-59.

**LAHAV, R., FARELEIRA, P., NEJIDAT, A., ABELIOVICH, A.** (2002) The identification and characterization of osmotolerant yeast isolates from chemical wastewater evaporation ponds. *Microb. Ecol.* 43:388-396.

**LEE, K. AND MOON, S.H.** (2003) Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. *Journal of Biotechnology*. 102:261–268.

**LESCHINE, S.B.** (1995) Cellulose Degradation in Anaerobic Environments Annual Review of Microbiology. 49:399-426 .

**LI, R., ZHANG, H., LIU, W., ZHENG, X.** (2011) Biocontrol of postharvest gray and blue mold decay of apples with *Rhodotorula mucilaginosa* and possible mechanisms of action. International Journal of Food Microbiology. 146:151–156.

**LI, S.S., CHENG, C., LI, Z., CHEN, J.Y., YAN, B., HAN, B.Z., REEVES, M.** (2010). Yeast species associated with wine grapes in China. Int. J. Food Microbiol. 138: 85-90.

**LIBKIND, D., GADANHO, M., VAN BROECK, M. AND SAMPAIO, J.P.** (2008) Studies on the heterogeneity of the carotenogenic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* from Patagonia, Argentina. Journal of Basic Microbiology. 48:93–98.

**LIMA, L. H. C.; MARCO, J. L.; FELIX, C. R.** (2000) Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. IN: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (ORG.). Controle Biológico. 1 ED. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2:263-304.

**LIMTONG, S., KAEWWICHIAN, R., YONGMANITCHAI, W., KAWASAKI, H.** (2014) Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. World J Microbiol Biotechnol

**LIU, C.I.; ZOU, W.X.; LU, I.; TAN, R.X.** (2001) Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. Journal of Biotechnology, Amsterdam, 88:277–282.

**LIU, G. L., CHI, Z., WANG, G. Y., WANG, Z. P., LI, Y., AND CHI, Z. M.** (2013) Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. Crit Rev Biotechnol, Early Online: 1–13.

**LOFRANO, R. C. Z., COSTA, F. M .F., OLIVEIRA, L. A. F., OLIVEIRA, M. C. A.** (2013). Methods and prospects of technological obtaining of first and second generation biofuels. e-xacta, Belo Horizonte Editora UniBH..6(1): 35-53.

LONHIENNE, T., MASON, M., RAGAN, M. A, HUGENHOLTZ, P., SCHMIDT, S., PAUNGF OO-LONHIENNE C. (2013) Yeast as a biofertilizer alters plant growth and morphology. Manuscript Type: Short Communications.

LYND, L.R., WEIMER, P.J., VAN ZYL, W.H. AND PRETORIUS, I.S. (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 66(3): 506–577

LUTZ, M. C., LOPES, C. A., M. RODRIGUEZ, E., M. SOSA, C., SANGORRÍN, M. P. (2013) Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. International Journal of Food Microbiology, 164:166–172.

MACIEL, G.M. (2006) Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja. 2006. 133 p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MAGLIANI, W., CONTI, S., TRAVASSOS, L.R. AND POLONELLI, L. (2008) From yeast killer toxins to antibiobodies and beyond. Fems Microbiol Lett, 288:1–8.

MAJEWSKA-SAWKA, A. and NAKASHIMA, H. (2004) Endophyte transmission via seeds of *Lolium perenne* L.: immunodetection of fungal antigens. Fungal Genetics and Biology, Orlando. 41:534-541.

MANDUJANO-GONZÁLEZ, V., ARANA-CUENCA, A., ANDUCHO-REYES, M.A., TÉLLEZ-JURADO, A., GONZÁLEZ-BECERRA, A.E., MERCADO-FLORES, Y. (2013) Biochemical study of the extracellular aspartyl protease Eap1 from the phytopathogen fungus *Sporisorium reilianum*. Protein Expression and Purification. 92:214–222.

MAKI, C.S. (2006) Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.). Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Resistência de fungos a fungicidas. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acessado em: 22 Outubro de 2014.

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**  
**(MAPA)** <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/noticias/2012/02/mapa-aprova-uso-de-biofungicida-contra-vassoura-de-bruxa> Acessado em: 22 Outubro de 2014

**MARTINS, V.G., KALIL, S.J. E COSTA, J.A.V.** (2008) Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos *Quim. Nova.* 31(8):1942-1947.

**MARTINS, F.A., MARTIM, T., CORRÊA, A.M., OLIVEIRA, F.F.** (2014) A produção do etanol de segunda geração a partir do bagaço da cana-de-açúcar. *Revista Latino-Americana de Inovação e Engenharia de Produção* 2(3): 5-16.

**MARQUINA, S., SANTOS, A., PEINADO, J.M.** (2002) Biology of killer yeast. *Int Microbiol.* 5:65-71.

**MAULE, R.F.; MAZZA, J.A.; MARTHA, G.B.** (2001) Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. *Scientia Agricola, Piracicaba,* 58:(2)295-301.

**MEDINA, A., VASSILEVA, M., CARAVACA, F., ROLDÁN, A., AZCÓN, R.** (2004) Improvement of soil characteristics and growth of *Dorycnium pentaphyllum* by amendment with agrowastes and inoculation with AM fungi and/or the yeast *Yarrowia lipolytica* JM-12. *Chemosphere.* 56(5): 449-56.

**MEJIÍA, L.C., ROJAS, E.I., MAYNARD, Z., VAN BAELE, S., ARNOLD, A.E., HEBBAR, P., SAMUELS, G.J., ROBBINS, N., HERRE, E.A.** (2008) Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control* 46: 4-14.

**MEKKI, B.B. AND AHMED A.G.** (2005) Growth, Yield and Seed Quality of Soybean (*Glycine max L.*) As Affected by Organic, Biofertilizer and Yeast Application. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 1(4): 320-324.

**MENDES, R.; AZEVEDO, J. L.** (2007) Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (Org.). *Micologia: avanços no conhecimento.* Recife: UFPE, 129-140.

**MILLER, R.M., JASTROW, J.D.** (1992) The application of VA Mycorrhizae to ecosystem restoration and reclamation. Allen, M.F. (Ed.). Mycorrhizal functioning. New York: Chapman and Hall. 438-467.

**MOCALI, S.; BERTELLI, E.; CELLI, F.D.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S.; SURICO, G.; FANI, R.** (2003) Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. *Research in Microbiology*, Paris, 154:105-114.

**MUELLER, G.M. AND SCHMIT, J.P.** (2007) Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodivers Conserv* 16:1-5.

**NALLY, M.C., PESCE, V.M., MATURANO, Y.P., TORO, M.E., COMBINA, M., CASTELLANOS DE FIGUERO, L.I., VAZQUEZ, F.** (2013) Biocontrol of fungi isolated from sour rot infected table grapes by *Saccharomyces* and other yeast species. *Postharvest Biology and Technology*. 86: 456-462.

**NATURATAT, P., SRISUK, N., ARUNRATTIYAKON, P., LIMTONG, S.** (2012) Plant growth-promotion trait of epiphytic and endophytic yeast isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. *Fungal Biology*. 118: 683-694.

**NGAMPIMOL, H. AND KUNATHIGAN, V.** (2008) The study of shelf life for liquid biofertilizer from vegetable waste. *Au J.T.* 11(4): 204-208

**NIBAU, C., GIBBS, D.J. AND COATES, J.C.** (2008) Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. *New Phytologist*. 179:595-614.

**NOUT, M.J., PLATIS, C.E., WICKLOW, D.T.** (1997) Biodiversity of yeasts from Illinois maize. *Can. J. Microbiol.* 43: 362-367.

**NOVOTNÝ, C., SVOBODOVÁ, K., ERBANOVA, P., CAJTHAMLA, T., KASINATH, A., LANG, E., ŠAŠEKA, V.** (2004) Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology & Biochemistry*. 36:1545-1551.

**OGRYDZIAK, D.** (1993) Acid and Alkaline Extracellular Proteases of *Yarrowia lipolytica* JM-12.

**OHGIWARI, M., MATSUSHITA, M. AND MATSUYAMA, T.** (1992) Morphological changes in growth phenomena of material colony patterns. *Journal of the Physical Society of Japan*. 61(3):816-822.

**OSBOURN, A.** (2001) Host-microbe interactions: fungi – Molecular intimacy exposed: probing plant fungus interactions. *Current Opinion in Microbiology*, London. 4: 363-364.

**OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L. , APPELGREN, H., TABISH, M., OKOROKOV, L., AND EKWALL, K.** (2002) The endoplasmic reticulum cation P-type ATPase Cta4p is required for control of cell shape and microtubule dynamics. *JBC*. 157(6):1029-1040

**PACKER, A. & CLAY, K.** (2000) Soil pathogens and spatial patterns of seedling mortality in a temperate tree. *Nature*. 404:278-281.

**PALLU, A. P. S.** (2010) Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

**PETRINI, O.; SIEBER, T.N.; TOTI, L.; VIRET, O.** (1992) Ecology metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*. 1:185-196.

**PEREIRA, J. O.; SOUZA, A. Q. L.; HANADA, R. E.** (2007) Diversidade de microrganismos endofíticos de plantas da Amazônia brasileira. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANOMELO, M. (Org.). *Micologia: avanços no conhecimento*. Recife: UFPE, 141-148.

**PEREIRA, S.I.A., CASTRO, P.M.L.** (2014) Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their potential as plant growth-promotion agents in metal-degraded soil. *Environ Sci Pollut Res*.

**PFLEGER, F.L., STEWART, E.L., NOYD, R.K.** (1994) *Mycorrhizae and Plant Health*. APS Press, St. Paul, MN. 47–81.

**PINTO, N.F.J.A., OLIVEIRA, E., FERNANDES, F.T.** (2007) Manejo das Principais Doenças do Milho. Circular Técnica Embrapa. Sete Lagoas.

**PELCZAR, M.J.JR., CHAN, E.C.S. KRIEG, N.R.** (1997) *Microbiologia: conceitos e aplicações*. Vol 1. São Paulo: Pearson Makron Books.

**PORRAS-ALFARO, A. AND BAYMAN, P.** (2011) Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49:291–315.

**PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S.** (2003) Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology*, Cambridge, 21(9):400-407.

**RABELO DE LIMA, J., GONÇALVES, L. R. B., BRANDÃO, L. R., ROSA, C. A. AND VIANA, F. M. P.** (2013) Isolation, identification, and activity in vitro of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *J. Basic Microbiol*, 53:590-599.

**RAO, M.B., TANKSALE, A.M., GHATGE, M.S. AND DESHPANDE, V.V.** (1998) Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3):597-635.

**RAYLE, D.L. AND CLELAND, R.E.** (1992) The Acid Growth Theory of Auxin-induced Cell Elongation Is Alive and Well. *Plant Physiol*. 99:1271-1274.

**RAY, M.K., DEVI, K.U., KUMAR, G.S. AND SHIVAJI, S.** (1992) Extracellular Protease from the Antarctic Yeast *Candida humicola*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(6):1918-1923.

**RIBEIRO, S.F.F., AGIZZIO, A.P., MACHADO, O.L.T., NEVES-FERREIRA, A.G.C., OLIVEIRA, M.A., FERNANDES, K.V.S., CARVALHO, A.O., PERALES, J., GOMES, V.M.** (2007) A new peptide of melon seeds which shows sequence homology with vicilin: Partial characterization and antifungal activity. *Scientia Horticulturae*. 111: 399-405.

**ROBIGLIO, A., SOSA, M. C., LUTZ, M. C., LOPES, C. A., SANGORRÍN, M. P.** (2011) Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. *International Journal of Food Microbiology*. Amsterdam, 147:211-216.

**RODRIGUES, A., CABLE, R.N., MUELLER, R.G., JR, M.B., PAGNOCCA, F.C.** (2009) Antagonistic interactions between garden yeast and microfungus garden pathogens of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek*. 96:331-342.

**RODRIGUEZ, R. J.; WHITE JR, J. F.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S.** (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, London, 182:314-330.

**ROMÃO, A.L.**, (2010) Análise da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar e estudo da interação *Trichoderma virens* - planta hospedeira. Tese

(Doutorado) .Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, 268p.

**ROSA, L.H., VIEIRA, M.L.A., COTA, B.B., JOHANN, S., ALVES, T.M.A., ZANI, C.L. AND ROSA, C. A.** (2011) Endophytic Fungi of Tropical Forests: A Promising Source of Bioactive Prototype Molecules for the Treatment of Neglected Diseases. Drug Development – A Case Study Based Insight into Modern Strategies. 469–486.

**ROSA-MAGRI, M.M., TAU-K-TORNISIELO, S.M., CECCATO-ANTONINI, S.R.** (2011) Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic molds, Braz. Arch. biol. Technol., 54(1):1-5.

**ROSAS, S.B., AVANZINI, G., CARLIER, E., PASLUOSTA, C., PASTOR, N., ROVERA, M.** (2009) Root colonization and growth promotion of wheat and maize by *Pseudomonas aurantiaca* RS1. Soil Biology Biochemistry. 41:1802-1806.

**RUDGERS, J.A. AND CLAY, K.** (2007) Endophyte symbiosis with tall fescue: how strong are the impacts on communities and ecosystems? Fungal Biology Reviews. 21:107–124.

**RUDGERS, J.A., KOSLOW, J.M. AND CLAY, K.** (2004) Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. Ecology Letters, 7: 42–51.

**RYU, H., PARK, H., SUH, D.S., JUNG, G.H., PARK, K., LEE, B.D.** (2014) Biological control of *Colletotrichum panacicola* on *Panax ginseng* by *Bacillus subtilis* HK-CSM-1. J Ginseng Res. 38: 215-219.

**SABOTIČ, J. & KOS, J.** (2012) Microbial and fungal protease inhibitors – current and potential applications. Appl Microbiol Biotechnol. 93:1351–1375.

**SAIKKONEN, K., FAETH, S.H., HELANDER, M. AND SULLIVAN, T.J.** (1998) Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. Annual Review of Ecology and Systematics, 29:319-343.

**SAIKKONEN, K., WÄLI, P., HELANDER, M. AND FAETH, S.H.** (2004) Evolution of endophyte–plant symbioses. TRENDS in Plant Science 9(6):275-280.

**SANTIAGO, I.F., ALVES, T.M.A. RABELLO, A., JUNIOR, P.A.S., ROMANHA, A.J., ZANI, C.L., ROSA, C.A., ROSA, L.H.** (2012) Leishmanicidal



and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia Antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Extremophiles*. 16:95–103.

**SANTOS, A., MARQUINA, D., LEAL, J.A., AND PEINADO, J.M.** (2000) (1→6)-β-D-Glucan as Cell Wall Receptor for *Pichia membranifaciens* Killer Toxin. *Applied and Environmental Microbiology*. 1809–1813.

**SANTOS, F. A.** (2013) Avaliação do pré-tratamento hidrotérmico de palhas de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de Doctor Scientiae Viçosa Minas Gerais - Brasil

**SARKAR, N., GHOSH, S.K., BANNERJEE, S., AIKAT, K.** Bioethanol production from agricultural wastes: An overview (2012) *Renewable Energy*. 37:19-27.

**SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M. J.** (2004) Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology*, Palo Alto, 55:315–340.

**SCHISLER, D.A., KURTZMAN, C.P., BOTHAST, R. J. AND SLININGER, P.J.** (1995) Evaluation of yeasts for biological control of *Fusarium* dry rot of potatoes. *American Potato Journal*. 72: 339–353.

**SCHISLER, D. A., KHAN, N. I., BOEHM, M. J., AND SLININGER, P. J.** (2002) Greenhouse and field evaluation of biological control of *Fusarium* head blight on durum wheat. *Plant Dis*. 86:1350–1356.

**SCHULZ, B. AND BOYLE, C.** (2005). The endophytic continuum. *Mycol. Res*. 109(6): 661–686.

**SCHMITT, M.J. AND BREINIG, F.** (2002) The viral killer system in yeast: From Molecular Biology to application. *Fems Microbiology Reviews*, 26:257-276.

**SCHMITT, M.J., BREINIG, F.** (2002) The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev*. 26:257–276.

**SELOSSE, M.-A.; TACON, F. L.** (1998) The land flora: a phototrophfungus partnership? *Trends In Ecology & Evolution*, Cambridge, 13:15-20.

**SIERRA, G.** (1957) A simple method for detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of contact between cells and fatty substrates. This work was carried out in the Laboratory of Microbiology, Municipal University of Amsterdam, Holland.

**SILVA, H.S.A., BETTIOL, W., TERRASAN, C.R.F., TOZZI, J.P.L., MELO, I.S., NUNES, F.V.** (2006a) Microorganismos Endofíticos: potencial de uso como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Embrapa Meio Ambiente.

**SILVA, R.L.O., LUZ, J.S., SILVEIRA, E.B. E CAVALCANTE, U.M.T.** (2006b) Fungos endofíticos em *Annona spp.*: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.) Acta Bot. Bras. 20(3):649-655.

**SILVA, R.L.O., LUZ, J.S.** (2006) Fungos endofíticos em *Annona spp.*: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.) Acta Bot. Bras. 20(3):649-655.

**SOMERS, J. M., BEVAN, E. A.** (1969) The inheritance of killer character in yeast. Genetic Researches. 13,:71-73.

**SINGH, B.K., KUHAD, R.C., SINGH, A., LAL, R. & TRIAPTHI, K.K.** (1999) Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms. Crit Rev Biotechnol. 19: 197-225

**SINGH, N.; SOMAI, B. M.; PILLAY, D.** (2004) Smut disease assessment by PCR and microscopy in inoculated tissue cultured sugarcane cultivars. Plant Science, Limerick, 167:987-994.

**SOARES, G.A.M., SATO, H.H.** (2000). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y-500-4L killer toxin. Brazilian Journal of Microbiology. 31: 291- 297.

**SOOD, S.G., COMSTOCK, J.C. AND GLYNN, N.C.,** (2009). Leaf Whorl Inoculation Method for Screening Sugarcane Rust Resistance. Plant Dis. 93:1335-1340.

**SOLBAK, A.I., RICHARDSON, T.H., MCCANN, R.T., KLINE, K.A., BARTNEK, F., TOMLINSON, G., TAN, X., PARRA-GSSERT, L., FREY, G.J., PODAR, M., LUGINBUHL, P., GRAY, K.A., MATHUR, E.J., ROBERTSON, D.E., BURK, M.J., HAZLEWOOD, G.P., SHORT, J.M. AND KEROVUO, J.**

(2005) Discovery of pectin degrading enzymes and directed evolution of a novel pectate lyase for processing cotton fabric. *J. Biol. Chem.* 280:9431-9438.

**SPAEPEN, S., VANDERLEYDEN, J. & REMANS, R.** (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31:425-448.

**STROBEL, G.; DAISY, B.** (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, 67:491-502.

**STROBEL, G.A.** (2003) Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, Paris, v. 5, p. 535-534.

**STROBEL, G., DAISY, B., CASTILLO, U. AND HARPER, J.** (2004) Natural Products from Endophytic Microorganisms. *J. Nat. Prod.* 67: 257-268

**STROBEL, G.; DAISY, B.** (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, 67:491-502.

**SUH, S.O., BLACKWELL, M.** (2004). Three new beetle-associated yeast species in the *Pichia guilliermondii* clade. *FEMS Yeast Res.* 5:87-95.

**SUMANTHA, A., LARROCHE, C., PANDEY, A.** (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technol. Biotechnol.* 44: 211-220.

**SZTAJER, H. AND ZBOŃSKA, E.** (1988) Microbial lipases in biotechnology. *Acta Biotechnologica.* 8(2):169-175.

**TAN, R. X. AND ZOU, W. X.** (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 18:448-459.

**TEFERA, T, AND VIDAL, S.** (2009) Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *BioControl* 54:663-669

**TEJESVI, M.V., NALINI, M.S., MAHESH, B., PRAKASH, H.S., KINI, K.R., SHETTY, H.S. AND SUBBIAH, V.** (2007) New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. *Bol. Soc. Quím. Méx.* 1(1):19-26.

**TORSVIK, V., GOKSOYR, J., DAAE, F.L.** (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 782-787.

**TOZZE JÚNIOR, H.J.; MELLO, M.B.A.; MASSOLA JÚNIOR, N.S.** (2006) Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. *Summa Phytopathologica*, Botucatu. 32(1):71-79.

**TRISTÃO, G. B., MALTA, C. M., BORGES, A. K. P., MORAIS, P. B., SILVA, J. F. M., PIMENTA, R. S.** (2012) Leveduras associadas a frutos de abacaxi (*Ananas comosus*) e sua utilização como agentes de controle biológico. *Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal*, 9(2):085-093.

**UENOJO, M. and PASTORE, G.M.** (2006) Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 26(3): 509-515.

**UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar**- Disponível em: <http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=85> e em <http://www.unica.com.br/mape-da-producao/>. Acessado em 26 Março de 2014.

**VAN ELSAS, J.D., DUARTE, G.F., KEIJZER-WOLTERS, A., SMIT, E.** (2000) Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*. 43:133-151.

**VAN DE VOORDE, T.F.J., VAN DER PUTTEN, W.H., BEZEMER, T.M.** (2012) Soil inoculation method determines the strength of plant-soil interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 55:1-6.

**VAN DER HEIJDEN, M.G.A. & WAGG, C.** (2013) Soil microbial diversity and agro-ecosystem functioning. *Plant Soil*. 363:1-5.

**VARMA, A.; VERMA, S.; SAHAY, S. N.; BUTEHORN, B.; FRANKEN, P.** (1999) *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington. 65:2741-2744.

**VAZ, A.B.M., ROSA, L.H., VIEIRA, M.L.A., DE GARCIA, V., BRANDÃO, L.R., TEIXEIRA, L.C.R.S., MOLINÉ, M., LIBKIND, D., VAN BROECK, M., ROSA, C.A.** (2011) The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42: 937-947.

**VASSILEV, N., VASSILEVA, M., AZCON, R., MEDINA, A.** (2001) Application of free and Ca-alginate entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* JM -12 in soil-plant system. J. Biotechnol. 91:237–242.

**VISWANATHAN, R.; SUNDAR, A.R.; PREMKUMARI, S.M.** (2003) Mycolytic effect of extracellular enzymes of antagonistic microbes to *Colletotrichum falcatum*, red rot pathogen of sugarcane. World Journal of Microbiology & Biotechnology, Oxford, 19:953-959.

**WALKER, G.M., MCLEOD, A.H., HODGSON, V.J.** (1995) Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. FEMS Microbiology Letters. 127:213–222.

**WALKER, G.M.** (2011) *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. Antonie van Leeuwenhoek. 99:25-34.

**WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J.** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Part Three. Genetics and Evolution. Cap 38

**WHITE JR., J. F.; BELANGER, F.; MEYER, W.; SULLIVAN, R. F.; BISCHOFF, J. F.; LEWIS, E. A.** (2002) Clavicipitalean fungal epibionts and endophytes – development of symbiotic interaction with plants. Symbiosis, Rehovot, 33:201-213.

**WIYAKRUTTA, S., SRIUBOLMAS, N., PANPHUT, W., THONGON, N., DANWISSETKANJANA. K., RUANGRUNGSI, N. AND MEEVOOTISOM, V.** (2004) Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal Plants. World Journal of Microbiology & Biotechnology 20:265–272.

**YU, T.; YU, C.; CHEN, F.; SHENG, K.; ZHOU, T.; ZUNUN, M.; ABUDU, O.; YANG, S.** (2012) Integrated control of blue mold in pear fruit by combined application of chitosan, a biocontrol yeast and calcium chloride. Postharvest Biology and Technology, Amsterdam, 69:49-53.

**ZHI-LIN, Y., CHUAN-CHAO, D. AND LIAN-QING, C.** (2007) Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. African Journal of Biotechnology 6 (11):1266–1271.